UNIVERSITE LILLE NORD DE FRANCE
UNIVERSITE LILLE 1

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE
Biologie des organismes

THESE

Pour obtenir le grade de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LILLE 1
EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Présentée et soutenue publiquement

Par

Muriel TAHTOUH

Le 6 septembre 2010

Rôle des facteurs du complément dans l'immunité innée du système nerveux de la sangsue : *Hm*C1q, un facteur chimiotactique contribuant à l'activation microgliale.

JURY

Rapporteurs : Jean–Yves CESBRON, Professeur.
Christine COUSTAU, Chargée de Recherche CNRS.

Examinateurs : Mohamed, R. DAHA, Professeur.
Lionel PRIN, Professeur.
Christophe LEFEBVRE, Maître de Conférences (Co-encadrant de Thèse).
Joël PESTEL, Directeur de recherche CNRS (Directeur de Thèse).

© 2011 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

© 2011 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

Remerciements

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été conduits au Laboratoire de Neuroimmunologie et Neurochimie Evolutives (FRE CNRS 3249) de l'Université de LILLE1.

C'est avec un grand plaisir que j'adresse mes remerciements à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail de Doctorat.

Tout d'abord, je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur le Professeur Michel SALZET qui m'a accueillie et permis de réaliser ce travail dans son Unité. Pour m'avoir accordée sa confiance, pour ses conseils et ses encouragements, je le remercie chaleureusement et je suis très honorée qu'il ait accepté de participer à ma soutenance de Thèse en tant que membre invité.

Je ne saurais trop remercier Monsieur le Directeur de Recherche Joël PESTEL et Monsieur le Docteur Christophe LEFEBVRE, pour m'avoir encadrée, guidée et encouragée depuis mon arrivée au laboratoire, et qui me font le plaisir de juger ce mémoire. Pour leurs qualités scientifiques, leur attention soutenue portée à ce travail, leur confiance, leur patience et leur soutien, je leurs exprime ma très sincère reconnaissance.

Je tiens aussi à remercier les Docteurs Françoise CROQ, Jacopo VIZIOLI et Pierre-Eric SAUTIERE, pour leur précieuse aide scientifique et leur disponibilité.

Je remercie également Madame Christine COUSTAU chargée de Recherches au CNRS, Messieurs Les Professeurs Jean-Yves CESBRON et Lionel PRIN, qui m'ont fait l'honneur d'accepter de faire partie du Jury de Thèse, en dépit de leurs nombreuses obligations, et de bien vouloir examiner ce manuscrit et d'en faire la critique. Veuillez accepter ma profonde gratitude.

I also thank Professor Mohamed DAHA, who did me the honor to accept to be part of the Jury Thesis, despite his many obligations, and to kindly consider and criticize this manuscript. Please accept my deepest gratitude.

© 2011 Tous droits réservés.

Je tiens également à remercier Annie DESMONS, Céline WICHLACZ, et Nathalie ZIENTAL-GELIUS, pour leur assistance technique, leur aide précieuse, leur savoir-faire et leur gentillesse, mais également Brigitte MACQUART notre gestionnaire et Lucie MYLONDO, qui lui a succédé. Je remercie plus particulièrement Christelle VAN CAMP. Grâce à elle, je garderai de mon long passage en France, un agréable souvenir. Je tiens à la remercier pour la sympathie et la confiance qu'elle m'a témoignée.

Je souhaite associer à ces remerciements, l'ensemble des Professeurs, Enseignants Chercheurs et Chargé de Recherches du Laboratoire : le Professeur Isabelle FOURNIER, les Docteurs Aurélie TASIEMSKI, Virginie CUVILLIER, Frank RODET, Emmanuel ROGER, Maxence WISZTORSKY et Madame Dominique CROIX, pour leur aide et conseils.

Merci également à toutes les personnes extérieures qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, le Docteur Patricia NAGNAN-LE MEILLOUR pour sa précieuse collaboration, le Directeur de Recherches Christian SLOMIANNY, Gilles COURTAND et Loïc BRUNET, le Docteur Christophe TASTET et Dave TRINEL.

Je ne saurais oublier mes collègues étudiants avec lesquels j'ai eu des discussions animées, et qui ont sans conteste enrichi ce mémoire, merci à tous.

© 2011 Tous droits réservés.

A mes Parents

Je ne dirai jamais assez …

© 2011 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

A mon Robin…tu étais
toujours là…

© 2011 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

A mes amis, à mes profs et
à toute ma famille !
Un grand merci pour votre
soutien

© 2011 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

Abréviations

- SNC	:	Système Nerveux Central
- CAM	:	Complexe d'Attaque Membranaire
- gC1q	:	Tête globulaire ou domaine globulaire C1q
- LPS	:	Lipopolysaccharide
- MBL	:	Mannose Binding Lectin
- MASP	:	MBL- Associated Serine Protease
- DAF	:	Decay Accelerating Factor
- CRD	:	Carbohydrate- Recognizing Domain
- CRTP	:	C1q TNF Related Protein
- TEP	:	Thioester containing protein
- MACP	:	Membrane Attack Complex/ Perforin
- SNP	:	Système Nerveux Périphérique
- BHE	:	Barrière Hémato-Encéphalique
- CVOs	:	Organes Circumventriculaires
- EAE	:	Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale
- THD	:	TNF Homology Domain
- CRDs	:	Cysteine- Rich Domains
- Cbln	:	Cerebellin
- CMH I ou II	:	Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I ou II
- TCR	:	T Cell Receptor
- *Hm*	:	*Hirudo medicinalis*
- EST	:	Expressed Sequence Tags
- NO	:	Monoxyde d'azote
- iNOS	:	NO-Synthase induite
- nNOS	:	NO-Synthase neuronale

Sommaire

Introduction 2

I. Système du complément chez les vertébrés et les invertébrés 3

I.1. Le complément chez les vertébrés 3

I.1.a. Caractéristiques des trois voies d'activation du complément 3
I.1.b. Régulation des trois voies d'activation du complément 6

I.2. Le complément chez les invertébrés 10

I. 2. a. Mise en évidence de molécules apparentées au C1q 10
I. 2. b. Mise en évidence de molécules apparentées au C3 12
I. 2. c. Mise en évidence de molécules apparentées au CAM 13

II. Complément et système nerveux central (SNC) 16

II. 1. La barrière hémato-encéphalique (BHE) 16

II. 1. a. Invasion bactérienne du SNC 18
II. 1. b. Infection virale du SNC 19

II.2. Complément au niveau du système nerveux des vertébrés 20

II. 2. a. Système du complément dans la neuroinflammation 20
II. 2. b. Rôle bénéfique du complément dans le SNC 20
II. 2. c. Rôle néfaste du système du complément dans le SNC 21

II.3. Molécules apparentées au C1q : Famille C1qTNF 25

II.4. Complément au niveau du système nerveux des invertébrés 29

III. Cellules microgliales et mécanismes de protection du système nerveux 31

III. 1. Système nerveux et cellules microgliales chez les vertébrés 31

III. 1. a. Morphologie des cellules microgliales 31

III. 1. b. Mobilisation et activation des cellules microgliales 33
III. 1. c. Fonctions des cellules microgliales 36

III.2. Système nerveux et cellules microgliales chez les invertébrés 44

III. 2.a. Cellules microgliales chez les invertébrés 44
III. 2.b. Cellules microgliales et repousse axonale 44
III. 2.c. Description du modèle *Hirudo medicinalis* 49

Publication n°1 53

Publication n°2 60

Résultats 80

I. Caractérisation de *Hm*C1q 80

Publication °3 86

II. Niveau d'implication des cellules microgliales sensibles au C1q 104

Publication n°4 107

Discussion 137

Conclusion et perspectives 159

Publication n°5 163

Bibliographie 178

Sommaire des figures

Figure 1 : Activation et régulation du système du complément 8

Figure 2 : Structures comparées du C1q et de MBL 9

Figure 3 : La classification phylogénétique des métazoaires basée sur les ARN ribosomaux et le gène HOX 15

Figure 4 : Aperçu schématique de la barrière hémato-encéphalique 17

Figure 5 : Diagramme illustrant le double rôle du complément dans le système nerveux central 24

Figure 6 : Les principales protéines possédant le domaine gC1q 26

Figure 7 : La vaste famille des molécules apparentées au C1q 28

Figure 8 : Etats d'activation de la microglie 39

Figure 9 : Récepteurs impliqués dans la signalisation des cellules microgliales 42

Figure 10 : Médiateurs inflammatoires et immunorégulateurs produits par les cellules microgliales activées 43

Figure 11 : Mise en évidence de la mobilisation de cellules microgliales des ganglions de l'escargot (*Helix aspersa*) en culture de gel de collagène 46

Figure 12 : Mobilisation des cellules microgliales de ganglion de sangsue en culture 48

Figure 13 : Schématisation du système nerveux de la sangsue médicinale 51

Figure 14 : L'accumulation des cellules microgliales au site de lésion est indispensable à la repousse neuronale 82

Figure 15 : Récapitulatif de l'ensemble des résultats 140

Figure 16 : Changement morphologique des cellules microgliales 145

Mon travail de thèse a porté sur l'étude du rôle des facteurs du complément dans le Système Nerveux Central (SNC) de la sangsue médicinale. Cet invertébré présente la particularité de pouvoir réparer efficacement son SNC après lésion. La mobilisation des cellules microgliales et leur recrutement sur le site lésé sont essentiels à ce processus de réparation. Au cours de l'identification des molécules chimiotactiques impliquées, il nous a été possible de caractériser et de préciser l'activité fonctionnelle d'un facteur homologue au C1q.

Au début de ce manuscrit, un bilan actuel des connaissances du système du complément et de ses principales fonctions au sein du Système Nerveux Central (SNC) des vertébrés et des invertébrés est réalisé. De plus dans cette introduction, les données actuelles concernant les cellules microgliales et leur implication dans la réponse neuro-inflammatoire seront présentées.

A la suite de cette introduction, les résultats acquis durant la thèse seront rapportés par ordre de réalisation sous forme de publications, acceptées ou en cours de soumission. Pour chaque publication, un résumé du contexte expérimental précédera la publication elle-même et sera suivi par une discussion abordant les champs d'investigations ouverts par cette approche expérimentale.

Finalement une discussion finale et critique de l'ensemble des résultats acquis sera accompagnée de la présentation de perspectives qui devraient affiner les interprétations des résultats obtenus au cours de cette thèse.

Introduction

I. Système du complément chez les vertébrés et les invertébrés

I.1. Le complément chez les vertébrés

I.1.a. Caractéristiques des trois voies d'activation du complément

Le système du complément correspond à un groupe de 35 protéines présentes au niveau plasmatique. Ces protéines sont circulantes ou membranaires et principalement sécrétées par le foie [Gasque et al., 2000]. Leur rôle, comme initialement reconnu, est en particulier de compléter l'action des anticorps. Les différentes protéines du complément se présentent sous la forme de pro-enzymes inactives qui peuvent être activées en cascade par clivage enzymatique. Le clivage libère une fraction ayant une activité protéasique, et un petit fragment qui possède souvent une activité sur les cellules inflammatoires. L'activation en cascade de ces différents composés est à l'origine de mécanismes essentiels à la réaction immunitaire : (1) la cytolyse d'une cellule ou d'un agent pathogène, (2) l'activation de la réponse cellulaire par les petits fragments de clivage proinflammatoires, (3) l'opsonisation de certains agents pathogènes permettant ainsi leur phagocytose, et (4) le métabolisme des complexes immuns circulants grâce aux récepteurs des fragments du complément. On distingue 3 voies biochimiques d'activation illustrées dans la figure 1: classique, alterne et voie des lectines. Les différentes voies activant le complément aboutissent toutes à la formation d'une C3-convertase et d'une C5-convertase, points de départ de la voie effectrice commune qui aboutit à la destruction de la cible après formation d'un canal transmembranaire, permettant la lyse de la cellule. Les principales protéines du complément sont notées de C1 à C9 [Fujita, 2002; Fujita et al., 2004; Matsushita and Fujita, 1996]. Les protéines de C5 à C9 s'assemblent pour former le "complexe d'attaque membranaire" (CAM), responsable de la destruction des cellules pathogènes [Gasque et al., 2000; Jauneau et al., 2003; Ramaglia et al., 2008; Rus et al., 2006].

a) Voie Classique :

Chez les vertébrés, la voie classique est activée par les complexes antigène-anticorps. Chez l'homme, seules les IgG1, IgG3, les IgM, et faiblement les IgG2 sont capables d'entraîner la cascade des évènements. La fixation de deux ou plusieurs anticorps d'isotype IgG ou d'anticorps d'isotype IgM pentamérique, à la surface d'un micro-organisme, permet à leur région Fc de fixer le premier composant de la voie classique : C1. C1 est un gros complexe, composé de trois sous-composants : C1q, C1r et C1s. Le C1q est composé de 18 chaînes polypeptidiques dont chacune est composée d'une région N-terminale suivie d'un domaine collagénique et se terminant par une tête globulaire (gC1q) qui fixe l'anticorps. Ces têtes globulaires interagissent avec les fragments constants (Fc) des immunoglobulines ayant lié l'antigène [Kishore et al., 2004]. Quand le C1q lie le complexe antigène-anticorps, il active C1r, qui devient protéolytique, et clive C1s pour désamorcer la cascade de protéolyse. Le C1 activé clive alors le C4 puis le C4 clive le C2, pour former un complexe C2bC4b encore appelé C3-convertase, classique, dans ce cas. Le C3b, qui est le plus grand fragment de la lyse de C3 par la C3-convertase, peut se lier de façon covalente à la surface d'une cellule porteuse de récepteurs spécifiques. Cette convertase forme le C4b2b3b ou C5-convertase. Ainsi une fois, fixée sur la membrane de façon covalente, elle peut cliver le facteur C5 en C5a et C5b. C5b reste faiblement lié à C3b et s'assemble rapidement à C6 et C7 pour former le complexe C567 qui va s'ancrer à la membrane via C7. Ce complexe lie ensuite C8, pour former le complexe C5678. La liaison du facteur C9, qui expose une région hydrophobe après changement de conformation, entraîne son insertion dans la membrane plasmique de la cellule. Il s'ensuit alors une réaction en chaîne où les C9 de nouvelle conformation vont lier des C9 de l'ancienne, entraînant le changement conformationnel qui leur permet de s'insérer dans la double couche lipidique. C'est ainsi que se forme un « pore » au travers de la membrane cellulaire, élément décisif pour la lyse cellulaire. Au cours de cette cascade d'activation sont libérés des produits à activité biologique considérée comme défavorable à l'organisme. Ainsi les fragments C3a et C5a, appelées anaphylatoxines, peuvent favoriser la libération d'histamine par les cellules immunitaires [Ali, 2010], mais aussi comme le C5a a montré une activité chimiotactique importante [Klos et al., 2009].

b) Voie Alterne :

Il existe en permanence dans le plasma un clivage « de base » de C3 en C3b. C3b se fixe sur un site accepteur, ce qui induit l'activation de la voie alterne. En l'absence de ce site accepteur, le C3b devient du C3b soluble. Lors de l'activation de la voie alterne, le processus de clivage en C3b est amplifié par un support activateur représenté généralement par la surface cellulaire des bactéries à gram positif ou à gram négatif, ou celles de cellules infectées par un virus ou encore de levures et parasites. Les polysaccharides comme le zymosan ou l'inuline, les LPS (lipopolysaccharides) bactériens, diverses substances comme les fibres d'amiante, le gluten et l'hémoglobine, certains produits de contraste fortement iodés, et quelques cellules tumorales peuvent aussi avoir cette fonction. Le C3b fixé à une surface peut alors lier le facteur B, qui est clivé en présence d'ions Mg^{2+}, par le facteur D en Bb et Ba, formant la C3-convertase alterne, ou C3bBb. La properdine (ou facteur P), elle-même activée par des polysaccharides bactériens permet la stabilisation du complexe C3bBb. La C3-convertase alterne clive des molécules de C3 pour former un complexe C3bBbC3b, ou C5-convertase alterne. Cette dernière va à son tour cliver le C5 qui pourra agir comme dans la séquence finale de la voie classique pour permettre la formation du MAC [Ferreira et al., 2010; Francis et al., 2003].

c) Voie des lectines:

Cette voie fait intervenir certains carbohydrates (glucides) microbiens dans l'initiation de la cascade d'activation. En effet, la voie des lectines est activée par la fixation de la protéine globulaire, la Mannose Binding Protein (MBL) de la famille des collectines au niveau de résidus mannose ou N-acétylglucosamine (GlcNac) présents à la surface de l'agent infectieux. Sa fixation sur ces résidus active 2 sérine-protéases, MASP (MBL-Associated Serine Protease) 1 et MASP2 ou MASP3 qui clivent et activent C4 et C2, rejoignant ainsi la voie classique. La MBL possède une structure tridimensionnelle semblable à C1q ; elle est composée de 6 sous-unités formées chacune par l'enroulement de 3 chaînes protéiques dont chacune est formée d'une partie N-terminale (21 acides aminés) suivie d'une région collagénique (59 acides aminés) caractérisée par des répétitions G-X-Y se terminant par une extrémité globulaire CRD (Carbohydrate-Recognizing Domain) en C-terminal [Bohlson et al., 2007; Jensenius et al., 2009]. Mais

la MBL, appartient à une autre famille que C1q, celle des collectines (collagène + lectine). Les extrémités globulaires de la MBL sont en effet douées de fonction « lectine », c'est-à-dire capables de se lier à des groupes sucrés. C'est la principale différence avec le C1q dont la partie globulaire n'interagit pas avec les sucres. Malgré la ressemblance structurale, chacune des molécules C1q et MBL appartient à une famille distincte et active apparemment deux voies différentes du complément. La structure détaillée de ces deux molécules est illustrée dans la figure 2.

I.1.b. Régulation des trois voies d'activation du complément

1- Régulation de la voie classique:

- L'activation de la voie classique est soumise à différents mécanismes régulateurs faisant appel à différentes molécules :

- C1-INH : inhibiteur du C1, il inhibe l'activité de C1r et C1s en formant un complexe avec ces enzymes et en les dissociant de C1q.
- C4bp : (C4 binding protein) se lie à C4b, et interfère avec la formation de la C3C5 convertase et permet au facteur I (inactivateur de C3b) d'inactiver C4b en le clivant en C4c et C4d.
- C1q-INH : inhibiteur de C1q, il inhibe l'activation de la voie classique par interaction avec le C1q.
- Protéines de surfaces : elles sont présentes à la surface de la plupart des cellules et contrôlent la formation de la C3 convertase :
  - DAF (decay accelerating factor) : cette protéine membranaire est présente sur toutes les cellules sanguines, endothéliales et épithéliales et assure la dissociation des C3 convertases de manière très efficace.
  - La protéine cofacteur de membrane (MCP) (membrane cofactor protein CD46) : Elle est présente sur les membranes des cellules autres que les hématies, et en fixant C3b et C4b favorise leur inactivation. C'est aussi un cofacteur de I dont le rôle s'ajoute à celui de DAF.
  - Le CR1(CD35) : Ce récepteur de type I lie les fragments C3b et C4b. En plus de sa fonction de récepteur, il est capable de dissocier les convertases et joue le rôle de

cofacteur de I pour le clivage de C3b et C4b. Il est exprimé à la surface des globules rouges (GR), des monocytes, des polynucléaires neutrophiles (PNNs), des éosinophiles, des cellules NK, des lymphocytes B et T et des podocytes glomérulaires.

2- Régulation de la voie alterne :

- La boucle d'amplification de C3b est contrôlée par 2 protéines : H et I. Le facteur H se lie à C3b de façon compétitive avec B, ce qui entraîne une dissociation accélérée de la C3 convertase alterne C3Bb qui perd son activité. La liaison avec C3b permet au facteur I de cliver C3b en C3bi, molécule incapable de se lier au facteur B pour former la C3 convertase alterne. Donc le facteur H est un cofacteur du facteur I.
- On trouve aussi les protéines membranaires DAF et CR1 qui contrôlent la C3 convertase alterne (C3bBb).
- Le facteur néphrétique C3 NEF est un auto-anticorps dirigé contre la C3 convertase, il stabilise ce complexe et le rend résistant à l'action du facteur H.

3- Régulation du CAM :

Le site de liaison à la membrane dans C5b67 est labile. Si le complexe ne rencontre pas une membrane dans la fraction de seconde après qu'il se soit détaché de la convertase, le site est inactivé par hydrolyse ou à cause de la liaison à un des régulateurs du complexe d'attaque membranaire. La protéine S (ou vitronectine), la clusterine qui sont toutes les deux des protéines plasmatiques, ou le CD59, qui est une protéine membranaire, peuvent réguler l'activité des protéines du complément. C8 peut aussi jouer le rôle de régulateur de la formation du CAM. En effet, si C8 se lie à C5b-7 en phase liquide, il bloque le site de fixation a la membrane et prévient ainsi la formation du CAM [Zipfel and Skerka, 2009].

L'ensemble des actions régulatrices est indiqué de manière schématique à la figure 1 qui montre les connexions possibles entre les trois voies du système du complément.

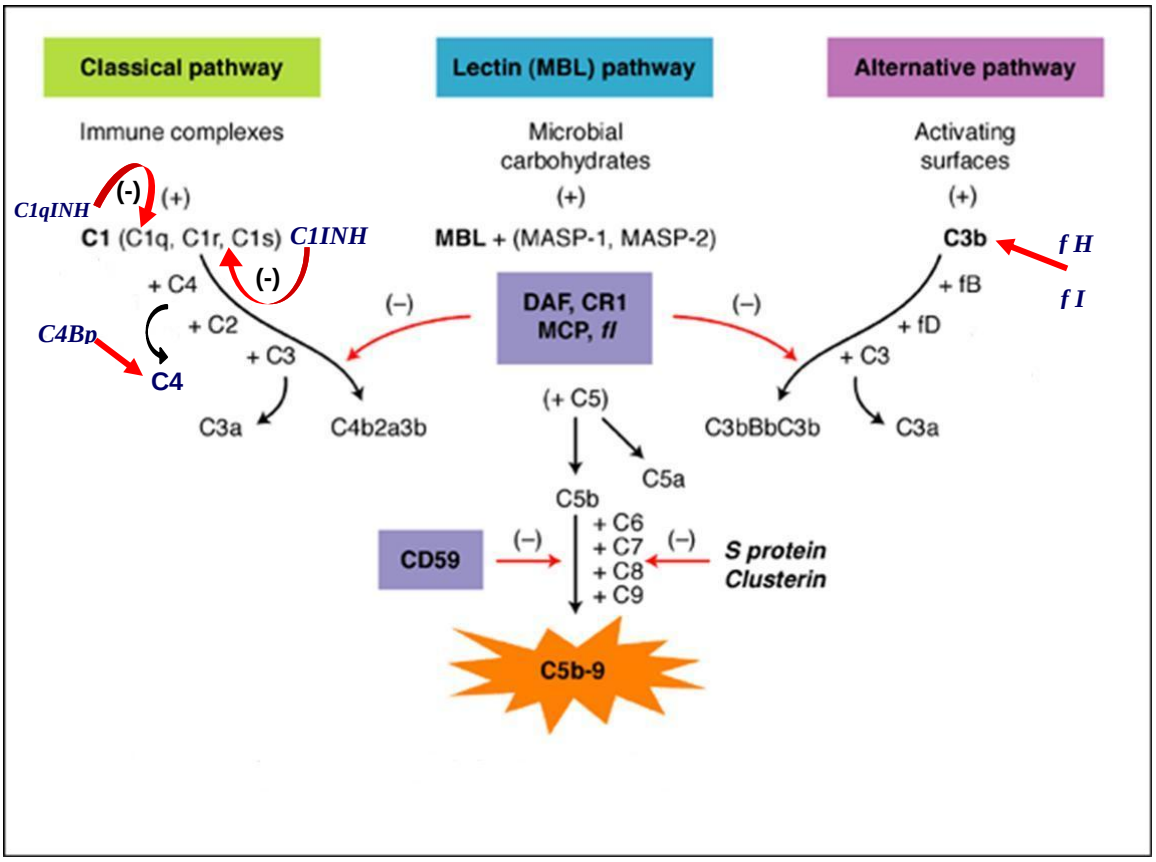


Figure 1: **Activation et régulation du système du complément** (modifiée d'après [Francis et al., 2003; Gasque et al., 2000]). Le système du complément est activé par 3 voies principales: (1) La voie classique activée par les complexes immuns. (2) La voie alterne non-dépendante des complexes immuns, fait intervenir le fB pour la construction de la C3 convertase (3) la voie des lectines activée par les résidus de sucres présents à la surface de l'agent pathogène. L'activation des 3 voies du complément aboutit à la formation du CAM : C5b-9. Ce système est régulé par des protéines comme C1-INH, C4bp, fI, fH, DAF, CR1, MCP, HRF (CD59), la protéine S et la clusterine. Certains inhibiteurs sont solubles (Gras, italique) et d'autres sont associés à la membrane (Gras, encadré).

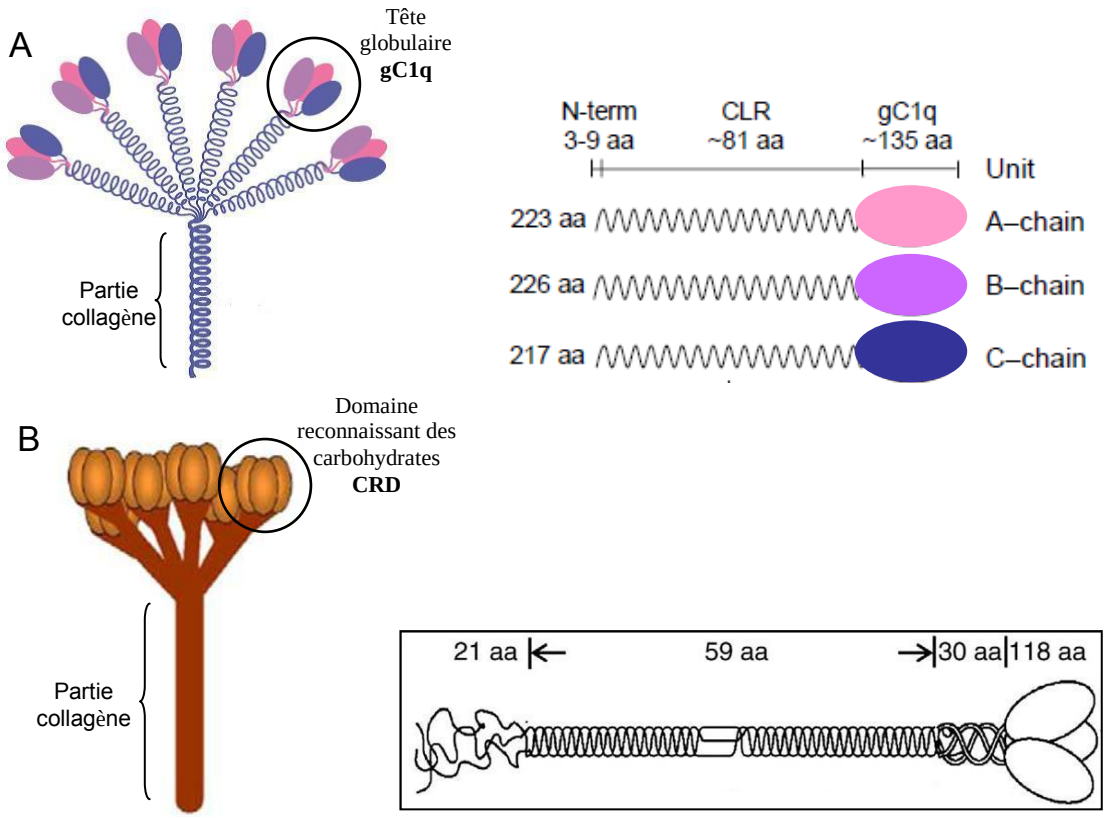


Figure 2: **Structures comparées du C1q et de MBL. (A) Structure de la molécule C1q** (d'après [Kishore et al., 2004]). Elle est composée de 6 sous-unités dont chacune est formée de 3 chaînes polypeptidiques (A, B et C). A droite, on a la représentation de chacune de ces chaînes constituées d'une partie N- terminale suivie du domaine collagène et se terminant par la tête globulaire gC1q. **(B) Structure de la molécule MBL** (d'après [Jensenius et al., 2009]). Elle est composée de 6 sous-unités dont chacune est formée de 3 chaînes polypeptidiques identiques. A droite, on a la représentation de cette chaîne constituée d'une partie N- terminale suivie du domaine collagène et se terminant par la tête globulaire CRD servant de liaison aux sucres.

I.2. Le complément chez les invertébrés

Les invertébrés ne présentent pas de réponse immunitaire acquise faisant intervenir sélection et multiplication clonale de cellules spécialisées et production d'anticorps, mais ils sont néanmoins capables de reconnaître et d'éliminer efficacement et rapidement tout type de corps étranger faisant intrusion dans leur milieu interne. Le système du complément, une composante essentielle de la réponse immunitaire chez les vertébrés, a été aussi recherché chez les invertébrés dans divers embranchements. Plusieurs molécules apparentées aux protéines du complément ont été donc caractérisées chez des modèles invertébrés. La figure 3 représente les principaux groupes de métazoaires incluant les vertébrés et d'autres membres regroupés sous le terme invertébrés.

Le dogme de l'absence de spécificité de l'immunité innée chez les invertébrés, est récemment remis en question par une série de résultats originaux [Schulenburg et al., 2007]. En effet, le copépode *Macrocyclops albidus* amplifie sa réponse immunitaire contre une souche du parasite *Schistocephalus solidus* après avoir été préalablement infecté par cette même souche [Kurtz and Franz, 2003]. De même, chez le cladocère *Daphnia magna* exposé à diverses souches de parasites, une résistance plus forte a été détectée contre la souche *Pasteuria ramosa* comparativement à l'autre souche utilisée [Little et al., 2003]. Ces résultats mettent ainsi en relief l'existence d'une possible spécificité de la réponse immunitaire chez les invertébrés, cependant les mécanismes qui en sont responsables sont encore en cours d'étude [Schulenburg et al., 2007]. Les facteurs du complément pourraient contribuer à la mise en place de cette sélectivité dans la qualité et le niveau de réponse induite.

I. 2. a. Mise en évidence de molécules apparentées au C1q :

C1q est connue pour être la composante essentielle de la voie classique du complément chez les vertébrés. Des séquences apparentées à cette molécule ont été répertoriées chez des modèles invertébrés. En effet, des séquences homologues à C1q ont été mises en évidence dans le génome de l'oursin [Hibino et al., 2006]. Cependant, basé

sur la structure primaire du domaine C1q il est difficile d'étudier l'implication de ces molécules dans la voie classique du complément.

Des études récentes du génome de l'amphioxus *Branchiostoma floridae* ont également mis en évidence 75 séquences apparentées au C1q. Une molécule complètement caractérisée, nommée AmphiC1q1 présente des homologies avec la CTRP1 appartenant aussi à la famille C1q. AmphiC1q1 est capable de se lier au LPS des bactéries à Gram négatif et possède également une activité spécifique au C1q. En effet, AmphiC1q1 peut induire une activation et une agrégation plaquettaire comme celle observée avec C1q et CTRP1. Cette molécule est ainsi capable de reconnaître les structures bactériennes et d'induire une agrégation cellulaire [Huang et al., 2008; Yu et al., 2008].

Chez les mollusques on retrouve aussi des molécules apparentées aux protéines du complément. En effet, chez la moule, une protéine *Mg*C1q a été caractérisée dans les banques d'ADNc constituées à partir des transcrits de la moule *Mytilus galloprovincialis* après stimulation avec des bactéries du genre Vibrio ou l'immunostimulant poly I:C. Cette protéine a été détectée tout au long de son ontogénèse et est modulée par les bactéries à Gram positif et à Gram négatif et présente une homologie élevée avec une lectine liant l'acide sialique. Ces données suggèrent donc que, chez les invertébrés, le C1q pourrait plus faire partie d'une voie d'activation similaire à celle des lectines qu'à la voie classique qui repose sur la présence des complexes immuns anticorps-antigène. Chez les vertébrés, des études sont en cours pour tester la validité de cette hypothèse [Gestal et al., 2010].

Plusieurs molécules apparentées à la MBL ont été aussi mises en évidence chez les invertébrés. Chez l'urocordé *Ciona intestinalis*, qui a le plus petit génome (donc très pratique à manipuler), des molécules apparentées aux protéines de la voie lectinique des vertébrés ont été mises en évidence. En effet, une protéine *Ci*MBL a été caractérisée au niveau de l'ADNc constituées à partir des transcrits totaux de Ciona suite à une stimulation avec du LPS. Sa séquence contient, comme celle de son homologue vertébré,

une partie N-terminale riche en cystéines suivie du domaine collagène caractérisé par les répétitions G-X-Y et se terminant par le domaine globulaire (CRD) ou encore appelé le domaine lectine-C. Ce dernier a été démontré capable de lier à la fois les résidus mannose et les résidus glucose. Ceci suggère que cette molécule, exprimée en réponse au LPS puisse activer une voie lectine-like. Son CRD capable de lier des sucres et la caractérisation des MASPs viennent conforter l'idée que l'activation de cette voie apparentée à la voie lectine des vertébrés puisse démarrer avec la reconnaissance des résidus sucrés [Bonura et al., 2009].

I. 2. b. Mise en évidence de molécules apparentées au C3:

La molécule C3 constitue une molécule centrale du système du complément chez les vertébrés. Elle intervient dans les trois voies d'activation du complément. Cette protéine a été retrouvée aussi chez les invertébrés.

Dans le génome de *Ciona intestinalis* on retrouve 2 séquences apparentées à C3, notées C3-1 et C3-2. L'analyse structurale de C3-1 laisse supposer une fonction identique au C3 des vertébrés comparativement à C3-2 dont la structure s'éloigne des fonctions de C3 connues. La présence du facteur B- like chez Ciona, qui représente chez les vertébrés la molécule catalytique de la C3 convertase alterne, suggère l'existence chez *Ciona intestinalis* d'une voie apparentée à la voie alterne du système du complément.

Dans le génome de l'amphioxus *Branchiostoma floridae* des molécules homologues à C3 et à Bf ont été mises en évidence. Il est intéressant de noter que ces dernières ont été aussi détectées au sein du cytosol des œufs fécondées et ont montré une activité bactériostatique sur les bactéries à Gram négatif *Vibrio anguillarum* et à Gram positif *Staphylococcus aureus* [Holland et al., 2008; Liang et al., 2009].

Des molécules apparentées à C3 et au facteur B ont été aussi retrouvées chez les mollusques, comme la palourde *Ruditapes decussatus* [Prado-Alvarez et al., 2009] et le calmar *Euprymna scolopes* [Castillo et al., 2009].

La recherche de telles protéines a été également entreprise chez les ecdyzozoaires, notamment chez les arthropodes. Des études ont été effectuées sur deux espèces différentes de limule. La première, *Carcinoscorpius rotundicauda* (*Cr*) où on a identifié la protéine *Cr*C3 pouvant se lier à *Staphylococcus aureus* et à d'autres bactéries et la molécule apparentée au facteur B, le *Cr*Bf [Zhu et al., 2005]. La deuxième étant *Tachypleus tridentatus* qui possède aussi un homologue à C3, la *Tt*C3. Le facteur C agit chez cette espèce comme une C3 convertase dépendante du LPS. En effet, en réponse à la stimulation par le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries à gram négatif, le facteur C contenu dans les hémocytes, enclenche une coagulation de l'hémolymphe et active la conversion de *Tt*C3 en *Tt*C3b [Ariki et al., 2008; Conrad et al., 2006].

De plus, des molécules C3-like ont été mises en évidence chez des cnidaires comme l'anémone de mer *Nematostella vectensis* [Kimura et al., 2009] et le corail *Swiftia exserta* [Dishaw et al., 2005].

D'autres molécules présentent aussi des homologies avec les alpha2-macroglobulines et possèdent le motif thioester, caractéristique fonctionnelle de la molécule C3. En effet, des TEPs (ou thioester containing proteins) ont été identifiées chez la drosophile, *Drosophila Melanogaster* qui ne présente pas de cascade du complément, peut être à cause de sa durée de vie assez courte [Nonaka and Kimura, 2006]. Cependant, ces animaux ont trouvé un autre moyen de défense qui repose sur des peptides antimicrobiens (PAMs) et la phagocytose facilitée par des molécules thioester (TEPs) [Lazzaro, 2008]. Les TEP sont plus proches des alpha2-macroglobulines que des molécules C3, C4 et C5 du complément, mais la présence de telles molécules chez des invertébrés suggère l'existence de voies homologues aux voies alternative et lectinique du complément [Lagueux et al., 2000; Levashina et al., 2001].

I. 2. c. Mise en évidence de molécules apparentées au CAM:

Le complexe d'attaque membranaire est constitué par les composants terminaux du système du complément. Sa formation permet la lyse et l'élimination de l'élément

pathogène en question. Ces protéines partagent plusieurs domaines conservés et notamment le domaine MACP (Membrane Attack Complex/Perforin). Des molécules apparentées aux protéines du CAM ont été caractérisées chez les invertébrés. En effet, une séquence apparentée au C6 a été détectée dans le génome de *Ciona intestinalis*. La protéine correspondante contient le domaine MACP et se caractérise par une fonction de cytolyse [Azumi et al., 2003; Nonaka and Yoshizaki, 2004]. De même, chez l'amphioxus *Branchiostoma belcheri* une protéine AmphiC6 a été mise en évidence à partir d'une banque EST établie a partir de la notochorde de l'amphioxus. Cette protéine contient le domaine conservé MACP mais sa fonction reste encore à clarifier [Suzuki et al., 2002].

Prises dans leur ensemble, ces données montrent clairement la présence de protéines apparentées aux facteurs du complément chez les invertébrés. Ces molécules peuvent appartenir à des voies, alterne ou lectin-like. Leurs fonctions ont été très partiellement étudiées et certains cas d'effets d'opsonisation ont été détectés. Néanmoins, aucune démonstration de cascade complète d'activation n'a été effectuée. Les analyses fonctionnelles chez les invertébrés s'avèrent limitées, notamment chez les acœlomates. Cependant, toutes ces données plaident en faveur de l'existence de facteurs du complément au fil de l'évolution. L'ensemble des données obtenues dans les diverses espèces prises en compte dans la classification phylogénétique des métazoaires (Figure 3), conforte l'idée que le système du complément puisse avoir une origine bien plus ancienne que celle jusque maintenant prévue.

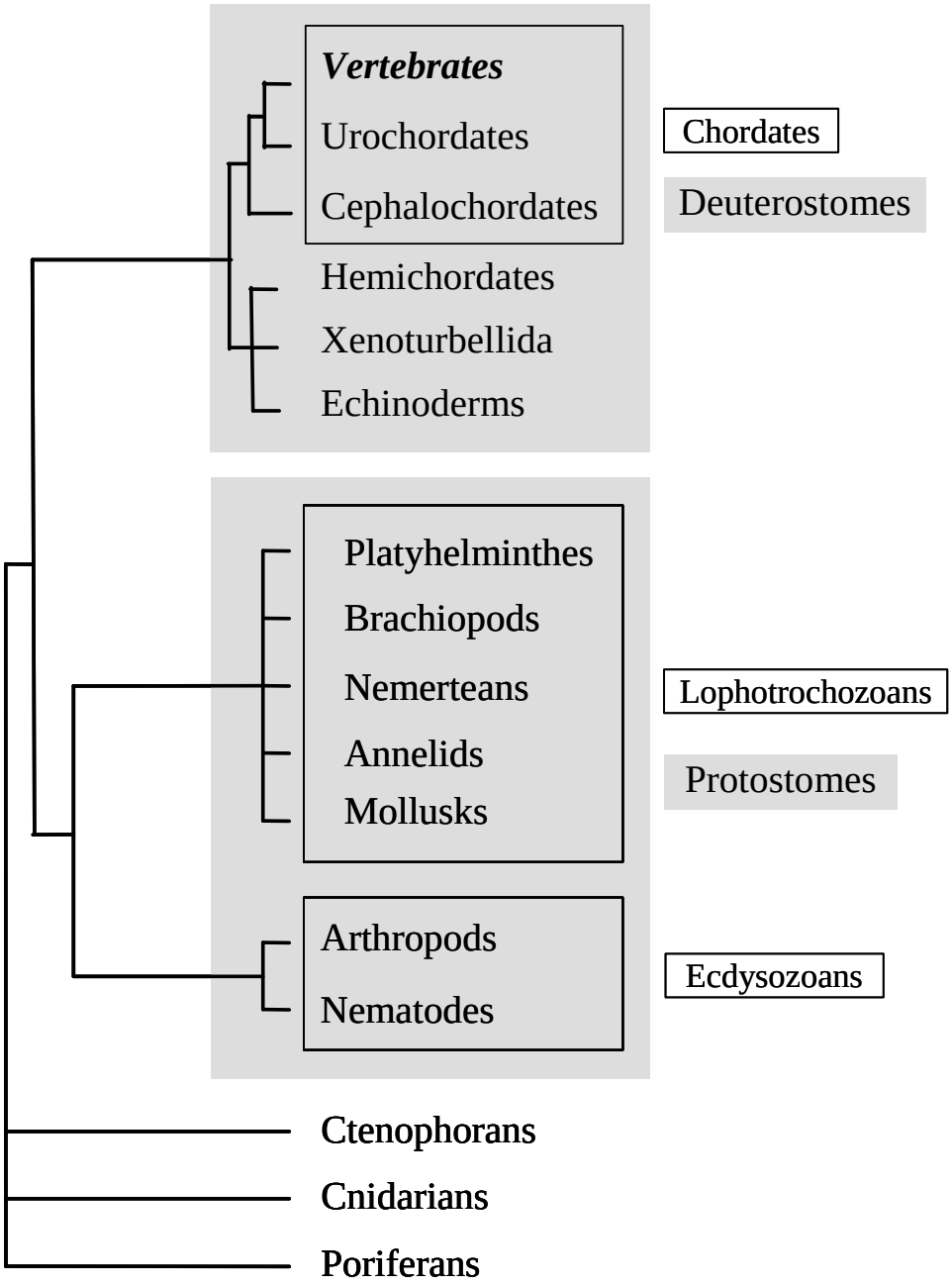


Figure 3: **La classification phylogénétique des métazoaires basée sur les ARN ribosomaux et le gène HOX** [Adoutte et al., 2000]).

II. Complément et système nerveux central (SNC)

Chez les vertébrés on distingue le Système Nerveux Central (SNC) constitué du cerveau, du tronc cérébral, du cervelet et de la moelle épinière, du système nerveux périphérique (SNP) constitué des nerfs sensitifs et moteurs issus de la moelle et du tronc cérébral. Les mécanismes menant à une atteinte du système nerveux et faisant intervenir les molécules du complément sont fort nombreux. Dans la mesure où le SNC représente un site immunoprivilégié, la suite des données présentées concernera préférentiellement le SNC.

II. 1. La barrière hémato-encéphalique (BHE)

La BHE est une barrière physique essentielle pour l'équilibre homéostatique du SNC et pour sa protection contre une éventuelle invasion bactérienne systémique. Elle isole ainsi le SNC du reste de l'organisme. En effet, le cerveau est un organe fragile et les neurones nécessitent un environnement extracellulaire stable pour assurer leurs fonctions. Le SNC est composé d'un nombre restreint de cellules, les neurones et les cellules gliales. Les corps cellulaires neuronaux sont regroupés dans une zone macroscopiquement distincte, la substance grise. Par opposition, la substance blanche comprend les axones. Les cellules gliales sont représentées par trois types cellulaires majeurs: les oligodendrocytes, les astrocytes et les cellules microgliales.

Il existe donc des mécanismes de régulation contrôlant les échanges entre le sang, le liquide céphalo-rachidien et le tissu cérébral [Poirier, 1976] et la BHE joue un rôle essentiel dans ce contrôle. La BHE est constituée par une assise de cellules endothéliales maintenue par des jonctions serrées qui empêchent l'entrée des constituants sanguins solubles ou cellulaires à l'intérieur du SNC. L'endothélium de la BHE entoure la quasi-totalité du SNC [Pachter et al., 2003] et s'interrompt cependant au niveau de certaines régions du cerveau comme les organes circumventriculaires (CVOs), les plexus choroïdes et les leptoméninges. Dans ces régions, l'endothélium vasculaire est fenestré, ce qui permet la diffusion de macromolécules et le passage de cellules immunitaires

périphériques. Cet endothélium est entouré de cellules épithéliales produisant le liquide céphalorachidien [Levine, 1987]. Il est à noter que les prolongements cytoplasmiques de cellules gliales du SNC et les astrocytes, sont associés aux cellules endothéliales et donc participent à la formation de la BHE. Les différents constituants de la BHE sont illustrés dans la figure 4.

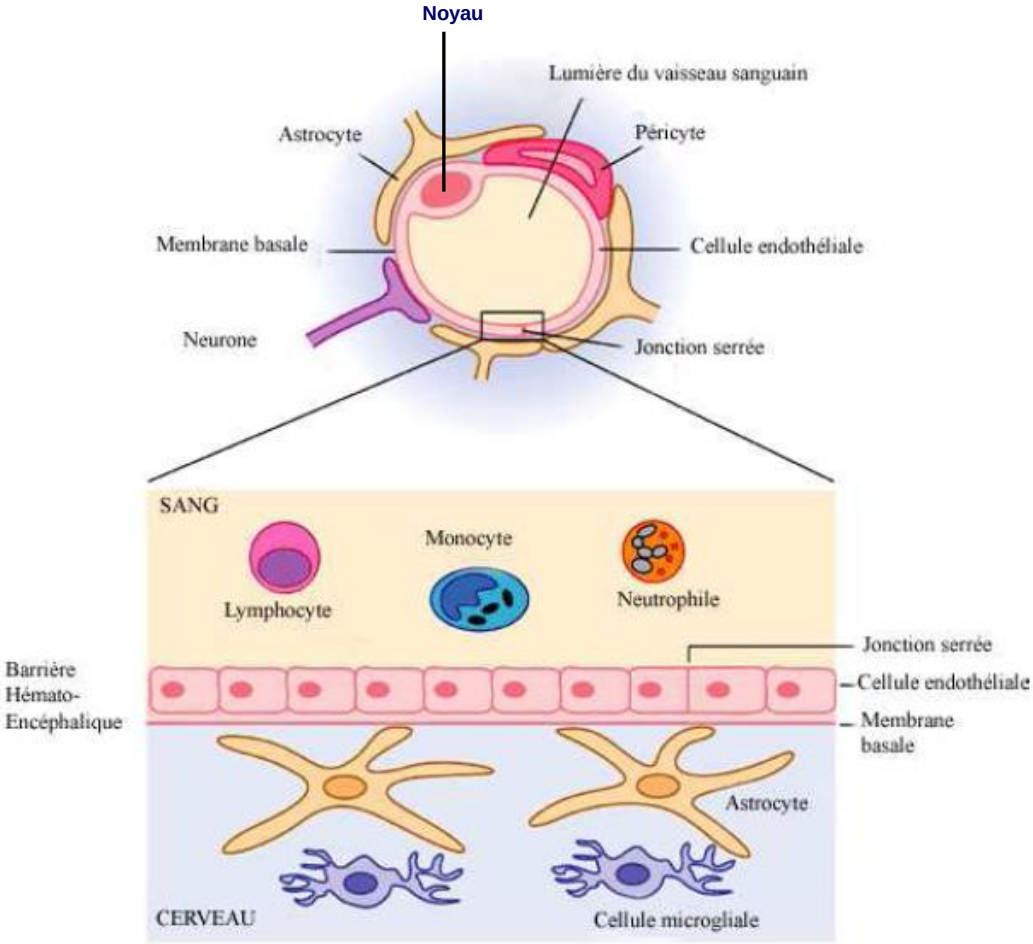


Figure 4: **Aperçu schématique de la barrière hémato-encéphalique.** La barrière hémato-encéphalique est formée par une assise de cellules endothéliales des capillaires sanguins séparées par de jonctions serrées. Les prolongements astrocytaires associés aux cellules endothéliales participent à la formation de la barrière hémato-encéphalique.

II. 1. a. Invasion bactérienne du SNC :

La BHE contribue au maintien de l'intégrité du SNC. Cependant, un grand nombre de pathogènes peuvent l'atteindre et s'y propager et y développer éventuellement une réponse inflammatoire de type neuro-immunologique. Pour parvenir au niveau du SNC les microorganismes empruntent 2 voies principales :

1. La voie paracellulaire:

Une infiltration du SNC par les micro-organismes s'amorce dans les régions non protégées par la BHE et s'étend progressivement à l'ensemble du cerveau lors d'une infection systémique. La réponse immunitaire innée peut alors s'enclencher au niveau du SNC et entraîner une inflammation du parenchyme nerveux passant par une importante production de cytokines proinflammatoires (l'IL-6, le TNFα, l'IL-1α, l'IL-1β et l'IFNγ) [de Vries et al., 1996; Deli et al., 1995; Gloor et al., 1997; Huynh and Dorovini-Zis, 1993]. Sous l'influence de ces facteurs, une ouverture des jonctions serrées peut survenir et la perméabilité de la BHE augmentant, le passage des éléments pathogènes sera alors favorisé [Banks et al., 1993].

2. La voie transcellulaire:

Cependant, certaines bactéries pathogènes peuvent pénétrer le SNC en passant au travers de la BHE saine, suite à une transcytose des cellules endothéliales cérébrovasculaires [Stins et al., 2001]. Des bactéries, telles que *Escherichia coli* ou *Streptococcus pneumoniae* sont capables de passer de la circulation sanguine au SNC tout en respectant l'intégrité de la BHE [Ring et al., 1998; Stins et al., 2001]. Néanmoins, ce passage transcellulaire peut être limité, d'une part par l'activité des cathepsines qui détruisent les bactéries pathogènes au niveau des phagolysosomes et d'autre part, grâce à l'action des astrocytes et des cellules cérébrovasculaires qui empêchent l'infiltration des microorganismes [Bergman et al., 2005; Hao et al., 2001].

II. 1. b. Infection virale du SNC :

Les virus peuvent pénétrer dans le SNC par deux grandes voies principales (1) Par le sang en traversant la BHE ou (2) Par transport axonal rétrograde [Griffin, 1990]. L'entrée par la voie sanguine est la plus répandue.

En ce qui concerne la première modalité de passage, les virus entrent dans le SNC en infectant directement les cellules endothéliales des capillaires sanguins du cerveau. Ainsi, après inoculation intrapéritonéale, le virus Semliki passe du sang au SNC par les cellules endothéliales des capillaires cérébraux [Soilu-Hanninen et al., 1994]. Pour d'autres virus, on note une infection des cellules épithéliales des plexus choroïdes, puis un passage dans le liquide céphalorachidien, comme par exemple le virus Visna [Brahic et al., 1981; Harris et al., 1981].

Le second moyen d'entrée dans le SNC est le transport par voie axonale rétrograde depuis la périphérie, comme par exemple pour l'Herpes Simplex Virus (HSV) [Baringer, 1975a; Baringer, 1975b] et le virus de la rage [Murphy, 1977]. Lors de l'infection naturelle par le virus de la rage (morsure), les premiers sites de réplication du virus sont les myocytes. La réplication active du virus lui permet d'envahir les jonctions neuromusculaires et d'être finalement transporté par voie axonale [Schlitt, 1991], cependant chez la souris, un passage directement dans les terminaisons nerveuses sans multiplication dans le muscle a été rapporté [Coulon et al., 1989].

Ainsi le SNC, isolé par la BHE est un organe qui ne reste pas à l'abri des infections. La lutte contre les pathogènes responsables nécessite, en particulier, la mise en place d'une réponse immunitaire innée efficace et contrôlée. Le système du complément joue un rôle primordial dans cette réponse immunitaire innée contre les pathogènes et dans l'initiation du processus de l'inflammation.

II.2. Complément au niveau du système nerveux des vertébrés (Voir publication 1)

II. 2. a. Système du complément dans la neuroinflammation:

Les travaux de Levi-Strauss et Mallat ont clairement démontré la production des protéines du complément par les astrocytes suite à une stimulation par le LPS [Levi-Strauss and Mallat, 1987]. Depuis, il a été montré que, non seulement les astrocytes, mais aussi les cellules microgliales, les oligodendrocytes et les neurones, correctement stimulées, peuvent exprimer la plupart des protéines du complément pour reconnaître et éliminer les pathogènes tout en préservant les cellules saines au niveau du tissu nerveux [Gasque et al., 2000]. Ceci suggère un rôle neuroprotecteur des protéines du complément qui peuvent néanmoins participer à l'aggravation de différentes maladies neurodégénératives. En effet, le système du complément peut ainsi jouer un double rôle au niveau du tissu nerveux.

II. 2. b. Rôle bénéfique du complément dans le SNC :

Le système nerveux central étant un tissu isolé par la BHE [Coggeshall and Fawcett, 1964; Ehrlich, 1885], la production locale des protéines du complément permet de réagir aux invasions des pathogènes [Alexander et al., 2008; van Beek et al., 2003]. Ces protéines et notamment C1q, une fois secrétées, peuvent parfaitement lier les corps apoptotiques résultant de l'agression des cellules du système nerveux et engager leur élimination par les phagocytes [Francis et al., 2003].

Dans les maladies neurodégénératives l'intervention du système du complément est également notable. En effet, dans la maladie d'Alzheimer, les protéines du complément sont impliquées dans le processus de clairance des neurones dégénérés et des dépôts Aβ [Gasque, 2004] comme le montre l'augmentation de leur expression dans les régions riches en dépôts Aβ [Rogers et al., 2002]. Les cellules microgliales expriment des

récepteurs pour le C1q, ceci leur permet d'interagir avec cette protéine et d'assurer la phagocytose des dépôts Aβ [Webster et al., 2001; Webster et al., 2000].

Par ailleurs, du C1q peut être aussi produit d'une façon transitoire au niveau des neurones postnatals et permettre ainsi l'élimination des mauvaises synapses en cours de développement. Plusieurs études ont clairement illustré le rôle crucial des molécules C1q et C3 dans ce processus épuratif qui s'avère réactivé au cours des maladies neurodégénératives [Stevens et al., 2007; Yuzaki, 2008]. En effet, les souris déficientes en ces protéines du complément, montrent une nette défaillance dans l'élimination des synapses.

Les anaphylatoxines C3a et C5a sont aussi impliquées dans le processus neuroinflammatoire. L'expression de récepteurs pour ces protéines sur les cellules souches neuronales et les neuroblastes permet à ces molécules de moduler l'expression de certaines chimiokines et ainsi de contrôler la réponse immunitaire d'abord pour 'éliminer les pathogènes et ensuite pour assurer la survie neuronale en préservant l'intégrité du système nerveux [Jauneau et al., 2003; Rus et al., 2006; van Beek et al., 2003].

Les protéines de la famille du complément interviennent aussi dans la protection du SNC contre les invasions bactériennes. Ainsi, le complément participe à la défense contre *S. pneumoniæ* au cours d'une infection du système nerveux. Le cerveau s'auto-protège et se met à l'abri des effets délétères que peuvent avoir les excès de production de ces protéines par l'expression de régulateurs spécifiques [Rupprecht et al., 2007].

En résumé, les données rapportées ci-dessus soulignent que les facteurs du complément jouent un rôle bénéfique dans le système nerveux central et veillent à sa protection [Rambach et al., 2008].

II. 2. c. Rôle néfaste du système du complément dans le SNC :

Plusieurs études démontrent des interventions néfastes du complément au niveau du tissu nerveux et en particulier au cours de plusieurs maladies neurodégénératives. En

effet, l'activation du système du complément peut engendrer une réaction inflammatoire chronique [Ramaglia et al., 2008].

Les protéines du complément et notamment les anaphylatoxines secrétées, sont capables de guider les cellules immunitaires dotées de récepteurs spécifiques pour ces protéines vers le site de lésion, et enclencher tout le processus progressif de l'inflammation. Un tel mécanisme est observé pour les cellules dendritiques plasmacytoïdes qui sont recrutées au site de l'inflammation par les anaphylatoxines C3a et C5a [Gutzmer et al., 2006]. Ces anaphylatoxines jouent un rôle primordial dans la neuroinflammation car elles modulent aussi l'expression de plusieurs cytokines proinflammatoires. Il est à noter qu'une production de ces cytokines survient dans la plupart des cas d'atteinte du système nerveux central [Lucas et al., 2006; Rock and Peterson, 2006; Takabayashi et al., 2004].

La protéine C1q du complément peut aussi avoir un rôle néfaste au sein du système nerveux. Dans la maladie d'Alzheimer, une augmentation de l'expression des ARN messagers de C1q a été notée [Loeffler et al., 2008; Speth et al., 2002]. Les cellules microgliales sont activées par des cytokines proinflammatoires et par la présence des dépôts Aβ [Veerhuis et al., 1999; Veerhuis et al., 2003]. Activées, les cellules microgliales produisent du C1q qui interagit avec Aβ et les autres composantes des plaques amyloïdes. En effet, le C1q complexé avec C1r et C1s est capable d'induire une activation du complément et une phagocytose de ces dépôts par la microglie. Cependant, le C1q libre, entraîne l'accumulation des peptides dans les plaques, et ainsi en bloquant l'accès des cellules microgliales aux dépôts Aβ entraîne la mise en route d'un processus létal [Rogers et al., 2002; Webster et al., 2001].

Dans d'autres atteintes du système nerveux, observées au cours de l'ischémie cérébrale ou l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), on remarque également une augmentation de l'expression des facteurs du complément qui aboutit à l'exacerbation la maladie [Pekny et al., 2007]. En ce qui concerne l'EAE, on observe une destruction sélective des neurones et des oligodendrocytes [Minagar et al., 2007; Ramaglia et al., 2008].

Le complément a été également associé à la douleur comme le révèle l'analyse de l'expression des gènes effectuée chez des rats sur lesquels on a provoqué une ligature du nerf spinal. Il a été constaté que plusieurs composants de la famille du complément étaient surexprimés dans les cellules microgliales de la corne dorsale, alors que leurs inhibiteurs comme DAF étaient significativement réduits [Levin et al., 2008; Li et al., 2007].

En résumé, le système du complément semble jouer un double rôle au niveau du SNC des vertébrés comme nous l'avons schématisé dans la figure 5. Son activation est indispensable pour le processus de réparation efficace lors des lésions. Cependant, sa surexpression engendre une inflammation chronique qui peut être délétère. La régulation pourrait conserver le rôle positif du complément au niveau du système nerveux tout en évitant un processus inflammatoire excessif.

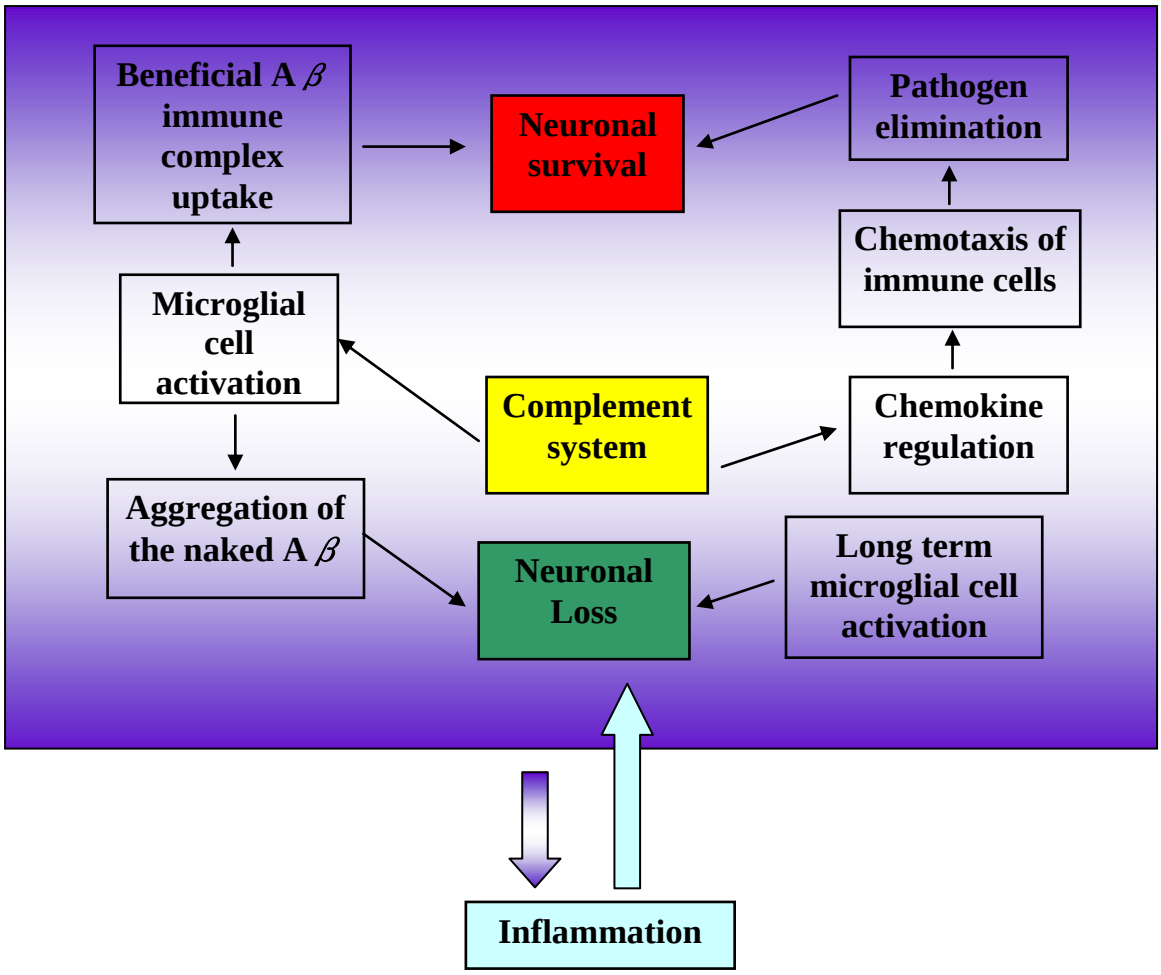


Figure 5: **Diagramme illustrant le double rôle du complément dans le système nerveux central** tel qu'il peut être mis à contribution dans les maladies neurodégénératives (comme la maladie d'Alzheimer) (modifié d'après [Tahtouh et al., 2009a]).

L'activation du complément peut être neuroprotectrice (Neuronal survival) assurant une survie des neurones en régulant la sécrétion des chimiokines qui vont recruter les cellules immunitaires chargées d'éliminer les pathogènes menaçant l'intégrité du SNC. Les protéines du complément peuvent aussi activer les cellules microgliales qui participent à la réduction des plaques amyloïdes dans la maladie d'Alzheimer.

Cependant, l'activation du complément peut être délétère (Neuronal Loss). En effet, le processus inflammatoire crucial à la survie neuronale et mis en place grâce au système du complément, s'il n'est pas contrôlé, peut lui-même induire la perte neuronale.

II.3. Molécules apparentées au C1q : Famille C1qTNF

C1q, la composante essentielle de la voie classique du complément chez les vertébrés, est caractérisée par un domaine gC1q globulaire conservé en C-terminal. Ce domaine globulaire possède une structure trimérique et assure la liaison avec les fragments constants (Fc) des immunoglobulines (IgG1, IgG3, les IgM, et faiblement les IgG2) [Kishore and Reid, 2000]. La structure détaillée de cette molécule est illustrée dans la figure 2.

Le domaine gC1q s'avère être aussi partagé par de nombreuses protéines n'appartenant pas au système du complément [Yuzaki, 2008]. Cette observation a abouti à la naissance d'une famille C1q regroupant toutes ces protéines conservant le domaine globulaire en C-terminal. Ces protéines sont représentées dans la figure 6.

Certaines protéines de la famille C1q possèdent un domaine gC1q ayant une structure similaire au domaine C-terminal de TNF (THD : TNF Homology Domain), d'où l'apparition de la famille C1qTNF, dont les membres possèdent une certaine homologie structurale avec TNF malgré la divergence dans d'autres aspects fondamentaux. En effet, les séquences des molécules de la famille C1q et celles de la famille TNF sont très peu conservées. De plus, les deux domaines, gC1q et THD de la famille TNF, ne se lient pas aux mêmes récepteurs. Le domaine globulaire gC1q peut lier le récepteur gC1qR. Le domaine C-terminal des protéines de la famille TNF, quant à lui, il sert de liaison aux domaines riches en cystéines CRDs (Cysteine- Rich domains) des récepteurs TNFs [Kishore and Reid, 2000].

Parmi les protéines appartenant à la famille hétérogène C1qTNF, l'adiponectine. Cette dernière est secrétée par le tissu adipeux et partage d'une part, son domaine gC1q et les répétitions Gly-X-Y au niveau du domaine collagène avec la famille C1q et d'une autre part, la ressemblance structurale de son domaine C-terminal avec la famille TNF [Schaffler et al., 2007]. Des protéines ayant les mêmes caractéristiques que l'adiponectine avec peu d'homologies structurales, ont été intitulés les C1qTNF related proteins (CTRPs) ou paralogues de l'adiponectine [Lasser et al., 2006; Lee et al., 2010].

Protein	Tissues of origin and presentation	References
ACRP30 (adiponectin)	Serum protein produced by adipocytes: 5–10 μg/ml in normal plasma.	[Berg et al., 2002; Scherer et al., 1995; Yamauchi et al., 2001; Yokota et al., 2000]
C1q	Serum protein produced by the liver: 70 μg/ml.	See part II.2
EMILIN-1 (Elastin microfibril interface-located protein)	Connective tissue, blood vessels, skin, heart, lung, kidney, cornea, small intestine, aorta, uterus and appendix; fetal heart and lungs.	[Doliana et al., 1999]
EMILIN-2	Fetal heart and adult lung; intermediate levels in peripheral leukocytes, placenta and spinal cord; major component of the cochlear basilar membrane in the mouse.	[Doliana et al., 2001]
EMILIN-3 (multimerin 2)	Blood vessel endothelial cell surface including capillaries, veins, arterioles and muscular arteries.	[Christian et al., 2001]
EMILIN-4 (multimerin 1)	Platelet α-granules, endothelial cell Weibel–Palade bodies, megakaryocytes, platelets, endothelium and subendothelium of blood vessels; placenta, lung and liver.	[Hayward et al., 1995]
HP-20, -25, -27 (hibernation protein of Siberian chipmunk)	Plasma protein produced by the liver.	[Kondo and Kondo, 1992; Takamatsu et al., 1993]
Precerebellin	Expressed in the cerebellum associated with postsynaptic structures of the Purkinje cell membrane and the dorsal cochlear nucleus; brain.	[Pang et al., 2000; Urade et al., 1991]
Saccular collagen	Produced by specialized secretory-supporting cells at the outer perimeter of the saccular macula; also found in saccular otolithic membrane.	[Davis et al., 1997; Davis et al., 1995]
Collagen VIII	Produced by endothelial cells; major constituent of Descemet's membrane (specialized basement membrane of corneal endothelial cells); optic nerve, aorta, umbilical cord and tissues undergoing remodeling; calvarium, eye and skin.	[Greenhill et al., 2000; Yamaguchi et al., 1989]
Collagen X	Produced by hypertrophic chondrocytes in the epiphyseal growth plate of long bones, ribs and vertebrae during endochondral bone formation, bone fracture callus and osteoarthritic cartilage.	[Bogin et al., 2002; Dublet et al., 1999; Zhang and Chen, 1999]
CORS26 (CTRP3) (collagenous repeat containing sequence)	Prechondrocytes in developing cartilage; colon, small intestine, placenta, fibroblasts, white adipose tissue, blood and kidney; osteosarcoma, chondroblastoma and giant cell tumors.	[Maeda et al., 2001; Schaffler et al., 2003]
CTRP1	A vascular wall protein preadipocytes and upregulated dramatically in rat adipose tissue.	[Schaffler et al., 2007]
CTRP5	Retinal epithelium, lung, placenta, cerebrum and liver.	[Hayward et al., 2003]
CTRP6	Skeletal muscle cells, monocytes.	[Schaffler et al., 2007]

Figure 6: Tableau regroupant **les principales protéines possédant le domaine gC1q**, leur tissu d'origine et leur présentation (modifié d'après [Kishore et al., 2004]).

Au final, toutes ces protéines appartiennent à une seule grande famille encore plus large que la famille TNF (19 membres), qui est la famille C1q (32 membres chez les humains et 29 chez la souris) et possèdent toutes le domaine gC1q. Celles-ci sont schématisées ci-dessous dans la figure 7.

Plus récemment, il a été observé chez les vertébrés (en particulier homme et souris) que certaines molécules de la famille C1q sont sélectivement exprimées au niveau du système nerveux central et il a été proposé de les rassembler dans la famille des « cérebellines » [Yuzaki, 2008]. En ce qui concerne le cas de la sous-famille (Cbln), cette dernière est formée de 4 membres (Cbln1→Cbln4). Ces quatre molécules contiennent le domaine globulaire C1q mais sont dépourvues du domaine collagène (Figure 6). Cbln1 est exprimée au sein des cellules granulaires du cervelet. Chez les souris Cbln1$^{-/-}$, on remarque une réduction significative des synapses entre les axones des cellules granulaires et les cellules de Purkinje. De plus, on observe une altération de la longueur des zones postsynaptiques où se trouvent les récepteurs au glutamate. Ces dernières deviennent plus longues que les zones présynaptiques actives libérant le glutamate ; ceci comparativement aux souris de type sauvage où les deux zones sont de la même longueur. Ainsi Cbln1 semble assurer deux fonctions majeures : (1) La formation et la stabilisation du contact synaptique entre les cellules granulaires du cervelet (les axones des cellules granulaires) et les cellules de Purkinje. (2) La régulation de l'endocytose postsynaptique en veillant ainsi à la plasticité synaptique. Cbln1 et les autres membres de la sous-famille peuvent former des hétéromères et agir ensemble au niveau du SNC mais l'homomère Cbln1 reste le plus secrété (Figure 7) [Bao et al., 2005; Yuzaki, 2008]. Cbln1 s'avère donc jouer un rôle primordial dans le SNC. Cependant, plusieurs questions restent encore à élucider surtout concernant la sécrétion des molécules Cblns, leur élimination des synapses et aussi la nature de leurs récepteurs.

En conclusion de ces observations récentes, ces protéines appartenant à la même famille C1qTNF peuvent représenter de nouvelles cytokines capables de réguler certaines fonctions au sein du SNC.

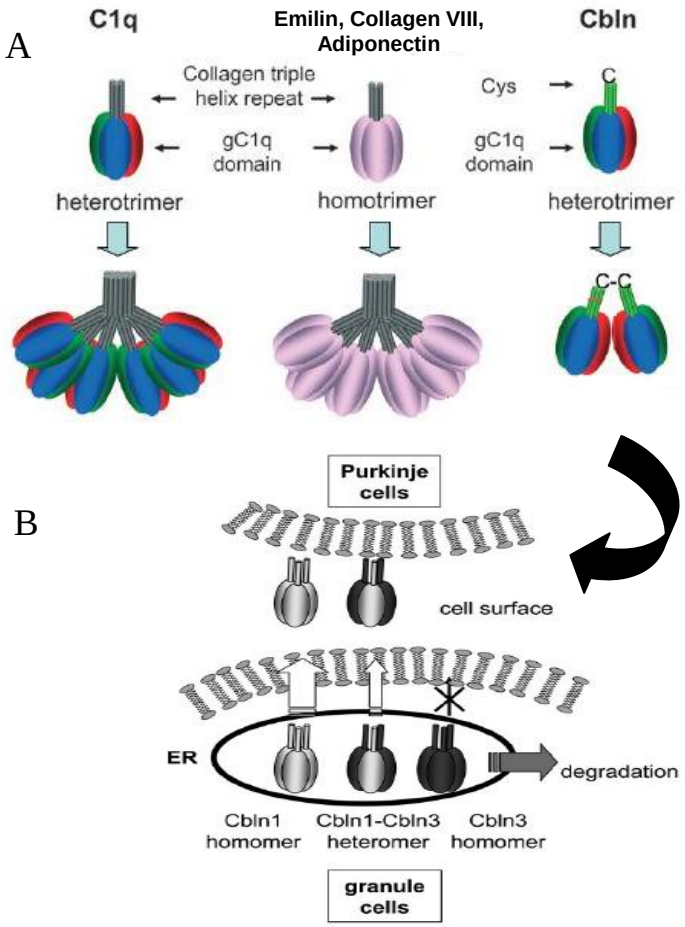


Figure 7: **La vaste famille des molécules apparentées au C1q.** (A) Structure des principales protéines de la famille C1q (modifié d'après [Yuzaki, 2008]). C1q et Cbln forment des hétéromères alors que d'autres protéines de la même famille se présentent sous forme d' homomères (Emilin, Collagen VIII, Adiponectin…). Le domaine collagène et les résidus de cystéines en N-terminal contribuent à la formation des complexes. (B) Modèle de l'interaction entre Cbln1 et Cbln3 (modifié d'après [Yuzaki, 2008]). Les homomères Cbln1 sont sécrétés de manière efficace et atteignent les cellules de Purkinje, alors que les homomères Cbln3 sont conservés dans le réticulum endoplasmique (ER) et se dégradent rapidement dans les cellules granulaires. Cbln1 forme aussi un hétéromère avec Cbln3, mais cela peut prendre plus longtemps que la formation d'un homomère et l' hétéromère résultant peut ne pas être sécrété de manière efficace.

II.4. Complément au niveau du système nerveux des invertébrés (voir publication 2)

Chez les invertébrés, les éléments du système du complément ont été surtout mis en évidence au niveau des tissus périphériques des invertébrés, comme cela a été mentionné dans la partie I.2. Cependant, jusqu'à maintenant, aucune démonstration directe de l'existence d'une cascade d'activation du complément n'a été réalisée et décrite. De plus, pratiquement aucune information n'a été délivrée sur un rôle précis de facteurs du complément au niveau du système nerveux des invertébrés.

Cependant quelques études de neurobiologie ont été entreprises chez certains modèles d'invertébrés, comme *D. melanogaster* et *C. elegans* et la recherche de molécules de l'immunité au sein du système nerveux a quelquefois abouti. Par exemple, chez la drosophile, une éventuelle relation entre système nerveux et système immunitaire a été rapporté. Ainsi, la molécule archétype Toll de la drosophile semble ne pas servir seulement à l'établissement d'une polarité dorsoventrale mais intervient aussi dans la formation de synapses [Larsen et al., 2007]. De plus, dans ce modèle de la drosophile, il a été clairement montré que les mécanismes régulant l'activité de la gamma-sécrétase, qui participe à la formation des complexes de haut poids moléculaire de présénilines, sont conservés chez la drosophile et les mammifères. Ceci est important pour les études concernant la maladie d'Alzheimer, étant donné que les mutations au niveau des gènes de la préséniline contribuent aux premières phases de cette pathologie neurodégénérative [Takasugi et al., 2002].

Le nématode *C. elegans* a permis aussi récemment d'obtenir des données intéressantes sur le système nerveux et son éventuelle altération chez l'Homme [Aschner et al., 2010]. En effet *C. elegans* a un génome qui présente beaucoup d'homologie avec celui des mammifères. Des nématodes transgéniques exprimant, soit la forme native, soit la forme mutée de l'alpha-synucléine humaine au niveau de leurs neurones dopaminergiques ont permis de constater que les vers exprimant la molécule mutée présentaient des perturbations neurologiques similaires à celles observées dans la maladie

de Parkinson [Kuwahara et al., 2006]. En ce qui concerne, le syndrome de Down relié à la trisomie 21, des expériences menées avec des vers nématodes surexprimant la kinase DYRK1A ont démontrées que cette protéine avait un rôle dans les mécanismes de chimiotactisme lié à l'olfaction et par conséquent altérer de manière irréversible les fonctions des neurones concernés [Raich et al., 2003].

Parmi les autres modèles possibles, il faut encore signaler certains mollusques et notamment l'aplysie qui avait été largement utilisée pour élucider les mécanismes de transmission nerveuse. Plus récemment dans la mesure où l'aplysie présente des neurones plus larges que ceux de *D. melanogaster* et *C. elegans* et que son SNC est relativement plus simple, ce mollusque a été l'objet de nouvelles études sur les mécanismes de réparation nerveuse. Les homologies de séquences entre les gènes d'aplysie et ceux des mammifères étant plus élevées que celles de *D. melanogaster* et *C. elegans,* des approches expérimentales visant à surexprimer des molécules humaines ont permis récemment d'envisager la caractérisation de molécules spécifiquement impliquées dans les maladies neurodégénératives [Walters and Moroz, 2009].

Ces données montrent que le système nerveux des modèles invertébrés peut être un outil intéressant pour essayer de mieux comprendre certains mécanismes immunologiques de base qui participent à sa protection. Récemment, dans le modèle *C. elegans*, il a été rapporté que la production de peptides anti-microbiens était sous le contrôle d'éléments du système nerveux. En effet, après infection cutanée par un champignon, *C. elegans* produit des peptides anti-microbiens au niveau de son épiderme. L'analyse des mécanismes conduisant à cette réaction a clairement montré l'implication de deux voies distinctes, l'une faisant intervenir la cascade cellulaire p38, l'autre nécessitant la participation d'une molécule apparentée au TGF-β présent au niveau du système nerveux [Zugasti and Ewbank, 2009].

Par contre, alors que l'on sait que les facteurs du complément ont un rôle déterminant dans l'évolution des maladies neurodégénératives, aucune étude n'a évoqué le rôle du complément au niveau du système nerveux des invertébrés.

III. Cellules microgliales et mécanismes de protection du système nerveux

III. 1. Système nerveux et cellules microgliales chez les vertébrés

Dans le SNC, les cellules microgliales représentent la principale population phagocytaire mononucléaire résidente du SNC [Lawson et al., 1992; Streit et al., 1999]. Elles jouent un rôle primordial dans le maintien de l'intégrité et de l'homéostasie du SNC et représentent la voie effectrice de l'immunité innée dans le parenchyme cérébral [Aloisi, 2001; Hanisch, 2002]. Des cellules microgliales ont été décrites par plusieurs auteurs incluant Nissl [Nissl, 1899], Robertson [Robertson, 1900] et Alzheimer [Alzheimer, 1904]; elles ont été appelées « microgliales» pour la première fois dans le système nerveux central de la sangsue par del Rio- Hortega [del Rio-Hortega, 1932].

En conditions normales physiologiques, ces cellules sont sous forme quiescentes ou « ramifiées » et deviennent « activées » en cas de lésion ou d'infection par des microorganismes, ce qui fait de ces cellules des « censeurs » du cerveau [Kreutzberg, 1996]. Elles possèdent des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles communes avec les macrophages [Streit and Kreutzberg, 1987]. Pour ces raisons, elles ont été proposées comme la première ligne de défense du SNC en cas d'invasion par des microorganismes pathogènes [Kielian, 2004; Kreutzberg, 1996]. Les cellules microgliales adoptent donc différentes morphologies selon leur état fonctionnel et leur phase de développement.

III. 1. a. Morphologie des cellules microgliales :

Les cellules microgliales sont caractérisées par une hétérogénéité morphologique. En effet, on peut observer des cellules microgliales amiboïdes foetales, les cellules adultes ramifiées, les cellules microgliales activées et des cellules microgliales sénescentes.

Les cellules microgliales amiboïdes :

Au cours du développement du système nerveux (neurogénèse), les cellules progénitrices migrent vers le SNC et se différencient en cellules microgliales « amiboïdes », du fait de leur morphologie aplatie présentant quelques pseudopodes. Cette population passagère est présente du stade prénatal jusqu'au début du stade post-natal. Leur apparition avant les vaisseaux sanguins et leur association étroite à ceux-ci dans une greffe neurale suggèrent qu'elles pourraient aussi intervenir dans la vascularisation du système nerveux central [Pennell and Streit, 1997]. En fait, les cellules microgliales amiboïdes semblent jouer un rôle important dans le développement du cerveau en participant activement à l'élimination des neurones dégénérés. Il est à noter que l'activité de phagocytose des cellules microgliales amiboïdes est supérieure à celle des cellules microgliales ramifiées. En effet, l'expression des récepteurs spécifiques de la phagocytose, comme le CR3 ou le CD 64, est régulée négativement lors du passage des cellules microgliales de l'état amiboïde à ramifié [Ling et al., 1990; Rezaie and Male, 1997].

Les cellules microgliales ramifiées:

Au stade adulte, une grande majorité de ces cellules subit un changement morphologique en donnant des cellules « ramifiées primitives » évoluant ensuite en cellules microgliales « ramifiées ». Contrairement aux cellules microgliales amiboïdes qui sont mobiles, les cellules microgliales « ramifiées » semblent immobiles et quasi-quiescentes [Hanisch and Kettenmann, 2007]. En réalité, des travaux récents de [Nimmerjahn et al., 2005], utilisant une technologie d'imagerie en temps réel, montrent très clairement que, contrairement à leur corps cellulaire plus ou moins statique, leurs prolongements cytoplasmiques sont en perpétuel mouvement et sondent en permanence leur microenvironnement. D'un point de vue phénotypique, les cellules microgliales « quiescentes » se caractérisent par une expression faible du CD11b, du marqueur leucocytaire CD45, et n'ont pratiquement de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II. Assurant ainsi une fonction d'immunosurveillance du parenchyme nerveux, elles pourront très rapidement être **activées** à la moindre

perturbation de celui-ci et participer à l'initiation de la réponse inflammatoire [Hanisch and Kettenmann, 2007; Ladeby et al., 2005].

Les cellules microgliales activées:

Une fois activées, les cellules microgliales perdent progressivement leurs prolongements cytoplasmiques et présentent une hypertrophie de leur corps cellulaire. Elles expriment plus fortement les molécules CD11b et CD45 ainsi que des molécules nécessaires à une présentation antigénique efficace dont les molécules du CMH II. Par ailleurs, elles peuvent secréter un éventail de facteurs susceptibles de réguler la réponse immunitaire (cytokines pro- ou anti-inflammatoires, facteurs cytotoxiques ou neurotrophiques) [Aloisi, 2001; Hanisch and Kettenmann, 2007]. Il est intéressant de noter que cette activation peut être transitoire et des cellules microgliales activées peuvent retourner à l'état quiescent lorsque le stimulus cesse.

Les cellules microgliales sénescentes:

Dans leur ultime stade de suractivation, qui peut être atteint en particulier dans le cas de neurodégénérescence intense, les cellules microgliales présentent une morphologie hypertrophiée avec éventuellement de rares prolongements épais. Conservant les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles du stade précédent, elles ont une activité phagocytaire intense. Cependant, elles seront éliminées par un mécanisme d'apoptose induit par leur sur-activation [Jung et al., 2005]. La microglie évolue également en dehors de toute pathologie avec l'âge de l'individu [Streit, 2006], et ainsi peut présenter un phénotype et une morphologie altérée. Les conséquences d'une telle transformation ne sont pas connues mais il est possible que cette sénescence microgliale favorise l'apparition des maladies neurodégénératives liées à l'âge, étant donné le lien très étroit existant entre cellules microgliales et neurones. Les différents stades d'activité des cellules microgliales sont résumés dans la figure 8.

III. 1. b. Mobilisation et activation des cellules microgliales :

Quelle que soit la perturbation touchant le système nerveux central, l'une des principales caractéristiques est la réponse rapide des cellules microgliales, qui possèdent

de très nombreux récepteurs à diverses molécules activatrices. Il existe deux types principaux de signaux pour activer les cellules microgliales: 1. Des molécules qui ne sont pas habituellement présentes ou le sont à de faibles concentrations critiques, 2. La détection d'un dysfonctionnement neuronal, comme cela est observé pour les récepteurs aux neurotransmetteurs ou au CD200R [Hanisch and Kettenmann, 2007]. Ainsi les cellules microgliales activées se dirigeront alors vers le site de la lésion, pourront proliférer et participer à la réparation des tissus tout en induisant une réaction immunitaire protectrice, en participant à la phagocytose des éléments étrangers et des cellules neuronales apoptotiques ou endommagées [Aloisi, 2001; Hanisch, 2002]. De plus, comme elles sont capables d'éliminer les neurones endommagés elles favorisent la régénération nerveuse [Hanisch and Kettenmann, 2007]. En résumé, les cellules microgliales s'accumulent au niveau du site de lésion en sécrètant différentes substances bioactives soit proinflammatoires [Deininger et al., 2002; Sarchielli et al., 1997], cytotoxiques soit neuroprotectrices [Elkabes et al., 1996; Zietlow et al., 1999], elles contribuent en fonction de la nature du stimulus, à assurer l'intégrité du système nerveux.

Récepteurs impliqués dans l'activation des cellules microgliales :

La reconnaissance et l'élimination des corps étrangers par les cellules microgliales fait intervenir diverses structures réceptrices. Les principales structures sont détaillées ci-dessous et présentées schématiquement dans la figure 9.

Les récepteurs d'épuration (« scavenger receptors », SR)

Ils permettent la reconnaissance et l'élimination des lipoprotéines modifiées mais également de cellules apoptotiques, de bactéries ou encore de substances telles que le peptide A*β*, généré lors de la maladie d'Alzheimer [Mukhopadhyay and Gordon, 2004; Peiser et al., 2002]. Les cellules microgliales expriment la plupart des récepteurs suivants : (SR-A ; SR-BI ; CD36, RAGE pour « receptor for advanced glycation end products » ; LRP pour « low density lipoprotein receptor-related protein » ; MARCO pour « macrophage receptor containing a collagenous domain ») [Alarcon et al., 2005]. Cependant, même si la plupart sont constitutivement exprimés par la microglie néonatale, d'autres comme SR-A et SR-BI sont moins exprimés à l'âge adulte et ne sont ré-induits

qu'en cas d'inflammation. Les conséquences de l'engagement des récepteurs d'épuration sur les cellules microgliales restent encore mal caractérisées néanmoins le peptide Aβ à l'origine des plaques amyloïdes caractéristiques de la maladie d'Alzheimer est reconnu et internalisé par la microglie par l'intermédiaire de récepteurs d'épuration [Husemann et al., 2002]. Le récepteur MARCO quant à lui, en plus de fonctions d'internalisation, interviendrait également dans le changement de morphologie des cellules microgliales après leur activation [Granucci et al., 2003].

Les récepteurs de la famille Toll (« Toll like receptors » TLRs)

Dans les cellules microgliales, les TLR 1 à 9 semblent être exprimés constitutivement [Jack et al., 2005], même si leur niveau d'expression est fort variable. Les agonistes des TLR sont des activateurs efficaces des cellules microgliales, en particulier le poly I:C (agoniste du TLR3), le LPS (lipopolysaccharide, agoniste du TLR4) et le CpG (agoniste du TLR9) qui vont induire la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que le tumor necrosis factor-α (TNF-α) ou l'interleukine-1β (IL-1β), mais également du monoxyde d'azote (NO) ou encore favoriser la fonction de présentation antigénique de la microglie[Dalpke et al., 2002; Olson and Miller, 2004].

Les récepteurs du complément

Les cellules microgliales peuvent être activées par les voies de signalisation médiées par ces récepteurs. En effet, les cellules microgliales expriment constitutivement les récepteurs pour certains facteurs du complément (CR) 1, 3 et 4, et leur niveau d'expression augmente après activation [Rotshenker, 2003]. Le CR3 (CD11b/CD18), souvent utilisé pour marquer les cellules microgliales *in situ* chez la souris, permettrait par ailleurs une reconnaissance directe de certains motifs bactériens tels que le LPS [Ehlers, 2000] et par conséquent une activation rapide des cellules l'exprimant. Le récepteur de C1q (C1qRp) et des récepteurs pour des fragments constants des immunoglobulines comme Fcγ RI, RII, RIII est également exprime à la surface des cellules microgliales [Aloisi, 2001].

Activation des cellules microgliales par les cytokines :

L'activation des cellules microgliales est finement régulée par les cytokines présentes dans leur environnement. Ces cellules expriment un éventail large de récepteurs pour les cytokines; des récepteurs pour des cytokines proinflammatoires (INF-ɤ R, TNFRI, TNFRII, IL-1RI), et pour des cytokines anti-inflammatoires (IL-4R, IL-10R, IL- 13R, TGF-βRI, TGF-βRII) sont ainsi présents et assurent ainsi une balance des fonctions de la microglie [Aloisi, 2001]. Parmi les différentes cytokines (Figure 10), capables d'activer la microglie, l'IFN-γ a été particulièrement étudié. Il permet d'augmenter l'expression des molécules du CMH I et II, des costimulateurs CD80 et CD86, des récepteurs du complément, de molécules d'adhérence comme ICAM-1 à la surface de la microglie et potentialise donc leurs fonctions de présentation d'antigènes et de phagocytose. L'IFN-γ entraîne également la synthèse d'autres cytokines par la microglie comme le TNF-α ou l'IL-6 et contribue donc à créer une cascade inflammatoire lors d'une infection. Les cellules microgliales sont également sensibles à certains facteurs de croissance hématopoïétiques comme le M-CSF, le GM-CSF ou l'IL-3 qui leur permettent soit de proliférer, soit d'acquérir plus facilement des fractions de cellules présentatrices d'antigène [Aloisi et al., 2000; Fischer et al., 1993; Re et al., 2002] comme cela a été observé pour les cellules dendritiques myéloïdes [Ponomarev et al., 2005].

III. 1. c. Fonctions des cellules microgliales :

Les cellules microgliales, cellules présentatrices des antigènes (CPAs) :

Les cellules microgliales sont considérées comme les principales cellules immunocompétentes résidentes du système nerveux central. Elles sont capables de présenter l'antigène aux lymphocytes T naïfs. Le contact initial entre le complexe CMH classe II/peptide et le TCR (T cell receptor) ainsi qu'entre les molécules costimulatrices B7 et CD28 serait de faible affinité, les molécules à la surface de la microglie quiescente ou sentinelle n'étant que faiblement représentées. Cette interaction entraîner la sécrétion autocrine de TNF-α par la microglie puis d'IL-12 permettant alors la différentiation du lymphocyte T en Th1. Une activation optimale de la microglie par l'intermédiaire de l'interaction entre les molécules CD40 et CD40-L exprimés par les cellules microgliales,

permettant la prolifération du lymphocyte T a été décrite [Becher et al., 2000; Ponomarev et al., 2006]. De plus, il a été suggéré l'existence de sous-population de cellules microgliales capables de présenter l'antigène soit aux lymphocytes T $CD4^+$ soit aux lymphocytes T $CD8^+$ [Walker et al., 2000].

Les cellules microgliales impliquées dans la phagocytose :

La phagocytose est un mécanisme important et nécessaire pour l'élimination des micro-organismes et/ou des déchets issus de la réaction inflammatoire ainsi qu'en conditions physiologiques pour l'élimination des cellules mortes avant leur nécrose. Chez l'adulte, les cellules microgliales, comme les macrophages, sont capables de phagocytose, même si cette fonction est atténuée chez la microglie quiescente. En cas d'inflammation, en revanche, cette capacité est amplifiée suite à l'expression plus forte les récepteurs d'épuration de type SR-A et le récepteur au complément CR3 [Reichert and Rotshenker, 2003]. Cependant, cette fonction peut s'avérer néfaste comme lors de la phagocytose de myéline qui abouti à la présentation antigénique de la myéline dans la sclérose en plaques [Smith, 2001].

Les cellules microgliales dans la sécrétion des cytokines :

Pour communiquer entre elles et réguler les réponses inflammatoires, les cellules immunitaires utilisent des facteurs solubles que sont les cytokines. Les cellules microgliales sont ainsi capables de sécréter tout un éventail de cytokines aussi bien pro- que anti-inflammatoires, ou encore des facteurs cytotoxiques ou neurotrophiques. La microglie est aussi capable de répondre aux effets de certaines cytokines grâce à l'expression des récepteurs spécifiques comme précédemment détaillé dans l'activation des cellules microgliales par les cytokines au niveau de la partie III. 1. b.

Rôle des cellules microgliales dans la lésion et les maladies neurodégénératives :

L'activité des cellules microgliales a longtemps été considérée comme néfaste vis-à vis des neurones. Cependant, une idée de plus en plus répandue est que finalement, les cellules microgliales seraient fondamentalement neuroprotectrices et que seule leur suractivation ou leur dysfonctionnement pourrait entraîner des dommages neuronaux

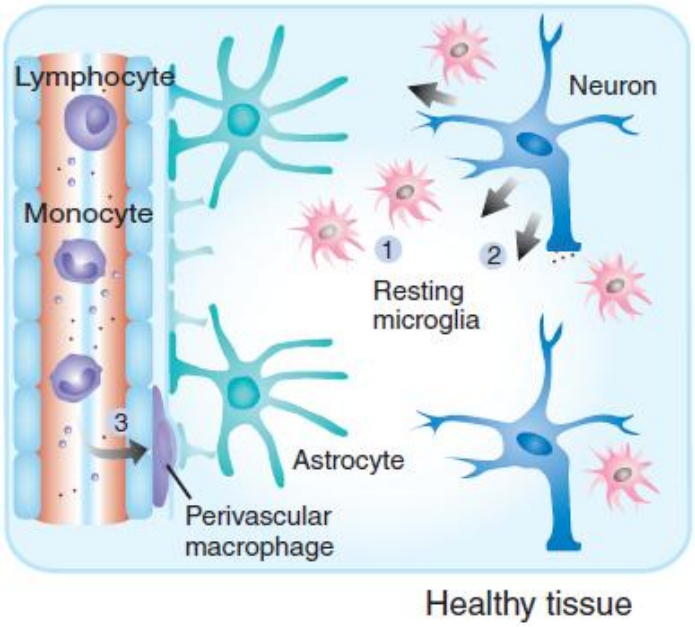
[Polazzi and Contestabile, 2002]. En effet, les relations entre cellules microgliales et neurones, longtemps ignorées, ont pourtant un rôle crucial dans la physiologie de ces deux types cellulaires qui sont en relation étroite et communiquent par des jonctions gap [Dobrenis et al., 2005]. Plusieurs études ont mis en relief l'interaction entre la microglie et les neurones. En effet, dans un modèle de culture d'agrégats cellulaires, le milieu conditionné de cellules microgliales activées par le LPS favorise la migration et la différenciation des précurseurs neuronaux [Aarum et al., 2003]. De plus, après ischémie cérébrale ou lésion de la moelle épinière, les neurones sont protégés ou repoussent mieux après greffe de cellules microgliales [Kitamura et al., 2004; Rabchevsky and Streit, 1997]. Ces fonctions bénéfiques pourraient s'expliquer par la sécrétion microgliale de facteurs neurotrophiques lors d'une inflammation [Heese et al., 1998]. bNGF (« nerve growth factor »), NT-3, NT-4/5 (neurotrophines 3, 4, 5), BDNF (« brain derived neurotrophic factor »), GDNF (« glial cell derived neurotrophic factor ») ont ainsi été décrits dans les cellules microgliales [Batchelor et al., 1999; Nakajima et al., 2001].

Les cellules microgliales sous le contrôle des neurones restent dans leur état quiescent. La rupture de l'interaction entre le récepteur neuronal CD200 et son ligand microglial entraînerait l'activation de la microglie. Une fois activées, les cellules microgliales tentent de protéger les neurones lésés en formant une barrière autour d'eux et de favoriser leur réparation en secrétant des facteurs neurotrophiques, aidées en cela par les astrocytes.

En cas d'échec ou d'environnement très inflammatoire, elles atteignent un stade d'activation plus important susceptible de causer des dommages collatéraux. En effet, elles peuvent contribuer à endommager le SNC. Une activation excessive ou chronique des cellules microgliales est impliquée dans un certain nombre de maladies neurodégénératives. En effet, dans la maladie d'Alzheimer, la suractivation des cellules microgliales aboutissant à une inflammation chronique s'avère délétère [Webster et al., 2001; Webster et al., 2000]. C1q, le premier élément de voie classique du complément, peut servir de marqueur fiable de l'activation microgliale allant de niveaux indétectables de la biosynthèse de C1q dans la microglie résidente à une forte expression de C1q dans les microglies activées, non ramifiées. C1q synthétisé et libéré par la microglie activée

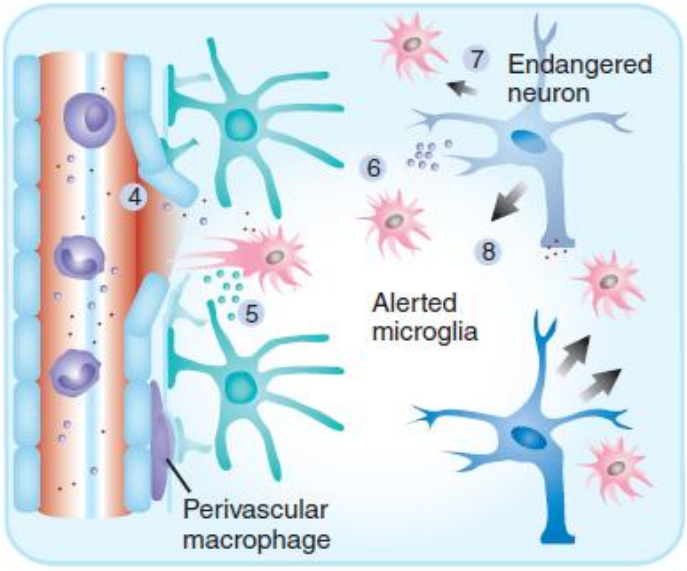
joue un rôle clé autocrine / paracrine de manière à maintenir l'équilibre dans le SNC endommagé [Farber et al., 2009]. Le C1q se retrouve ainsi indissociable de la microglie au niveau du système nerveux central où il contribue à son activation et à son accumulation au sein du site de lésion.

Figure 8: **Etats d'activation de la microglie** (d'après [Hanisch and Kettenmann, 2007])



1. <u>Dans une situation de tissu sain :</u>

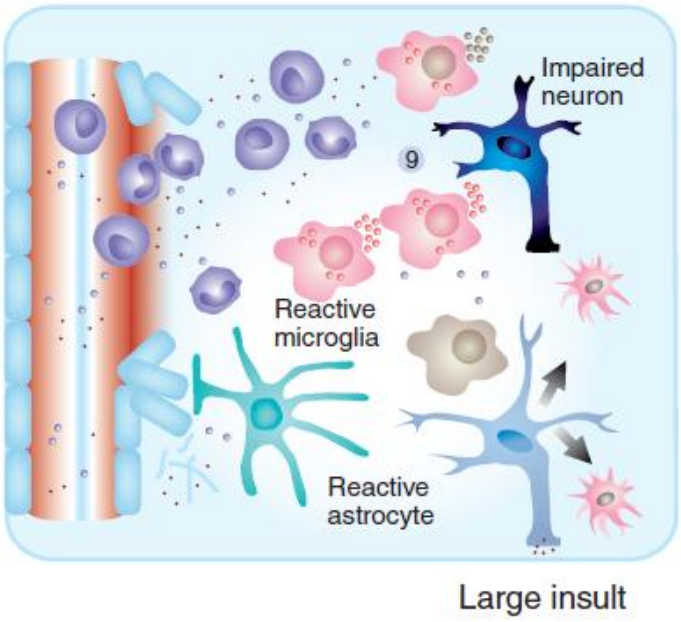
Les cellules microgliales dans les tissus normaux surveillent en permanence leur environnement (1). La « microglie au repos » est en réalité une « microglie en surveillance ». Equipées de récepteurs pour une multitude de molécules, elles peuvent immédiatement recevoir des signaux consécutifs à une perturbation de l'intégrité structurale et fonctionnelle. Les neurones délivrent également des signaux qui maintiennent la microglie dans ce mode de surveillance, indiquant un état de fonctionnement normal (2). Outre les microglies du parenchyme, il ya aussi des macrophages périvasculaires dans une association plus étroite avec les vaisseaux sanguins (3). Les monocytes peuvent servir de « pool » de précurseurs des cellules microgliales du parenchyme.



Small local damage

2. <u>Dans une situation de légers dommages :</u>

Suite à la détection de perturbations instantanées de l'homéostasie, par exemple, des dommages minuscules des tissus vasculaires, la microglie peut répondre rapidement par une réorganisation de son profil d'activité (4). La réponse est probablement prise en charge par les astrocytes voisins libérant, par exemple, des ligands purinorecepteurs (5). Les cellules microgliales peuvent aussi produire des facteurs neurotrophiques pour maintenir les neurones en voie de disparition (6). La perturbation de la communication par les signaux de « non activation » permettrait au neurone en voie de disparition de demander l'aide des cellules microgliales (7). Ces neurones peuvent également émettre des signaux d'alerte en produisant des molécules ou présentes à de faibles concentrations (8).



3. <u>Dans une situation de graves altérations:</u>

Lors de perturbations plus « graves » du CNS et lors des lésions tissulaires importantes peuvent survenir des changements plus drastiques dans le phénotype fonctionnel de la microglie. Selon la nature des stimuli et de leur contexte, les cellules microgliales adaptent leur comportement réactif. Une réponse inadaptée de la microglie peut conduire à une dégradation importante des neurones et des cellules gliales en cas de réponse prolongée causée par une inflammation chronique (9).

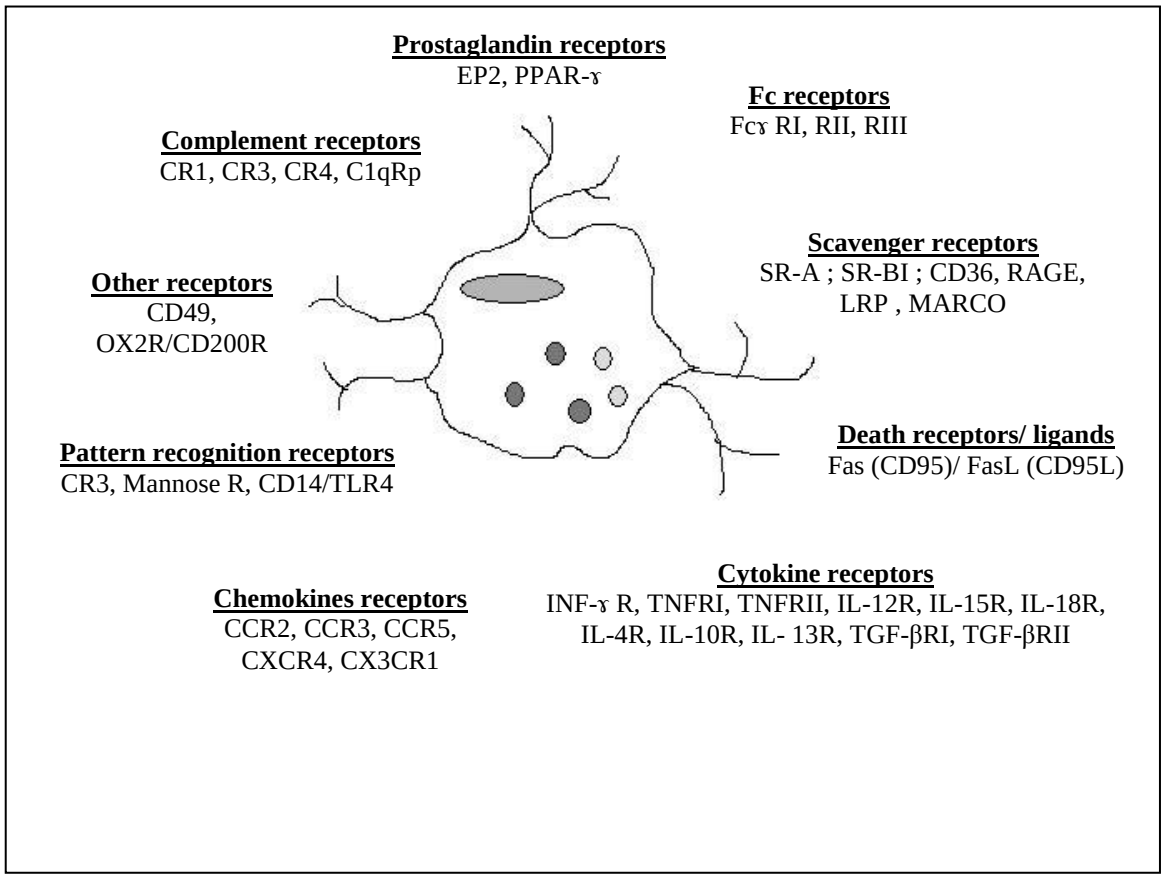


Figure 9: **Récepteurs impliqués dans la signalisation des cellules microgliales** (d'après [Aloisi, 2001]). Lors d'une neuroinflammation, des récepteurs constitutivement exprimés ou inductibles peuvent induire la migration et stimuler ou inhiber les fonctions des cellules microgliales.

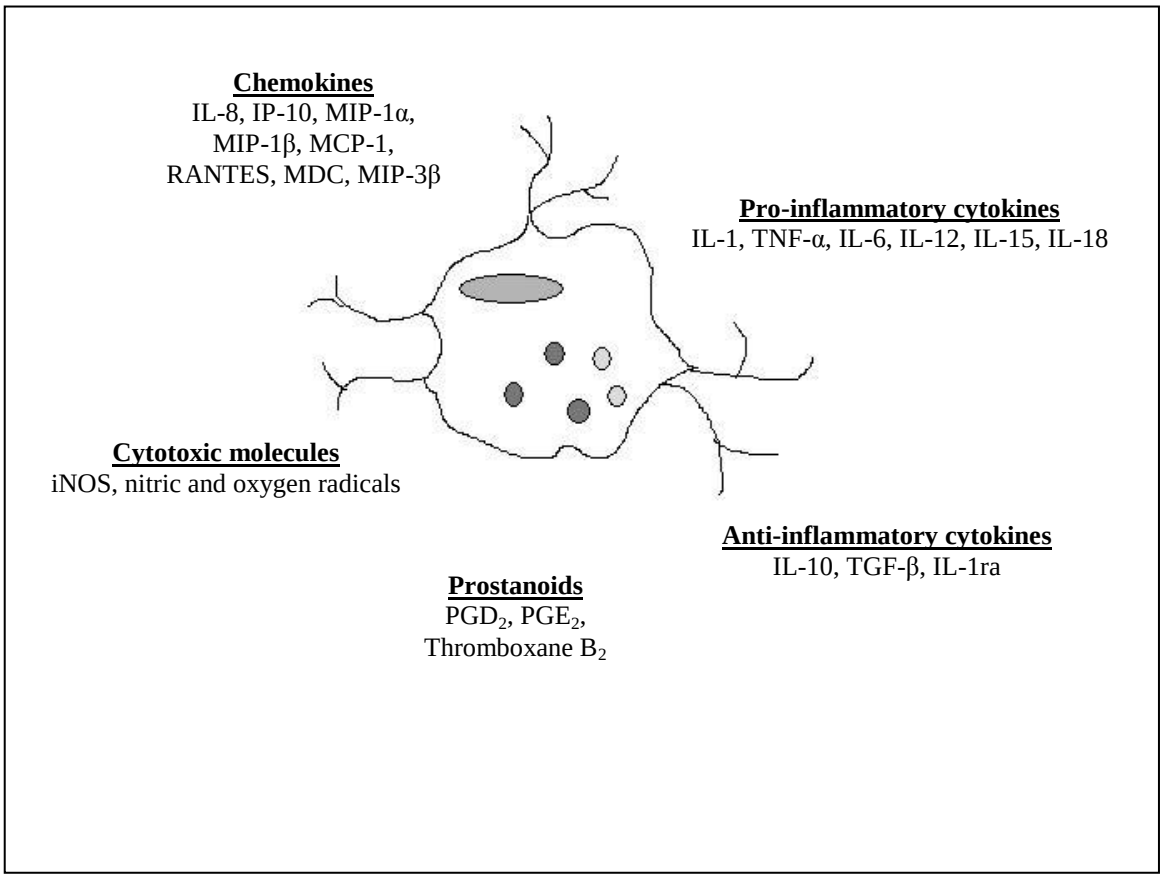


Figure 10: **Médiateurs inflammatoires et immunorégulateurs produits par les cellules microgliales activées** (d'après [Aloisi, 2001]).

III.2. Système nerveux et cellules microgliales chez les invertébrés

III. 2.a. Cellules microgliales chez les invertébrés :

La présence de cellules microgliales au sein du système nerveux d'animaux n'est pas seulement une spécificité des vertébrés. En effet, elles ont été découvertes et appelées « microgliales» pour la première fois, suite aux observations faites par del Rio- Hortega dans le système nerveux central de la sangsue [del Rio-Hortega, 1932]. Des études plus récentes ont permis de retrouver des cellules microgliales chez d'autres modèles invertébrés, notamment chez deux espèces de mollusques *Planorbarius corneus* et *Mytilus edulis*, et une espèce d'insectes (*Leucophaea maderae*) décrites par [Sonetti et al., 1994]. En règle générale, ces cellules microgliales d'invertébrés partagent plusieurs caractéristiques avec la microglie des vertébrés, notamment leur plasticité morphologique. Elles passent d'un état stellaire à un état actif amiboïde [Sonetti et al., 1994]. Cependant ces travaux pionniers ont principalement abouti à la description des caractéristiques morphologiques des cellules microgliales mais sont restés longtemps incomplets en ce qui concerne l'analyse de leurs fonctions biologiques.

III. 2.b. Cellules microgliales et repousse axonale :

Des études menées sur un nombre limité de modèles ont néanmoins mis en relief la mobilisation exceptionnelle des cellules microgliales au niveau des neurones, en particulier à la suite d'une lésion du système nerveux. Ces observations ont été principalement faites dans deux modèles originaux (l'escargot *Helix aspersa* et la sangsue médicinale *Hirudo medicinalis)* qui présentent la particularité de pouvoir réparer leur système nerveux à la suite d'une blessure. Les analyses ont majoritairement été réalisées *in vitro* et ont fait appel à des cultures en milieu liquide ou solide (gel de collagène). Les résultats originaux de ces deux modèles sont rapportés ci dessous.

Modèle Escargot : *Helix aspersa* :

Des expériences menées in vitro avec des ganglions buccaux maintenus en culture dans un gel ont permis de montrer le lien qui existait entre la mobilisation des cellules microgliales et la mise en place d'un processus de réparation neuronale. En effet si une coupure est réalisée sur des neurones de ganglions d'escargot, les images obtenues en contraste de phase (Figure 11 A-C) montrent d'abord une migration des cellules microgliales au niveau des extrémités coupées (Figure 11A) et ensuite une croissance des axones (Figure 11B). De manière intéressante, si le tissu externe entourant le ganglion n'est pas supprimé (cas Figure 11C), le nombre de cellules microgliales en migration est largement supérieur à celui observé en absence de ce tissu externe (cas Figure 11A et 11B). Les cellules migrantes semblent donc pouvoir provenir de la capsule extérieure entourant le ganglion [Babington et al., 2005].

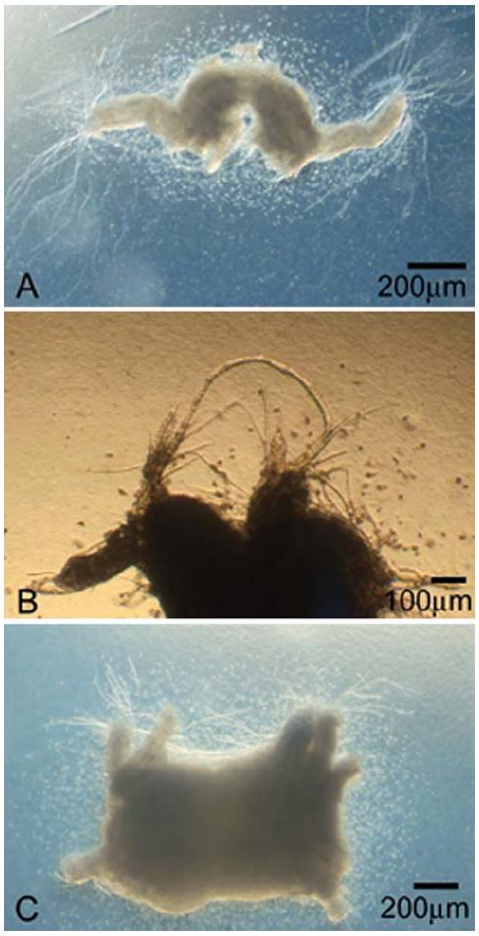


Figure 11: **Mise en évidence de la mobilisation de cellules microgliales des ganglions de l'escargot (*Helix aspersa*) en culture de gel de collagène** (d'après [Babington et al., 2005]). **(A)** Sur cette paire de ganglions buccaux maintenus 13 jours en culture on remarque une forte excroissance au niveau des extrémités coupées et les ganglions sont entourés par des cellules microgliales qui ont migré dans le gel. **(B)** Sur ces ganglions sub-oesophagiens maintenus 12 jours de culture, et dépourvus de leur capsule extérieure on constate que des neurites de deux racines nerveuses adjacentes ont réalisé une boucle de connexion. **(C)** Sur ces qanglions supra-oesophagiens cultivées pendant 14 jours et non dépourvus de leur capsule, on constate un fort afflux de cellules microgliales comparativement aux situations précédentes.

Modèle sangsue : *Hirudo medicinalis* :

Comme cela a été observé *in vitro* avec des cultures en gel, les cellules microgliales de sangsue migrent rapidement et de manière précoce en réponse à des lésions tissulaires et montrent un changement de morphologie similaire. Selon ces paramètres les cellules microgliales de sangsue se comportent comme celles des vertébrés [Babington et al., 2005; Morgese et al., 1983]. Ainsi chez la sangsue médicinale, après coupure (ou lésion) des extrémités des racines nerveuses et de connectifs mais également après rupture de la capsule du ganglion, les cellules microgliales sont mobilisées. En 2 jours de culture, le ganglion isolé est entouré d'un halo de cellules microgliales (Figure 12 B) et la migration des cellules microgliales est suivie d'une nouvelle croissance des axones visibles dans le gel [Babington et al., 2005]. L'importance des cellules microgliales de sangsue dans la réparation des axones lésés a été également souligné par les travaux de Ngu et ses collaborateurs [Ngu et al., 2007]. En effet, l'inhibition de l'accumulation de la microglie au site lésion avait empêché la repousse axonale des extrémités lestées.

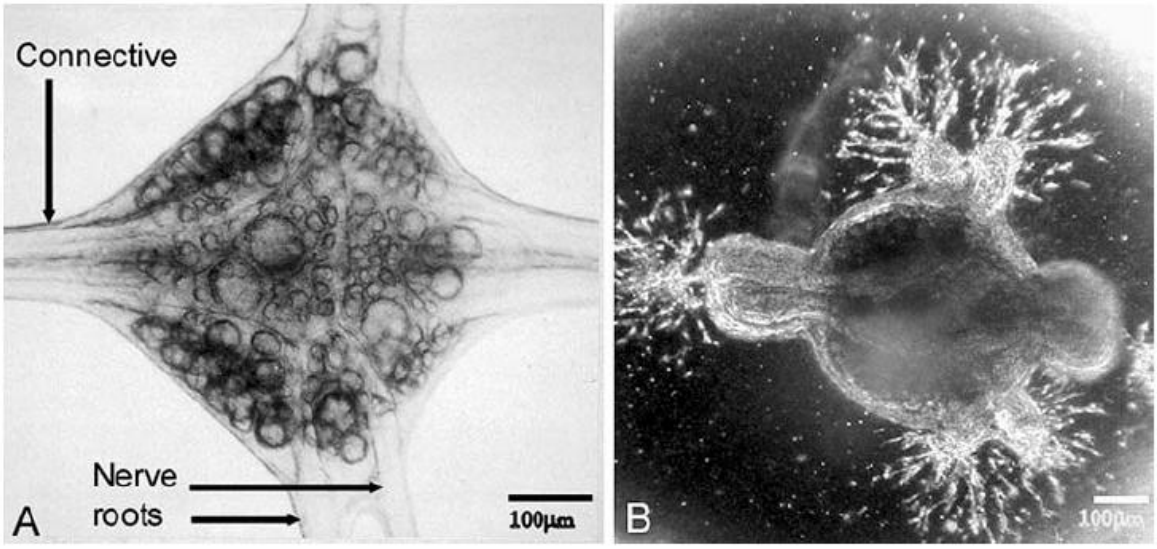


Figure 12: **Mobilisation des cellules microgliales de ganglion de sangsue en culture. (A)** Aperçu du ganglion de la sangsue (*Hirudo medicinalis*) avant la culture. **(B)** Image en contraste de phase d'un ganglion de sangsue après 5 jours de culture en gel de collagène. Le ganglion est entouré par des cellules microgliales ayant migré dans le gel et, à partir des extrémités coupées, des axones sont en train de régénérer (D'après [Babington et al., 2005]).

Au sein de notre laboratoire, compte tenu des pistes préalablement envisagées (par exemple l'analyse protéomique du système nerveux lésé ou non [Vergote et al., 2006] pour comprendre certains mécanismes immunitaires pouvant protéger le système nerveux de la sangsue médicinale, nous avons tenté de préciser la nature des facteurs qui interviennent dans le recrutement des cellules microgliales dans ce modèle invertébré intéressant pour élucider certains paramètres d'une réponse neuro-inflammatoire.

III. 2.c. Description du modèle *Hirudo medicinalis* :

Classification

La sangsue médicinale: *Hirudo medicinalis* est un annélide d'eau douce. Elle appartient à l'embranchement des Annélides, à la classe des Achètes ou Hirudinées (ni parapode, ni soie, à l'ordre des Gnathobdellés (présence de mâchoires mais pas de trompe, à la famille des Hirudinée et au genre Hirudo.

Système nerveux

Dès la première moitié du XIXème siècle, de nombreuses études ont été menées sur le système nerveux de la sangsue médicinale et ceci en a fait un des premiers modèles en neurobiologie [Sawyer, 2000].Ces études ont abouti à une connaissance très précise de la structure du système nerveux schématisée sur la figure 13.

Anatomie

Le système nerveux de la sangsue médicinale est composé d'une chaîne de ganglions reliés entre eux par deux connectifs inter-ganglionnaires formés de fibres nerveuses. Chaque métamère est ainsi innervé par un ganglion. La chaîne nerveuse est ventrale et enfermée dans un sinus sanguin. Tout d'abord, quatre ganglions innervent la partie antérieure de l'animal. Ces ganglions sont fusionnés en deux masses. Les ganglions supra-œsophagiens ont un rôle limité excepté dans la neurosécrétion tandis que les ganglions sous-œsophagiens jouent un rôle sensoriel important par l'innervation de la ventouse antérieure et des trois mâchoires. Ces deux masses sont reliées entre elles et forment un collier nerveux péri-œsophagien. Ensuite, un ganglion segmentaire innerve

chaque métamère du corps de l'animal. Enfin, sept ganglions fusionnés forment un ganglion caudal volumineux innervant principalement la ventouse postérieure de la sangsue. L'ensemble de la chaîne nerveuse est couvert par une capsule fibreuse contenant, au niveau des connectifs, des fibres musculaires contractiles.

Structure des ganglions

L'architecture neuronale des ganglions segmentaires est très bien caractérisée et extrêmement conservée d'un ganglion à l'autre. Les ganglions contiennent environ 400 corps cellulaires, excepté les ganglions 5 et 6 associés aux systèmes reproducteurs qui en contiennent environ 700. Au sein des ganglions, les corps cellulaires sont séparés en 6 follicules enveloppés chacun par une cellule gliale (cellule gliale des paquets) et de nombreuses cellules microgliales disséminées au sein du neuropile et du neuvrilème. Deux autres cellules gliales sont présentes dans le neuropile (cellules gliales géantes ou neuropile glia). Une cellule gliale supplémentaire est associée à chaque connectif (cellules gliales des connectifs). En plus des connectifs inter-ganglionnaires, partent de chaque ganglion quatre nerfs segmentaires (deux antérieurs et deux postérieurs) constituant le système nerveux périphérique de l'animal. Une cartographie précise du rôle de la plupart des neurones a été établie par Nicholls et Baylor [Nicholls and Baylor, 1968]. Les corps cellulaires les plus volumineux sont associes aux activités sensorielles (neurones T pour toucher, P pour pression et N pour nociception). D'autres neurones sont associés à d'autres fonctions telles que la nage, la circulation sanguine ou encore l'activité sexuelle. Le système nerveux de la sangsue *Hirudo medicinalis* est détaillé dans la figure 13.

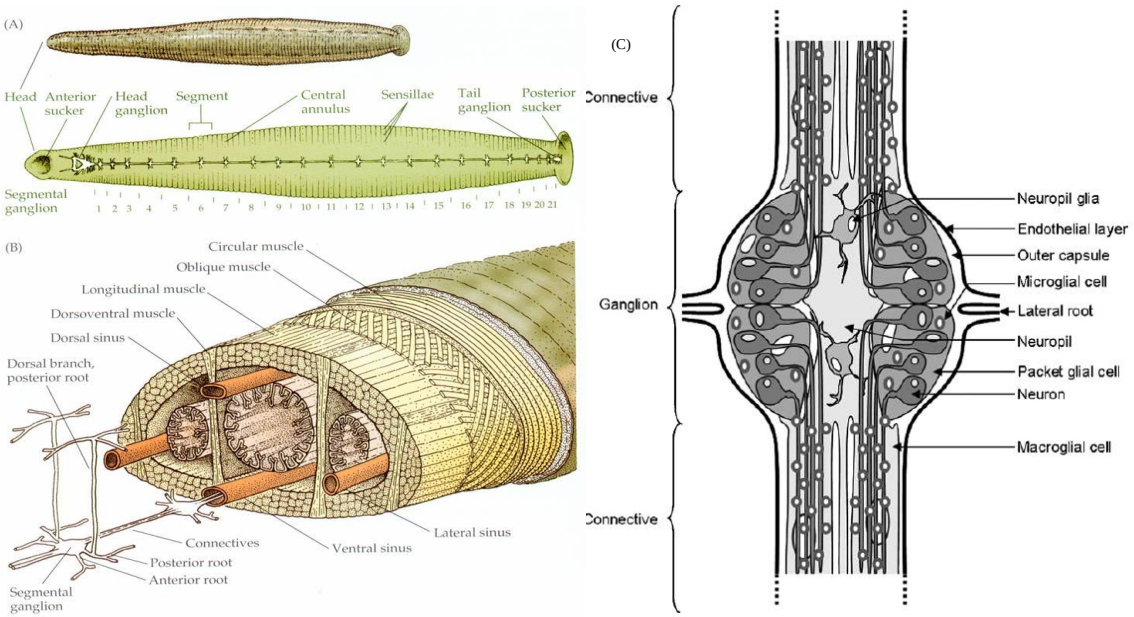


Figure 13: **Schématisation du système nerveux de la sangsue médicinale. (A)** Structure générale de la sangsue médicinale avec une vue ventrale de sa chaine nerveuse. **(B)** Anatomie de la chaîne nerveuse de la sangsue médicinale. **(C)** Schéma d'un ganglion du SNC de la sangsue (d'après [Tahtouh et al., 2009b]). La vue dorsale du ganglion montre quatre des six cellules gliales du paquet enveloppant les corps cellulaires des neurones. Les axones passent par le neuropile et se prolongent dans les connectifs. Le neuropile possède deux cellules macrogliales. Les cellules microgliales sont distribuées dans les ganglions et connectifs. Le système nerveux est enfermé dans une capsule externe couverte à l'extérieur par le feuillet viscéral de l'endothélium (paroi ventrale du sinus sanguin).

Intérêt scientifique

La chaîne nerveuse, par sa simplicité structurale, représente un tissu très accessible pour des études *in vivo* et *in vitro*. Le système nerveux de la sangsue a, pour caractéristique intéressante, la faculté de régénérer à la suite d'une lésion ou blessure. Lors de la section d'un connectif, les mouvements de natation de l'animal sont perturbés. Après quatre semaines, la nage de l'animal redevient normale, prouvant que la régénération n'est pas uniquement structurale mais également fonctionnelle [Elliot and Muller, 1981; Muller and Scott, 1981]. De nombreuses expériences réalisées *in vivo* et *in vitro* ont démontré qu'à l'inverse des neurones mammaliens, les neurones de sangsue possèdent la faculté, suite à une lésion, de régénérer des synapses et surtout de restaurer leurs fonctions [von Bernhardi and Muller, 1995]. Cette lésion est directement accompagnée d'une accumulation des cellules microgliales au site lésé.

Ces différentes observations témoignent du rôle important des cellules microgliales de sangsue dans la réponse neuro-inflammatoire au sein du SNC de la sangsue médicinale. L'activation de la microglie est contrôlée par un large éventail de facteurs immunitaires. Nous présenterons dans la suite de ce manuscrit mes travaux qui ont visé à comprendre l'implication des facteurs du complément dans cette accumulation cellulaire et donc dans la neuroinflammation. Les résultats seront rapportés sous forme d'articles qui tiennent compte de l'évolution chronologique de notre recherche.

Publication n°1

Is complement good, bad, or both? New functions of the complement factors associated with inflammation mechanisms in the Central Nervous System (CNS)

Acceptée pour publication dans European Cytokine Network (ECN) et publiée en septembre 2009.

REVIEW ARTICLE
"Junior review paper" rewarded by the journal *European Cytokine Network* (ECN) and the *European Cytokine Society* (ECS).

Is complement good, bad, or both? New functions of the complement factors associated with inflammation mechanisms in the central nervous system

Muriel Tahtouh, Françoise Croq, Christophe Lefebvre, Joël Pestel

Université de Lille 1 (Sciences et Technologies), Laboratoire de neuro-immunologie des annélides, CNRS FRE 2933, IFR 147, Villeneuve d'Ascq, France

Correspondence: J. Pestel, CNRS FRE 2933, IFR 147, Université Lille 1 (Sciences et technologies), SN3, 1er étage, Porte 123, Cité scientifique, 59655 Villeneuve d'Ascq, France
<joel.pestel@univille1.fr>

Accepted for publication May 29, 2009

ABSTRACT. The complement system is well known as an enzyme cascade that helps to defend against infections. Indeed, this ancestral system bridges innate and adaptive immunity. Its implication in diseases of the central nervous system (CNS), has led to an increased number of studies. Complement activation in the CNS has been generally considered to contribute to tissue damage. However, recent studies suggest that complement may be neuroprotective, and can participate in maintenance and repair of the adult brain. Here, we will review this dual role of complement proteins and some of their functional interactions with part of the chemokine and cytokine network associated with the protection of CNS integrity.

Keywords: complement, CNS, chemokine and cytokine network

The complement system (C) system is a key-component of the innate immune system, playing a central role in host defense against pathogens and in the initiation of inflammation. Complement activation is triggered through three different pathways, the classical, the lectin-dependent and the alternative pathway. The central nervous system (CNS) by itself can design an immune and inflammatory response. Pioneering experiments carried out by Levi-Strauss and Mallat have led to the first report on the ability of brain cells to produce C proteins, which were demonstrated to recognize and kill pathogens while preserving normal cells in the CNS. Numerous additional data have clearly confirmed that expression of C by resident cells is activated and is greatly increased following brain infection or injury [1]. In the CNS, C has been involved in the worsening of many neurodegenerative disorders such as Alzheimer disease (AD), Pick's disease and demyelinating diseases such as MS [2, 3]. However, neuroprotective effects of complement activation have been recently shown, suggesting that the C might play also an important role in neuroprotection [3, 4]. In this review, we will discuss the data that point to the dual role of complement proteins in the CNS.

This review has been prepared by Muriel Tahtouh based upon her PhD Thesis report. It has been rewarded by an ECN/ECS Junior review prize. It has been slighly modified as recommended by independent expert referees. Joel Prestel contributed, acting as Scientific Tutor.

THE "BAD SIDE" OF COMPLEMENT IN THE CNS

The primary site of complement protein synthesis is the liver, but CNS complement production in microglia, astrocytes, and neurons has been confirmed [1, 4]. Furthermore, an endogenous synthesis and expression of complement pathway in healthy human peripheral nerves has been recently shown. Epithelial cells, fibroblasts, Schwann cells and macrophages can synthesize complement *in vitro*. Several reports clearly showed that

Abbreviations

AD	Alzheimer's disease
BBB	blood-brain barrier
C	complement
CNS	central nervous system
MS	multiple sclerosis

increased local C biosynthesis and uncontrolled C activation in the CNS are factors contributing to the pathology of inflammatory and degenerative disorders [4].

The complement system represents an essential, innate immune defense mechanism [5], however, complement activation may contribute to neuronal loss in chronic inflammation reactions. Indeed, bidirectional, molecular communication between the CNS and the periphery contributes to the development of inflammation, which is required to initiate many neuronal disorders. Thus, complement activation leads to the release of various fragments, such as C3a and C5a (obtained by specific cleavage as summarized in *figure 1*) that might exert many immunological activities after binding to specific membrane receptors coupled to G proteins, as demonstrated for C3aR and C5aR, respectively. By inducing the recruitment of immune cells to the inflammation site, and by allowing the production of various chemokines or cytokines, these complement-derived peptides can modulate the immune response. For example, human, immature, plasmacytoid dendritic cells (pDC) (obtained from peripheral blood precursors after culture with IL-3) that express specific receptors for C3a and C5a, might migrate towards a gradient of both these anaphylatoxins. Interestingly, a similar chemotactic effect was described to represent a new pathway to recruit pDC to sites of inflammation [6].

Furthermore, through this anaphylatoxin release, the C system may initiate a cytokine production cascade. The interaction between proinflammatory cytokines and anaphylatoxins C3a and C5a was specifically investigated. For example, C3a and C5a enhance monocyte gene expression and protein synthesis of IL-1, this latter increases monocyte expression of receptors for these anaphylatoxins, which amplifies inflammation [7]. Moreover, in the CNS, C5a and C3a have the capacity to modulate synthesis of cytokines such as IL-1β, tumor necrosis factor α (TNF-α), IL-6 and IL-8 by myeloid cells. In addition, C3a and C5a can play a crucial role in the activation of T cells, to favor the production of proinflammatory cytokines such as IL-17 and INF-γ [8], to which brain cells can respond. Thus, in most CNS-associated diseases that are accompanied by chemokine expression, complement anaphylatoxins play a key role in the initial triggering of neuroinflammation mechanisms [2, 9, 10].

In Alzheimer's disease (AD), the level of C1q mRNA was increased compared to normal brain [1, 11]. Complement activation mediates neuronal injury *via* MAC-induced neurite disintegration and increased levels of reactive oxygen species [4]. In the AD brain, microglial cells are activated and show a dose-dependant increase in pro-inflammatory cytokine production [12, 13]. Activation of microglia by amyloid beta (A*β*) is associated with a specific recruitment of microglia cells responding to chemotactic factors and consequently induces A*β* fibril phagocytosis. Evidence for complement involvement in microglial response to A*β* has been reported [14, 15]. Indeed, the presence of C1q, locally produced by activated microglia in close proximity to the amyloid plaques, suggests that C1q may interact with the A*β* or

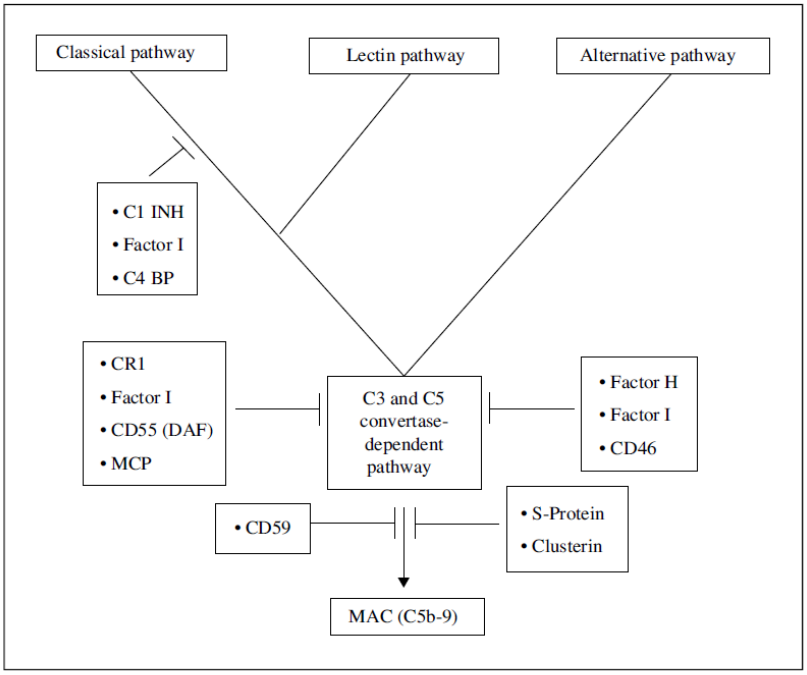


Figure 1

C activation pathways. Activation of the classical, alternative and lectin pathways leads to the generation of C3 and C5 component fragments following regulated activation of specific C3 and C5 convertases. The cleavage of C5 leads to the initiation of membrane attack complex (MAC) formation. These pathways are regulated by several inhibitors, either cell-surface complement inhibitors: MCP (membrane cofactor protein), CD46, CD55 (or DAF, decay accelerating factor), CR1 (also known as CD35, C3b/C4b receptor) CD59 and/or serum complement inhibitors: C1 inhibitor, Factor I (C1 INH), Factor H, C4bp, clusterin and S-protein (vitronectin).

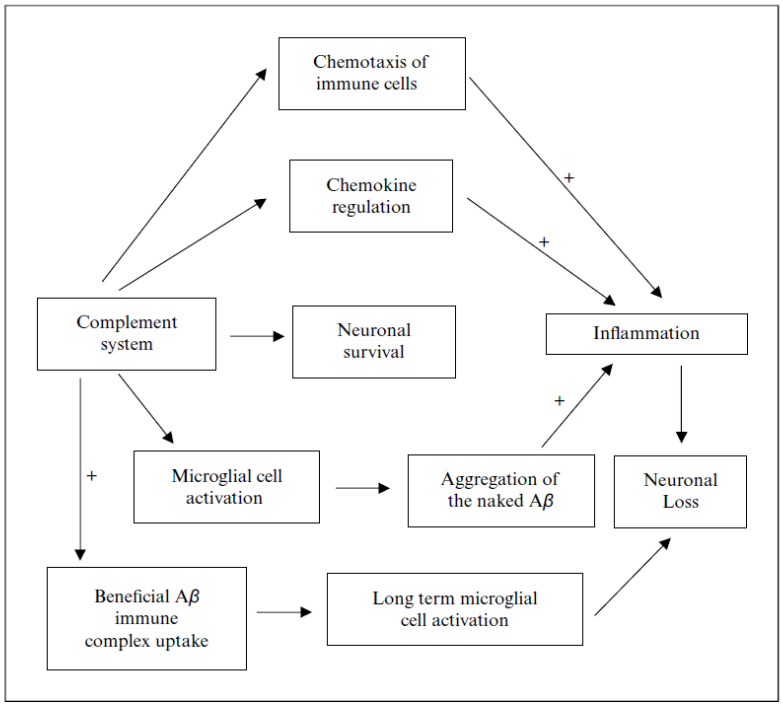


Figure 2

Diagram showing the dual role of C in the CNS as observed in various neuronal disorders (for example in Alzheimer's disease). Complement activation can be detrimental, causing neuronal loss, and neuroprotective, leading to neuron survival. Designing drugs that modulate rather than totally inhibit the activation of complement may represent the perfect therapy.

other components of the amyloid plaques, such as serum amyloid P. Interaction of C1q with Aβ can result in activation of complement when C1q is complexed with the serine proteases C1r and C1s, or in the induction of Aβ aggregation in the absence of C1r, C1s, and other complement proteins (as summarized in *figure 2*). In this second case, C1q can block access of microglia to Aβ and may contribute to the accumulation of the peptides in plaques, which is considered to be lethal [16, 17].

To avoid this self-destructive tendency, host cells are protected by a battery of regulatory molecules (C inhibitors), as recently underlined in some reviews *(figure 1)* [1, 4, 5], which mainly act at the level of the C3- or C5-cleaving enzymes and under the control of the final, membrane attack complex (MAC) formation. C1 inhibitor (C1-INH), C4b binding protein (C4 BP), Factor H, Factor I, S-protein (also called vitronectin) and clusterin are all soluble C inhibitors, which may be secreted and present in the fluid phase. The other C inhibitors, including membrane cofactor protein (MCP, CD46), decay accelerating factor (DAF, CD55) and CD59 are expressed on the cell membrane surface. Indeed, in brains with chronic, but not acute experimental autoimmune encephalomyelitis, the decay-accelerating factor (CD55) neuronal expression was highly associated with C3b opsonization of neuronal cell bodies and axons. In contrast, in both conditions, the CD35, CD46 and CD59 levels were not affected in neurons and glial cells. However, in another trauma situation, focal closed head injury, CD59, which is considered to be a major regulator of MAC formation, was demonstrated as an essential protector from homologous cell injury after complement activation in the injured brain. Thus, brain cells can generate a C system to kill pathogens, while they are relatively well protected from direct C lysis by expressing soluble and membrane C inhibitors. However, there is now considerable evidence that increased local C biosynthesis and uncontrolled C activation in the CNS are contributing factors in the pathology of degenerative disorders leading to neuronal loss and local inflammation, especially during brain infections where C inhibitors are downregulated compared to C proteins [1, 11].

In ischemia, local expression of complement proteins by resident cells is increased following brain infection. Cerebral ischemia leads to an increased expression of receptors for the complement-derived anaphylatoxic peptides C3a and C5a (C3aR and C5aR) in the ischemic cortex in mice. Complement activation exacerbated the inflammation process leading to secondary tissue damage [18]. In the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS, a pathological role of complement factors has been suggested in the selective cell lysis of neurons and oligodendrocytes [4, 19]. This deleterious effect was also suggested for C1q in adult glaucomatous retinas, where it tags synapses for elimination even at early stages of disease. This early complement-dependant synapse loss could drive axon degeneration [20].

C has been also implicated in neurological diseases associated with pain although its role in neuropathic pain has

not yet been clearly defined. Disorders of the immune system, involving the activation of complement, play an important role in several neurological diseases in which chronic pain is significant. Complement activation in the peripheral nerve contributes to recruitment of immune cells and to neuropathic pain due to nerve injury. As complement activation following nerve injury has multiple consequences, further studies are needed to investigate the importance of these factors in neuropathic pain [21]. Gene expression microarray analysis performed on the rat spinal nerve ligation (SNL) model of neuropathic pain revealed that several complement components were upregulated in microglia of the dorsal horn (CNS), while inhibitors such as DAF (decay accelerating factor) were downregulated. The complement pathway might be a novel target for the development of neuropathic pain treatments [22].

THE "GOOD SIDE" OF COMPLEMENT IN THE CNS

However, the same system responsible for deleterious effects can be, in some circumstances, beneficial to the host [23-25]. Complement is of special importance in the brain, where the entrance of elements of the adaptive immune system is restricted by the blood-brain barrier (BBB). Local production of complement factors in the peripheral nerve could protect the healthy nerve from infections, and could facilitate regeneration of injured axons by the clearance of myelin debris, thought to be inhibitory to axon growth. Indeed, complement activation accelerates the vacuolated myelin elimination by macrophages [3]. In addition, C1q has an important role in the clearance of apoptotic cells. It can bind directly to the surface blebs of ultraviolet light-induced apoptotic cells [26]. In AD pathology, some authors have suggested a potential neuroprotective role for complement by reducing the accumulation of degenerating neurons and brain Aβ deposits and by promoting their clearance [27]. Indeed complement is known to be actively involved in the removal of targeted molecules by phagocytes, which supports the notion that complement components are upregulated in Aβ-rich areas of the AD brain [16]. Incidentally, microglial cells that express C1q receptors behave in this immune-privileged site as efficient macrophages, and the increase in C1q receptor expression is linked to the enhancement of the phagocytosis capacity observed. Thus, C1q may have opposing effects on the development of the disease, either by accelerating its aggregation as previously indicated, or by enhancing Aβ immune complex uptake [17]. Indeed, in Alzheimer's disease, the specific role of C1q in the ingestion of the amyloid β peptide, might be used as a potential therapeutic target *(figure 2)*.

C1q was also shown to be expressed transiently by postnatal neurons and to mediate synapse elimination during development. Several reports have underlined the crucial activity of C1q and/or C3 in synapse elimination mechanisms [20, 28]. Mice deficient in C1q or C3 complement components exhibit large defects in CNS synapse elimination. It is suggested that C1q-dependent mechanisms are involved in the elimination of weaker synapses, while C1q-independent pathways are used to strengthen appropriate synapses. In addition, the binding of C3b fragments to its specific receptors expressed on activated microglia, might induce increased phagocytosis and contribute to efficient synapse elimination. Interestingly, C1q was shown to be expressed by postnatal neurons in response to immature astrocytes and localized to synapses throughout the postnatal CNS and retina. Thus, unwanted synapses can be tagged by complement for elimination, and this complement-dependent mechanism may become aberrantly reactivated in neurodegenerative disease. As neuronal C1q was characterized at the nerve level, it can be assumed that C1q family proteins can act as new, transneuronal cytokines and regulate normal or abnormal brain functions.

Complement anaphylatoxins C3a and C5a were also described as having multiple effects relevant to neuronal survival. C5a can have a protective effect against glutamate-induced neurotoxicity, and apoptosis in neurons through MAPK-mediated regulation of caspase activation. C3a was reported to have a positive impact against NMDA-induced neuronal cell death. In mice, C3a and C5a were demonstrated to be critical for liver regeneration by promoting hepatocyte proliferation and, in parallel experiments, similar observations have led to evidence of the impact of C3a and C5a complement components in the modulation of neuronal survival [2, 3]. The key role of these factors in nerve integrity preservation is reinforced by the fact that the specific receptors, C3aR and C5aR, can be detected, *in vitro*, at the surface of neural stem cells and, *in vivo*, on neuroblasts. Another interesting point is that complement factors might be involved in the production of energy sources required for nerve activity, mainly for neurite outgrowth. Indeed, following cleavage by carboxypeptidase B (CBP), present in the endoneurial compartment of the nerve, C3a components release C3adesArg fragments (called acylation stimulating protein [ASP]) that might stimulate triglyceride synthesis in adipocytes, and consequently might be an energy source for peripheral axons. Other complement factors have been described as beneficial for nerve systems. The final C5b-9 complement complex was reported to have neuroprotective effects in MS and in experimental autoimmune encephalomyelitis [3]. Thus, complement appears to function as a positive regulator of both basal and ischemia-induced adult mammalian neurogenesis [29]. Indeed, it can participate in the clearance of toxic debris and apoptotic cells, as well as promoting tissue repair, mainly through the anti-inflammatory activities of C3a.

Until now, the complement system, in the brain, was mainly described as involved in the basic mechanisms of defence against various pathogenic microorganisms. Its activation can be associated with bad or good effects. For example, C appears to mediate partial killing, but not clearance of *S. pneumoniae* from the CSF, both the classical and the alternative pathways are vital for host defense against *S. pneumoniae* infection in the CNS. Inflammation is harmful when it causes tissue damage as in meningitis, but useful when it helps in the preven-

tion or clearance of harmful pathogen deposits. C plays a critical role in host defense, in this removal of bacteria. Brain cells can generate C to kill pathogens while they are relatively well protected from direct complement factors lysis by expressing soluble and membrane inhibitors [30]. Thus, this new data reported for the neuroinflammatory disorders, seem to indicate that complement factors might have similar, dual effects at the level of the CNS. Finally, it might be hypothesized that their involvement in neuronal systems is part of an ancestral mechanism. Indeed, in the *Hirudo medicinalis* invertebrate CNS, we have identified, for the first time, a molecule homologous to mammalian C1q. Its chemoattractant activity on microglia highlights a new field of investigation, which might lead to a better understand of leech nerve cord repair, during which complement seems to be well regulated [31].

CONCLUSION

C is one of the most critical defence mechanisms of innate immunity against cerebral infection by viruses, bacteria and fungi, with different molecular pathways contributing to the clearance of the invading pathogens. C is now described as having special importance in the CNS. Complement activation can be neurotoxic as well as neuroprotective, and can lead to nerve recovery and repair [23, 25]. Therefore, a tight balance between complement activation and regulation is essential to protect and maintain healthy tissues [5]. With the aim of proposing alternative therapeutic agents, it is necessary to take into account the fact that, in neurodegenerative disorders, a more severe and chronic inflammation can ultimately result in a worsening of these diseases. An ideal treatment for reducing many CNS disorders would boost the clean-up function of complement, but suppress any excessive inflammatory effect. It should harness the "good side of complement activation" and suppress their "bad side". Up to now, the results obtained in the leech nerve CNS seem to indicate that complement-like factors are involved in the efficient nerve cord repair seen following a nervous system injury. In this ancient invertebrate, complement factors seem to preserve its bright side of protection, preventing harmful inflammation caused by long lasting complement activation.

REFERENCES

1. Speth C, Dierich MP, Gasque P. Neuroinvasion by pathogens: a key role of the complement system. *Mol Immunol* 2002; 38: 669-79.
2. Jauneau AC, Ischenko A, Chan P, *et al.* Complement component anaphylatoxins upregulate chemokine expression by human astrocytes. *FEBS Lett* 2003; 537: 17-22.
3. Rus H, Cudrici C, Niculescu F, *et al.* Complement activation in autoimmune demyelination: dual role in neuroinflammation and neuroprotection. *J Neuroimmunol* 2006; 180: 9-16.
4. Ramaglia V, Daha MR, Baas F. The complement system in the peripheral nerve: friend or foe? *Mol Immunol* 2008; 45: 3865-77.
5. Rambach G, Wurzner R, Speth C. Complement: an efficient sword of innate immunity. *Contrib Microbiol* 2008; 15: 78-100.
6. Gutzmer R, *et al.* Human plasmacytoid dendritic cells express receptors for anaphylatoxins C3a and C5a and are chemoattracted to C3a and C5a. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 2422-9.
7. Takabayashi T, *et al.* Interleukin-1 upregulates anaphylatoxin receptors on mononuclear cells. *Surgery* 2004; 135: 544-54.
8. Liu J, *et al.* IFN-gamma and IL-17 production in experimental autoimmune encephalomyelitis depends on local APC-T cell complement production. *J Immunol* 2008; 180: 5882-9.
9. Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM. The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br J Pharmacol* 2006; 147 (Suppl. 1): S 232-40.
10. Rock RB, Peterson PK. Microglia as a pharmacological target in infectious and inflammatory diseases of the brain. *J Neuroimmune Pharmacol* 2006; 1: 117-26.
11. Loeffler DA, Camp DM, Bennett DA. Plaque complement activation and cognitive loss in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* 2008; 5: 9.
12. Dheen ST, Kaur C, Ling EA. Microglial activation and its implications in the brain diseases. *Curr Med Chem* 2007; 14: 1189-97.
13. Lynch NJ, *et al.* Microglial activation and increased synthesis of complement component C1q precedes blood-brain barrier dysfunction in rats. *Mol Immunol* 2004; 40: 709-16.
14. Veerhuis R, *et al.* Cytokines associated with amyloid plaques in Alzheimer's disease brain stimulate human glial and neuronal cell cultures to secrete early complement proteins, but not C1-inhibitor. *Exp Neurol* 1999; 160: 289-99.
15. Veerhuis R, *et al.* Amyloid beta plaque-associated proteins C1q and SAP enhance the Abeta1-42 peptide-induced cytokine secretion by adult human microglia *in vitro*. *Acta Neuropathol* 2003; 105: 135-44.
16. Rogers J, Strohmeyer R, Kovelowski CJ, *et al.* Microglia and inflammatory mechanisms in the clearance of amyloid beta peptide. *Glia* 2002; 40: 260-9.
17. Webster SD, *et al.* Antibody-mediated phagocytosis of the amyloid beta-peptide in microglia is differentially modulated by C1q. *J Immunol* 2001; 166: 7496-503.
18. Pekny M, Wilhelmsson U, Bogestal YR, *et al.* The role of astrocytes and complement system in neural plasticity. *Int Rev Neurobiol* 2007; 82: 95-111.
19. Minagar A, Carpenter A, Alexander JS. The destructive alliance: interactions of leukocytes, cerebral endothelial cells, and the immune cascade in pathogenesis of multiple sclerosis. *Int Rev Neurobiol* 2007; 79: 1-11.
20. Stevens B, *et al.* The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell* 2007; 131: 1164-78.
21. Li M, Peake PW, Charlesworth JA, *et al.* Complement activation contributes to leukocyte recruitment and neuropathic pain following peripheral nerve injury in rats. *Eur J Neurosci* 2007; 26: 3486-500.
22. Levin ME, *et al.* Complement activation in the peripheral nervous system following the spinal nerve ligation model of neuropathic pain. *Pain* 2008; 137: 182-201.
23. Alexander JJ, Anderson AJ, Barnum SR, *et al.* The complement cascade: Yin-Yang in neuroinflammation - neuro-protection and -degeneration. *J Neurochem* 2008; 107: 1169-87.

24. van Beek J. Complement activation: beneficial and detrimental effects in the CNS. *Ernst Schering Res Found Workshop* 2004: 67-85.

25. van Beek J, Elward K, Gasque P. Activation of complement in the central nervous system: roles in neurodegeneration and neuroprotection. *Ann NY Acad Sci* 2003; 992: 56-71.

26. Francis K, van Beek J, Canova C, *et al.* Innate immunity and brain inflammation: the key role of complement. *Expert Rev Mol Med* 2003; 5: 1-19.

27. Gasque P. Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. *Mol Immunol* 2004; 41: 1089-98.

28. Yuzaki M. Cbln and C1q family proteins: new transneuronal cytokines. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65: 1698-705.

29. Bogestal YR, *et al.* Signaling through C5aR is not involved in basal neurogenesis. *J Neurosci Res* 2007; 85: 2892-7.

30. Rupprecht TA, *et al.* Complement C1q and C3 are critical for the innate immune response to *Streptococcus pneumoniae* in the central nervous system. *J Immunol* 2007; 178: 1861-9.

31. Tahtouh M, *et al.* Evidence for a novel chemotactic C1q domain-containing factor in the leech nerve cord. *Mol Immunol* 2009; 46: 523-31.

Publication n°2

Complement system of invertebrates: into the spotlight

Soumise pour publication dans Immunobiology

Complement system of invertebrates: into the spotlight

Muriel Tahtouh[1], Françoise Croq[1], Jacopo Vizioli[1], Christophe Lefebvre[1], Masaru Nonaka[2 a] and Joël Pestel[1 a *]

[1] *Université Lille Nord de France, Université Lille 1 (Sciences et Technologies) Laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides, CNRS FRE 3249, IFR 147, F59655 Villeneuve d'Ascq, France.*

[2] *Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, the University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku.*

Abstract

Complement is vital for protecting individuals against pathogens and any disturbance of homeostasis associated with appearance of foreign substances. Its involvement in the various steps of the inflammatory responses and its capacity to interact with the majority of cells of innate immunity is now well recognized. Several authors have already underlined the ancient origin of the complement factors. However recent data obtained in various invertebrates confirm their presence in many species from the phylogenetic classification. In this review some details are given about the characterization and the potential biologic functions of these new molecules homologues to vertebrate key-complement factors. Unexpectedly, the complement system of invertebrates shows a certain degree of complexity as that of vertebrates, although it shows separate development unique to each animal lineage. Finally the identification of complement protein homologs in the central nervous system of invertebrates has opened new questions about their role in the dialog between both immune system and nervous system. Thus in this review, we will try to bring the biology of the invertebrates complement system from behind the scenes into the spotlight.

Keywords: Complement, evolution, immunity, invertebrates.

Introduction

The complement system is a highly sophisticated biological system that was first described as a "complement" to innate immunity, emerged as an essential link between the innate and adaptive immune systems in vertebrates (1-4). The complement system is composed, in a classical pathway (CP), of about 30 distinct humoral and cell surface proteins playing a key role in the host defense. From the structural viewpoint, its evolution is generally divided into two stages: primitive (all animals except for jawed vertebrates) and modern (jawed vertebrates). At the primitive stage, most complement-specific domain combinations had been evidenced, suggesting that basic function of individual complement components had been established at this stage (5, 6). Later, it was proposed that complement could be activated by bacterial surfaces through an antibody-independent pathway, the alternative pathway (AP) that was not easily acceptable at that time. Recently, the third pathway, the lectin pathway (LP), was described (2, 7, 8). All the three pathways merge at a common proteolytic activation step of C3 the central component of complement. The activation of the complement system promotes the three main biological activities: (1) opsonization of pathogens, (2) chemotaxis and activation of leukocytes, and (3) direct killing of pathogens through a terminal pathway that leads to the formation of a membrane attack complex (MAC). Recently, accumulating evidences show that the complement system acts as an adjuvant, enhancing and directing the adaptive immune response (9, 10). It also participates in the cleaning of apoptotic bodies, and many activities remain to be elucidated. Recent studies on vertebrate evolution indicate that the major development of the complement system was completed by the emergence of jawed vertebrates. In the past, scientists poorly developed the research of complement-like molecules in all the other animal taxa that hold anyway a dominant position in Metazoa. The term Invertebrates is a general and not well defined name indicating all the Metazoa missing a backbone. The invertebrate group is the product of hundreds of millions of years of evolution and is comprehensive of a huge number of species that today inhabit every environment on earth. The Figure 1 represents the main groups of Metazoa including vertebrates and others members which are regrouped under the name of invertebrates. In the last several years, the development of researches on animal phylogeny and comparative immunology evidenced the presence of complement

genes in many Metazoa species, modifying our belief that the complement cascade was strictly a vertebrate system (1, 3). It is now evident that the complement system has a more ancient origin in evolution than expected. Also, recent studies revealed that the primitive complement is one of the most highly organized innate immune systems in Invertebrates (2, 5) and that it cannot be regarded anymore ‘as a sort of simple, nonspecific weapon at any and every invader’ (11). Most of the recently characterized complement components show conserved elements along Metazoa, enabling to trace the evolutionary history of complement based on these structures (5). The analysis of the activation mechanisms and function of Invertebrates complement might explain the evolutionary origin of this ancient defense system in Metazoa and also help to improve our knowledge of the “modern” complement, as found in mammals. In this review, we will discuss the architecture of the invertebrate complement system, as studied to date.

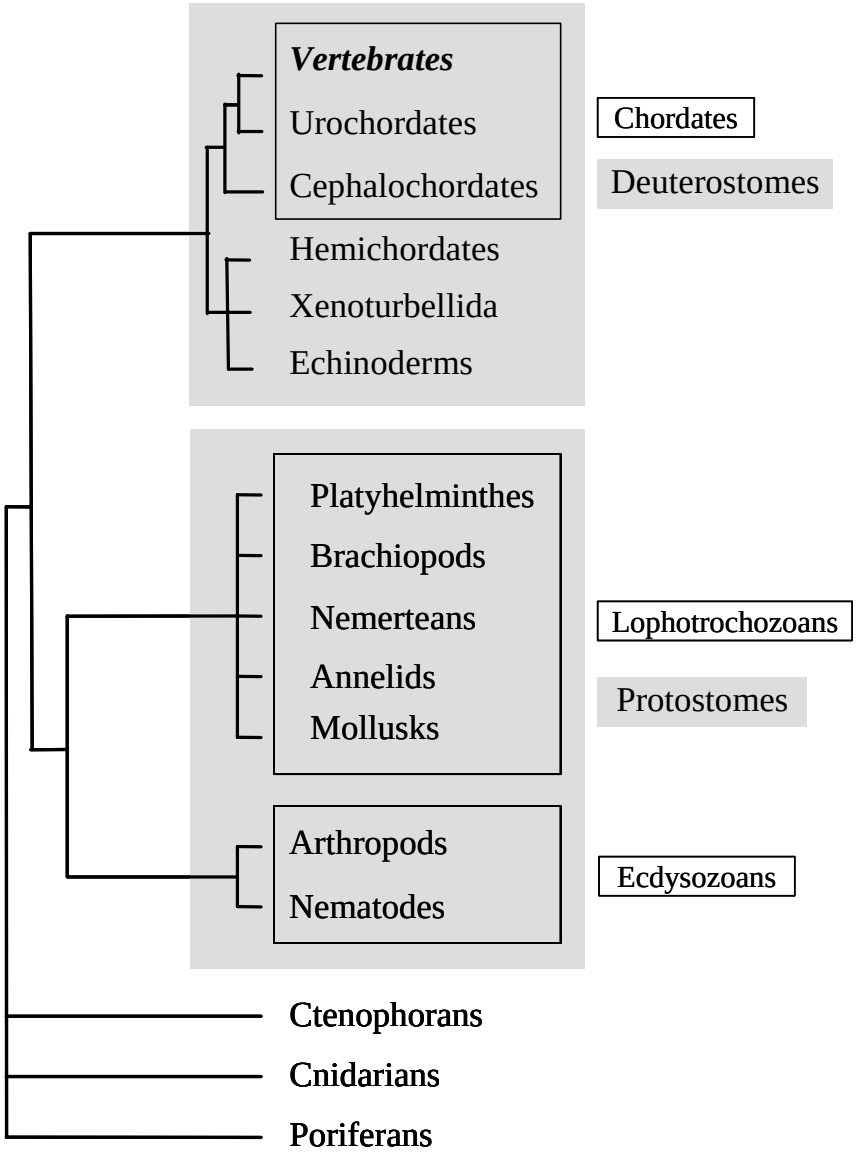


Figure 1: The phylogenetic classification of Metazoa based on ribosomal RNA and Hox gene family (12).

Invertebrate complement system

Animal immunity was generated under intense evolutionary pressure, and the mechanisms that carry out recognition and elimination of pathogens are among the most rapidly evolving genetic systems. It is now clear that this pressure led to the emergence of novel molecular mechanisms not only among vertebrates, where immunity is by far best characterized, but also across invertebrate phyla. For many years, phylogenetic studies of the complement were performed mainly at the protein level leading to identification of its components from most classes of vertebrates. At that time, it was generally believed that the complement was a unique property of vertebrates because all attempts to identify similar components from invertebrates had failed. Over the past 10 years, DNA-level studies, including genome and EST analyses, caused a drastic change in our knowledge about the ancient origin of the complement system. The initial phase of genome analysis revealed the presence of the complement genes in several invertebrate species. Since then, a higher attention was focused on to those animals, but the experimental investigation in this fundamental research field remained limited and little data are still available until now. This review will report some recent findings concerning the complement system in non-vertebrate metazoans (1) and will try to underline some new unexpected role played by complement components in non-immune system .

Complement system in Deuterostomes

Deuterostomes are one of the two groups of bilaterian metazoa. They present two major developmental steps: the formation of the cœlomic cavity by enterocœly and the transformation of the first embryonic opening, the blastopore, in anus. Deuterostomes can be divided in two major taxa, echinoderms and chordates, characterized by the presence of an epithelial, diffused or a central, well-organized nervous system, respectively.

Chordates

This phylum comprises cephalochordates (amphioxus), urochordates (ascidians), and vertebrates. Recent molecular phylogenetic studies led to settle cephalochordates as the basal group within this phylum and to consider that vertebrates and urochordates had diverged later (13, 14). These three groups share several typical features, including a

notochord, dorsal hollow neural tube, gill slits, and endostyle and are thought to have derived from a common ancestor during or prior to the Cambrian explosion. In this paragraph we will limit our discussion to non-vertebrate chordate complement.

The cephalochordates, commonly called amphioxus or lancelets, comprise a little number of marine species separated from vertebrates by a wide phylogenetic distance. However these organisms share many conserved DNA sequences like several transcriptional enhancers and have been in the focus of many evolutionary studies to understand the biology and evolution of complement system in either non-chordate or chordate deuterostomes. In an important comprehensive genomic survey of the immune gene repertoire of the amphioxus *Branchiostoma floridae*, significant features of expansion were clearly reported (15). Thus, in the list of various innate immunity gene models, the amphioxus genome exhibited those related to C-type lectin, ficolin or C1q, but also hundreds of models containing complement-related domains as C3, B factor, MBL-associated serine protease (MASP) and C6-like (15). Interestingly a novel C1q family member, named AmphiC1q1, was cloned and identified in cephalochordate amphioxus. By *in situ* hybridization, high transcriptional levels of the gene were detected during all stages of embryonic development and in mature individuals; AmphiC1q1 was mainly expressed in the ovary, intestine and nerve system. Functional analysis indicated that AmphiC1q1 could not act as its lamprey homologue. Moreover by using a recombinant AmphiC1q1 protein truncated of its globular C1q domain, the crucial role of the collagen region for the protein activity was shown (16). In addition, as amphioxus was shown to have a sophisticated TNF system and a complicated complement system not previously seen in other invertebrates, such studies underlined that the amphioxus, a species without vertebrate-type adaptive immunity, holds extraordinary innate complexity and diversity (17). In another amphioxus species, *B. belcheri*, a functional role of complement system in the embryogenesis of invertebrate species was originally reported. Indeed the C3 and B factor complement components can be maternally transferred to offspring. Using three blocking antibodies of the complement activation pathways, the AP was shown to be primarily responsible for the bacteriostatic activity of

the egg cytosol and the potential involvement of the CP and LP key-elements was shown to have little contribution (18).

Urochordates or tunicates include around 1300 species of marine chordates. The Ascidiacea is the largest group of tunicates. Studies on the ascidian complement system have been mainly performed on two species, *Halocynthia roretzi* and *Ciona intestinalis*.

H. roretzi is suitable for biochemical analysis because of its large body size. C3 (19), glucose binding lectin (GBL) (20), and ficolin (21) proteins have been isolated from its body fluid. In addition, cDNA clones for C3 (19), GBL (20), ficolin (21), B factor, MASPs (22), CR3 alpha (23) and CR3 beta (24) chains have been identified. The *H. roretzi* complement system was shown to exhibit opsonic activity using GBL and ficolins as recognition molecules.

C. intestinalis has the smallest genome of any experimentally manipulable chordates and provide a foundation for genome-scale analysis of regulatory networks through development (25). The genome-wide search for the ascidian complement undertook in the *C. intestinalis* model led to demonstrate that most complement gene families are present in urochordates and many of them have multiple members. Its genetic relationship to other invertebrates and vertebrates prompted many researchers to study complement factors in this animal as a mean of better understanding the evolution of C3, C4 and C5. Two C3-like genes (*Ci*C3-1 and *Ci*C3-2) have been characterized from blood cell total RNA of *C. intestinalis* (25). In mammals, the C3 gene is mainly expressed in the liver by hepatocytes, macrophages and other cell types. Unlike *H. roretzi* where the hepatopancreas and blood cells have been identified as the main sites of C3 gene expression, *C. intestinalis* does not possess this digestive gland. However, like all urochordates, it does have a well-developed hemocœlic blood vascular system, which allows the blood cells to penetrate directly into the surrounding tissues. Interestingly the presence of a conserved thioester site (absent from C5), anaphylatoxin (ANA) and C345C domains in the *Ci*C3-1 and *Ci*C3-2 related genes confirmed that the two isolated genes are C3-like genes (6, 26-28). Furthermore, B factor, C6-like molecules with MAC/Perforin (MACP) domain and MASP-type serine proteases were also found. Recently, a *C. intestinalis* Mannose Binding Lectin (MBL) related molecule (*Ci*MBL)

was isolated and its antimicrobial activity was demonstrated to be dependent on a collagenous domain (26). Thus, such fundamental studies have suggested the presence of three different units in the complement system of *C. intestinalis*. The first unit behaves as an opsonic unit that contains C3 and B factor acting as a vertebrate AP. The second one, composed of lectin-like domains, looks like a LP containing the potential molecules involved in recognition of foreign molecular motifs. *Ci*MBL and MASPs are supposed to be associated with these recognition molecules. The third unit contains C6-like molecules with the MACP domain showing cytolytic functions, however, this latter unit may be independent from the other two ones because of the lack of the critical domains required for interaction with C5 as observed in mammals. In addition, five transcripts, each with complete coding sequence, homologous to known rhamnose-binding lectins (RBLs) were identified in a full-length cDNA library from the compound ascidian *Botryllus schlosseri* (29, 30). Thus, the ascidian complement system was the best studied in invertebrates and based on the data obtained until now a hypothetical functional mechanism of invertebrate complement might be proposed (Figure 2).

Echinoderms

Echinoderms along with hemichordates and xenoturbellida (31) constitute a distinct group to the chordates. Updated reports on echinoderm genome have offered a more complete view of immunity across bilaterian phyla. For example, the recent focus onto immune components in the purple sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* has outlined the changing perspective on the evolution of deuterostome immunity. The purple sea urchin is a long-lived animal and its genome is non-reduced. Aside from its critical phylogenetic position, *S. purpuratus* has morphology, life history and immune features unlike those of any of the animal models from which our understanding of invertebrate immunity is derived. By taking into account all these criteria and by considering some new recent information about alternative ways to create immune diversity, the immune complexity of this invertebrate has been underlined. Indeed C3- and B factor-related molecules (*Sp*C3 and *Sp*Bf, respectively) were cloned and sequenced from a lipopolysaccharide (LPS)-activated cœlomocyte cDNA library of *S. purpuratus*. Western blot and gene expression analyses revealed the presence of two phagocyte subpopulations

expressing *Sp*C3 and the *Sp*C3 gene upregulation following LPS challenge (3). *Sp*C3 has been shown to function as an opsonin in the cœlomic fluid and opsonizes yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) to be phagocytosed by polygonal cœlomocytes. To date, the sea urchin complement system seemed to be in term of functionality similar to the AP in vertebrates. However, homologs of factor D and properdin have not been identified in the cœlomic fluid. This alternative complement pathway is usually activated by a microbe surface in a well-studied activation sequence (3, 18, 32, 33) The *Sp*C3b fragment forms a covalent bond with an amino group or hydroxyl group on the microbe surface. The complex between *Sp*C3b and *Sp*Bf alters the conformation of *Sp*Bf that is cleaved by a putative factor D homologue; the serine protease domain of *Sp*Bb is activated and the complex functions as a C3 convertase. It cleaves additional *Sp*C3 then, *Sp*C3b molecules are covalently bound to the surface of the microbe leading to an efficient microbe coating recognized by the phagocytes for uptake and destruction. Thus understanding the sea urchin immune system might led to better elucidate how these defense systems function in the absence (echinoderms) or in the presence (vertebrates) of an adaptive system, and consequently how to draw an evolutionary line between invertebrate and vertebrate complement system.

Complement system in Protostomes

The second group of bilateria, the protostomes, includes several different taxa, characterized by the developmental destiny of blastopore, that becomes the animal mouth, and by the schizocœlic formation of the cœlomic cavity. Belong to this group the ecdysozoans, which is the richest phyla in term of number of species (e.g. Nematodes or Arthropods), and the lophotrochozoans represented by annelids, mollusks and many other phyla. Some recent reports on complement-like molecules evidenced in protostomes are here discussed.

Arthropods

In this group of animals, the lack of the potential complement activation cascade was explained by the absence of some key complement molecules in the related genome as observed in the fruitfly *Drosophila melanogaster* It was suggested that because of their

very short generation time, these animals surely rely on other immune systems effectors against harmful pathogens (1). In *D. melanogaster*, antimicrobial immunity is based on both humoral and cellular innate immune responses. The first one is exerted by antimicrobial peptides (AMPs), while the second one is accomplished through a defensive phagocytosis done by hæmocytes and facilitated by some secreted opsonin such as insect thioester containing proteins (TEPs) (34). *D. melanogaster* genome encodes four TEPs, three of which are upregulated after an immune challenge and these fly TEPs proteins were reported to potentially distinguish different pathogens for subsequent phagocytosis (35). Thus TepII was described for efficient phagocytosis of *E. coli* (but not *C. albicans* or *Staphylococcus aureus*) and TepIII was demonstrated to be required for the efficient phagocytosis of *S. aureus* (but not *C. albicans* or *E. coli*). At the difference of the gram-negative binding proteins (GNBPs) that are highly conserved, some TEP genes (i.e TepI and TepII) were reported to evolve rapidly under positive selection. Theses "bait-like regions" (also known as variable regions) were suggested to be a target of host-parasite coevolution (36). Interestingly, though *D. melanogaster* and the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*, followed independent evolution scenarios as a result of specific adaptation to distinct ecological environments (37). Drosophila and Anopheles TEPs show a closer similarity to mammalian alpha2-macroglobulin than to C3, C4 and C5. Indeed, a novel hemocyte glycoprotein, now identified as TEP1, was characterized from the *Anopheles gambiae* and shown to serve as a complement-like opsonin as well as to promote phagocytosis of some Gram-negative bacteria in a mosquito hemocyte-like cell line (38). Additive experiments led to the demonstration that this TEP1 from the malarial vector *Anopheles gambiae* can mediate recognition and killing of ookinetes from the malarial parasite *Plasmodium berghei*. Moreover combined genome-wide mapping and reciprocal allele-specific RNA interference have underlined the key-role of TEP1 for resistance to malaria (39). Thus the presence in *Drosophila* of several proteins similar to complement C3 makes suggests that an ancient equivalent of the alternative pathway and/or the lectin pathway exists in this species (40). Such thioester proteins were present in ticks. Indeed the primary structure of alpha(2)-macroglobulin from the hard tick *Ixodes ricinus* (*Ir*AM) by sequencing of overlapping PCR products was determined and specific analysis within its 'bait region'

has demonstrated that *Ir*AM is closely related to the alpha(2)-macroglobulin from the soft tick *Ornithodoros moubata*. The *Ir*AM message is expressed in all tick developmental stages and tissues, except for the gut, and the protein was mainly detected in the hemolymph. Interestingly by using dsRNA interference some functional activities of *Ir*AM were evidenced. Thus specific *Ir*AM knock-down markedly reduced the phagocytosis of a potential pathogen, *Chryseobacterium indologenes*, by tick hemocytes both in vitro and in vivo. In contrast, phagocytosis of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* or a commensal bacteria *Staphylococcus xylosus* was not affected (41).

The complement system in two species of horseshoe crab, *Carcinoscorpius rotundicauda* and *Tachypleus tridentatus* was analyzed. C3- and B factor-like cDNAs were isolated from *C. rotundicauda* (42). The predicted primary structure of *Cr*C3 and *Cr*Bf retained most functionally important residues and basic domain structure. *Cr*C3 showed hydroxylamine-sensitive binding to *Staphylococcus aureus* and other bacteria, suggesting the involvement of the *Cr*C3 thioester bond. A C3 homologue was also identified from *Tachypleus tridentatus* (43). In response to LPS stimulation, factor C stored in hæmocytes initiates hæmolymph coagulation, activates the conversion of *Tt*C3 to *Tt*C3b and thus behaves as a C3 convertase on the surface of invading Gram-negative bacteria. However, the complement-dependent clearance system of invading pathogens in horseshoe crabs remains to be elucidated (44). More recently, in haemocytes of tiger shrimp *Penaeus monodon*, an alpha 2-macroglobulin (alpha2-M) sequence was characterized and was shown to contain putative functional domains including a GCGEQNM thioester region, a bait region, and a receptor-binding domain which are present in other invertebrate and vertebrate alpha2-Ms. Alignment of the deduced amino acid sequence to other species alpha2-M showed that the overall structure is evolutionarily conserved and phylogenetic analysis revealed that *P. monodon* alpha2-M is closely related to other arthropod alpha2-M such as kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*, American horseshoe crab *Limulus polyphemus* and mud crab *Scylla serrata*. *P. monodon* alpha2-M mRNA transcripts were significantly increased in haemocytes

following peptidoglycan injection, but returned to their basal level after bacteria derived compound exposure (45).

Nematodes

At difference of other invertebrates, various studies carried out in nematodes failed up to now to clearly identify C1q related or TEP homolog molecules (46). Indeed the C1q domain which represents a common structural motif the C-terminal domains of the A, B, C chains of C1q subcomponent was not identified in the well studied *C. elegans* nematode. As a strict orthology has been retained throughout vertebrate evolution, it was recently suggested that the retention or loss of this gene related family throughout evolution has been sporadic. Other phylogenetic experiments failed to identify homolog elements of the vertebrate classical pathway in *C. elegans*. Only a putative complement component showing a homology to human factor H instead of the α-chain of the C4b binding protein (C4bpα) was clearly characterized. Thus, the ancient evolutionary position of factor H is in agreement with the idea that the alternative pathway of the complement system is older than the classical pathway.

Molluscs

Several studies carried out in the scallop *Chlamys farreri* led to the identification of different molecules related to complement components (47-49). Thus a novel member of C1q-domain-containing protein family, CfC1qDC, was characterized as a potential polypeptide of 178 amino acids, including a signal peptide, a C1q-domain of 158 amino acid sequence and the predicted molecular weight of 17.2 kDa. mRNA transcripts of *Cf*C1qDC were detected in kidney, mantle, adductor muscle and gill and in hemocytes. A significant up-regulation in the expression level of *Cf*C1qDC mRNA was observed after bacterial challenge with *Listonella anguillarum.* Interestingly by using recombinant *E. coli* BL21 expressing the mature peptide of *Cf*C1qDC a binding activity was evidenced for LPS from *E. coli* but no obvious antibacterial or agglutinating activity was detected toward Gram-negative bacteria *E. coli* JM109, *L. anguillarum* and Gram-positive bacteria *Micrococcus luteus*. Thus *Cf*C1qDC was supposed to be involved in the recognition of invading microorganisms probably as a pattern recognition molecule in mollusc and

might be an important pattern recognition receptor in innate immunity of these invertebrates. Another protein, *Cf*lec-3, belonging to the C-type lectin superfamily was studied. The *Cf*lec-3 mRNA was mainly detected in hepatopancreas, adductor, mantle, and marginally in gill, gonad and hemocytes of healthy scallops. After challenge with by *Listonella anguillarum*, the mRNA level of *Cf*lec-3 in hemocytes was up-regulated. The agglutinating activity of Cflec-3 towards Gram-negative bacteria Pseudomonas was shown to be calcium-dependent and inhibited by D-mannose. Finally *Cf*TEP, a new member of thioester-containing protein (TEP) family, was found in scallop *Chlamys farreri* and was demonstrated to be probably involved in innate immunity against invading microbes. The proportion of *Cf*TEP variant transcripts examined in the gonad of scallops after bacterial challenge was shown to be dependent on the nature of the bacteria but also variable according the sex of invertebrate. Thus in this mollusk, the genomic organization of *Cf*TEP appears to be more similar to human and mouse C3 rather than Ciona C3-1 and Drosophila dTEP2.

Recently, the C3 gene has been identified from two other molluscan species. The analyses of an EST database of the light organ of the Hawaiian bobtail squid, *Euprymna scolopes*, revealed the presence of a molecule with similarity to complement C3. Interestingly, this molecule possesses residues and domains known to be essential for C3 function (50). Furthermore, the characterization of C3 and factor B-like proteins was reported in the clam *Ruditapes decussatus* and these proteins are inhibited after bacteria inoculation. This phenomenon may be due to the impact of bacterial products that might block the activities of these complement-like serum proteins as well as their related gene expression as described in humans (51). All these experimental data constitute the first evidence of complement-like molecules in Mollusks.

Annelids

The study of the complement system in Annelids was mainly based on their role in the nervous system. The involvement of some complement components, in vertebrate nervous system protection has been recently suggested (52-54). Experiments were undertaken to identify immune factors that contribute to the microglial cell recruitment

required to efficient nerve cord repair. Unlike vertebrates, some lophotrochozoan can fully repair their CNS following injury.

The medicinal leech *Hirudo medicinalis* constitutes an interesting model in neuroscience because of its tightly defined CNS structure and its ability to functionally regenerate the injured nerve cells. Leech CNS is included in a blood sinus and is constituted by 32 metameric ganglia connected by connectives. Every ganglion contains around 400 neuron cell bodies and 10000-14000 microglial cells. The recruitment of microglial cells at the lesion site is essential for sprouting of injured axons and nerve repair process. From a specific leech nervous system EST library, several molecules having homology with vertebrate complement factors have been identified. One of them, a molecule homologous to vertebrate C1q (*Hm*C1q) was characterized and evidenced in neurons and glial cells by *in situ* hybridization and immunochemistry experiments (55). The *Hm*C1q was demonstrated to have a chemotactic activity on microglial cells as the purified human C1q. The cell recruitment was reduced when microglia was preincubated with signaling pathway inhibitors such as pertussis toxin or wortmannin or anti-gC1qR antibody suggesting the implication of gC1qR in C1q-mediated migration in this model. Using specific anti-*Hm*C1q antibodies, the microglial cell accumulation was highly reduced in *in vitro* and *ex vivo* experiments. For the first time, a molecule homologous to mammalian C1q was characterized in the leech CNS. The results obtained in the leech nerve CNS indicate that complement-like factors are involved in the efficient nerve cord repair following a nervous system injury. In this animal, complement factors seem to preserve its bright side of protection preventing a harmful inflammation caused by the long last complement activation. These findings confirm the interest on using an invertebrate model to explore the origin of the complement system and to evaluate the crucial role that it plays in immune response. MBL and ficolin related molecules were also found in the EST library derived from leech CNS and their possible functional connections with *Hm*C1q are still to be clarified.

Complement system in Cnidarians

Complement components have also been isolated from Cnidarians, a group of diploblastic organisms that are neither protostome nor deuterostome. Two species were relatively well studied for the presence of complement genes. In the sea anemone *Nematostella vectensis* genome, were identified two C3, two B factor and one MASP putative genes. All these genes are expressed in tentacle, pharynx and mesentery endoderm. These results suggest that the sea anemone complement system is simple, composed of only three central components and functions in the body defense in cœlenteron. However, the possibility that other complement genes may be present in sea anemone is suggested (56). The molecular analysis of a gorgonian coral, *Swiftia exserta* allowed characterization of a C3-like gene, *Se*C3. Further studies will address its role and determine whether the coral C3-like protein serves a function analogous to its vertebrate counterpart (57).

Conclusion

In conclusion, the complement system has been one of major players of innate immunity for long time, and upon emergence of adaptive immunity in common ancestor of jawed vertebrates, the complement system established linkage with it. All the data presented above clearly showed that this biological system has a more ancient origin, and almost all major invertebrate groups so far studied possess the complement system. Complement components were so far isolated in cephalochordates, urochordates, echinoderms, annelids, arthropods and in cnidarians as well. The old simplistic idea concerning the evolution of the complement system expanded since its original discovery. We speculate that within time this system is now tightly defined and highly complex. The activation pathways were not that clear in ancient invertebrates as they are now for vertebrates and most of functional mechanisms of the discovered molecules are still unclear. Recent data clearly showed that complement factors are not only present in invertebrates but they also exert vital activities homologous to that of vertebrate's components. As described above and for the first time in invertebrates, a novel *Hm*C1q was identified in the leech nervous system (55) and exhibited a potent chemotactic activity just like the vertebrate's C1q (58). However, we cannot rule out the possibility

that other complement genes are present in invertebrates, that is why further studies must be done in order to draw a clear overview for the whole complement system evolution.

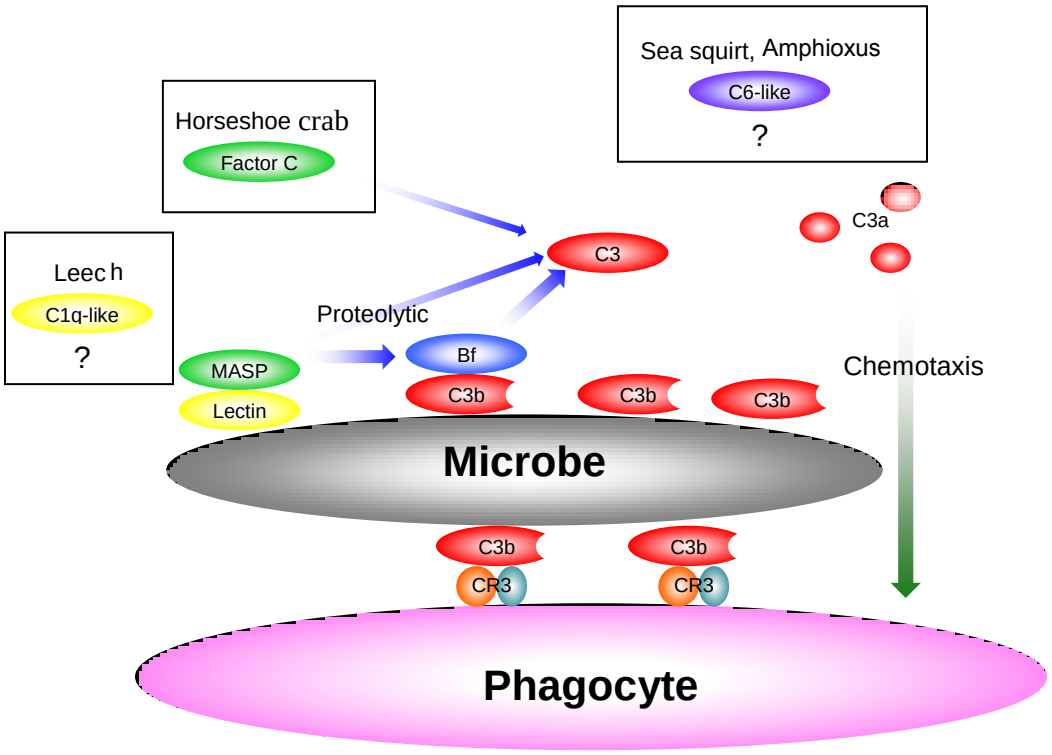


Figure 2: **Hypothetical invertebrates complement system deduced from the draft genome sequences.** Based on structural comparison with the vertebrate counterparts, these possible complement components might act through this putative functional pathway. C activation leads to C3 cleavage so C3b can covalently bind to the microbe which is efficiently destroyed by the phagocyte. The question marks shown above illustrate the points that need further investigations.

References

1. Nonaka, M., and Kimura, A. 2006. Genomic view of the evolution of the complement system. Immunogenetics **58:** 701.
2. Fujita, T., Endo, Y., and Nonaka, M. 2004. Primitive complement system--recognition and activation. Mol Immunol **41:** 103.
3. Smith, L. C., Clow, L. A., and Terwilliger, D. P. 2001. The ancestral complement system in sea urchins. Immunol Rev **180:** 16.
4. Tahtouh, M., Croq, F., Lefebvre, C., and Pestel, J. 2009. Is complement good, bad, or both? New functions of the complement factors associated with inflammation mechanisms in the central nervous system. Eur Cytokine Netw **20:** 95.
5. Nonaka, M., and Yoshizaki, F. 2004. Evolution of the complement system. Mol Immunol **40:** 897.
6. Nonaka, M., and Yoshizaki, F. 2004. Primitive complement system of invertebrates. Immunol Rev **198:** 203.
7. Fujita, T. 2002. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. Nat Rev Immunol **2:** 346.
8. Matsushita, M., and Fujita, T. 1996. The lectin pathway. Res Immunol **147:** 115.
9. Carroll, M. C. 2008. Complement and humoral immunity. Vaccine **26 Suppl 8:** I28.
10. Fujita, T., Matsushita, M., and Endo, Y. 2004. The lectin-complement pathway--its role in innate immunity and evolution. Immunol Rev **198:** 185.
11. Rinkevich, B. 1999. Invertebrates versus vertebrates innate immunity: In the light of evolution. Scand J Immunol **50:** 456.
12. Adoutte, A., Balavoine, G., Lartillot, N., Lespinet, O., Prud'homme, B., and de Rosa, R. 2000. The new animal phylogeny: reliability and implications. Proc Natl Acad Sci U S A **97:** 4453.
13. Bourlat, S. J., Juliusdottir, T., Lowe, C. J., Freeman, R., Aronowicz, J., Kirschner, M., Lander, E. S., Thorndyke, M., Nakano, H., Kohn, A. B., Heyland, A., Moroz, L. L., Copley, R. R., and Telford, M. J. 2006. Deuterostome phylogeny reveals monophyletic chordates and the new phylum Xenoturbellida. Nature **444:** 85.
14. Delsuc, F., Brinkmann, H., Chourrout, D., and Philippe, H. 2006. Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. Nature **439:** 965.
15. Huang, S., Yuan, S., Guo, L., Yu, Y., Li, J., Wu, T., Liu, T., Yang, M., Wu, K., Liu, H., Ge, J., Yu, Y., Huang, H., Dong, M., Yu, C., Chen, S., and Xu, A. 2008. Genomic analysis of the immune gene repertoire of amphioxus reveals extraordinary innate complexity and diversity. Genome Res **18:** 1112.
16. Yu, Y., Huang, H., Wang, Y., Yu, Y., Yuan, S., Huang, S., Pan, M., Feng, K., and Xu, A. 2008. A novel C1q family member of amphioxus was revealed to have a partial function of vertebrate C1q molecule. J Immunol **181:** 7024.
17. Holland, L. Z., Albalat, R., Azumi, K., Benito-Gutierrez, E., Blow, M. J., Bronner-Fraser, M., Brunet, F., Butts, T., Candiani, S., Dishaw, L. J., Ferrier, D. E., Garcia-Fernandez, J., Gibson-Brown, J. J., Gissi, C., Godzik, A., Hallbook, F., Hirose, D., Hosomichi, K., Ikuta, T., Inoko, H., Kasahara, M., Kasamatsu, J., Kawashima, T., Kimura, A., Kobayashi, M., Kozmik, Z., Kubokawa, K., Laudet, V., Litman, G. W., McHardy, A. C., Meulemans, D., Nonaka, M., Olinski, R. P., Pancer, Z., Pennacchio, L. A., Pestarino, M., Rast, J. P., Rigoutsos, I., Robinson-Rechavi, M., Roch, G., Saiga, H., Sasakura, Y., Satake, M., Satou, Y., Schubert, M., Sherwood, N., Shiina, T., Takatori, N., Tello, J., Vopalensky, P., Wada, S., Xu, A., Ye, Y., Yoshida, K., Yoshizaki, F., Yu, J. K., Zhang, Q., Zmasek, C. M., de Jong, P. J., Osoegawa, K., Putnam, N. H., Rokhsar, D. S., Satoh, N., and Holland, P. W. 2008. The amphioxus genome illuminates vertebrate origins and cephalochordate biology. Genome Res **18:** 1100.
18. Liang, Y., Zhang, S., and Wang, Z. 2009. Alternative complement activity in the egg cytosol of amphioxus Branchiostoma belcheri: evidence for the defense role of maternal complement components. PLoS One **4:** e4234.
19. Nonaka, M., Azumi, K., Ji, X., Namikawa-Yamada, C., Sasaki, M., Saiga, H., Dodds, A. W., Sekine, H., Homma, M. K., Matsushita, M., Endo, Y., and Fujita, T. 1999. Opsonic complement component C3 in the solitary ascidian, Halocynthia roretzi. J Immunol **162:** 387.
20. Sekine, H., Kenjo, A., Azumi, K., Ohi, G., Takahashi, M., Kasukawa, R., Ichikawa, N., Nakata, M., Mizuochi, T., Matsushita, M., Endo, Y., and Fujita, T. 2001. An ancient lectin-dependent

complement system in an ascidian: novel lectin isolated from the plasma of the solitary ascidian, Halocynthia roretzi. J Immunol **167:** 4504.

21. Kenjo, A., Takahashi, M., Matsushita, M., Endo, Y., Nakata, M., Mizuochi, T., and Fujita, T. 2001. Cloning and characterization of novel ficolins from the solitary ascidian, Halocynthia roretzi. J Biol Chem **276:** 19959.
22. Ji, X., Azumi, K., Sasaki, M., and Nonaka, M. 1997. Ancient origin of the complement lectin pathway revealed by molecular cloning of mannan binding protein-associated serine protease from a urochordate, the Japanese ascidian, Halocynthia roretzi. Proc Natl Acad Sci U S A **94:** 6340.
23. Miyazawa, S., Azumi, K., and Nonaka, M. 2001. Cloning and characterization of integrin alpha subunits from the solitary ascidian, Halocynthia roretzi. J Immunol **166:** 1710.
24. Miyazawa, S., and Nonaka, M. 2004. Characterization of novel ascidian beta integrins as primitive complement receptor subunits. Immunogenetics **55:** 836.
25. Azumi, K., De Santis, R., De Tomaso, A., Rigoutsos, I., Yoshizaki, F., Pinto, M. R., Marino, R., Shida, K., Ikeda, M., Ikeda, M., Arai, M., Inoue, Y., Shimizu, T., Satoh, N., Rokhsar, D. S., Du Pasquier, L., Kasahara, M., Satake, M., and Nonaka, M. 2003. Genomic analysis of immunity in a Urochordate and the emergence of the vertebrate immune system: "waiting for Godot". Immunogenetics **55:** 570.
26. Bonura, A., Vizzini, A., Salerno, G., Parrinello, N., Longo, V., and Colombo, P. 2009. Isolation and expression of a novel MBL-like collectin cDNA enhanced by LPS injection in the body wall of the ascidian Ciona intestinalis. Mol Immunol **46:** 2389.
27. Marino, R., Kimura, Y., De Santis, R., Lambris, J. D., and Pinto, M. R. 2002. Complement in urochordates: cloning and characterization of two C3-like genes in the ascidian Ciona intestinalis. Immunogenetics **53:** 1055.
28. Pinto, M. R., Chinnici, C. M., Kimura, Y., Melillo, D., Marino, R., Spruce, L. A., De Santis, R., Parrinello, N., and Lambris, J. D. 2003. CiC3-1a-mediated chemotaxis in the deuterostome invertebrate Ciona intestinalis (Urochordata). J Immunol **171:** 5521.
29. Ballarin, L., Scanferla, M., Cima, F., and Sabbadin, A. 2002. Phagocyte spreading and phagocytosis in the compound ascidian Botryllus schlosseri: evidence for an integrin-like, RGD-dependent recognition mechanism. Dev Comp Immunol **26:** 345.
30. Gasparini, F., Franchi, N., Spolaore, B., and Ballarin, L. 2008. Novel rhamnose-binding lectins from the colonial ascidian Botryllus schlosseri. Dev Comp Immunol **32:** 1177.
31. Bourlat, S. J., Rota-Stabelli, O., Lanfear, R., and Telford, M. J. 2009. The mitochondrial genome structure of Xenoturbella bocki (phylum Xenoturbellida) is ancestral within the deuterostomes. BMC Evol Biol **9:** 107.
32. Smith, L. C. 2001. The complement system in sea urchins. Adv Exp Med Biol **484:** 363.
33. Smith, L. C., Shih, C. S., and Dachenhausen, S. G. 1998. Coelomocytes express SpBf, a homologue of factor B, the second component in the sea urchin complement system. J Immunol **161:** 6784.
34. Lazzaro, B. P. 2008. Natural selection on the Drosophila antimicrobial immune system. Curr Opin Microbiol **11:** 284.
35. Stroschein-Stevenson, S. L., Foley, E., O'Farrell, P. H., and Johnson, A. D. 2006. Identification of Drosophila gene products required for phagocytosis of Candida albicans. PLoS Biol **4:** e4.
36. Jiggins, F. M., and Kim, K. W. 2006. Contrasting evolutionary patterns in Drosophila immune receptors. J Mol Evol **63:** 769.
37. Blandin, S., and Levashina, E. A. 2004. Thioester-containing proteins and insect immunity. Mol Immunol **40:** 903.
38. Levashina, E. A., Moita, L. F., Blandin, S., Vriend, G., Lagueux, M., and Kafatos, F. C. 2001. Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, Anopheles gambiae. Cell **104:** 709.
39. Blandin, S. A., Wang-Sattler, R., Lamacchia, M., Gagneur, J., Lycett, G., Ning, Y., Levashina, E. A., and Steinmetz, L. M. 2009. Dissecting the genetic basis of resistance to malaria parasites in Anopheles gambiae. Science **326:** 147.
40. Lagueux, M., Perrodou, E., Levashina, E. A., Capovilla, M., and Hoffmann, J. A. 2000. Constitutive expression of a complement-like protein in toll and JAK gain-of-function mutants of Drosophila. Proc Natl Acad Sci U S A **97:** 11427.

41. Buresova, V., Hajdusek, O., Franta, Z., Sojka, D., and Kopacek, P. 2009. IrAM-An alpha2-macroglobulin from the hard tick Ixodes ricinus: characterization and function in phagocytosis of a potential pathogen Chryseobacterium indologenes. Dev Comp Immunol **33:** 489.
42. Zhu, Y., Thangamani, S., Ho, B., and Ding, J. L. 2005. The ancient origin of the complement system. Embo J **24:** 382.
43. Ariki, S., Takahara, S., Shibata, T., Fukuoka, T., Ozaki, A., Endo, Y., Fujita, T., Koshiba, T., and Kawabata, S. 2008. Factor C acts as a lipopolysaccharide-responsive C3 convertase in horseshoe crab complement activation. J Immunol **181:** 7994.
44. Conrad, M. L., Pardy, R. L., Wainwright, N., Child, A., and Armstrong, P. B. 2006. Response of the blood clotting system of the American horseshoe crab, Limulus polyphemus, to a novel form of lipopolysaccharide from a green alga. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol **144:** 423.
45. Lin, Y. C., Vaseeharan, B., Ko, C. F., Chiou, T. T., and Chen, J. C. 2007. Molecular cloning and characterisation of a proteinase inhibitor, alpha 2-macroglobulin (alpha2-M) from the haemocytes of tiger shrimp Penaeus monodon. Mol Immunol **44:** 1065.
46. Tom Tang, Y., Hu, T., Arterburn, M., Boyle, B., Bright, J. M., Palencia, S., Emtage, P. C., and Funk, W. D. 2005. The complete complement of C1q-domain-containing proteins in Homo sapiens. Genomics **86:** 100.
47. Zhang, H., Song, L., Li, C., Zhao, J., Wang, H., Qiu, L., Ni, D., and Zhang, Y. 2008. A novel C1q-domain-containing protein from Zhikong scallop Chlamys farreri with lipopolysaccharide binding activity. Fish Shellfish Immunol **25:** 281.
48. Zhang, H., Song, X., Wang, L., Kong, P., Yang, J., Liu, L., Qiu, L., Zhang, Y., Qiu, L., and Song, L. 2009. AiCTL-6, a novel C-type lectin from bay scallop Argopecten irradians with a long C-type lectin-like domain. Fish Shellfish Immunol.
49. Zhang, H., Wang, L., Song, L., Zhao, J., Qiu, L., Gao, Y., Song, X., Li, L., Zhang, Y., and Zhang, L. 2009. The genomic structure, alternative splicing and immune response of Chlamys farreri thioester-containing protein. Dev Comp Immunol **33:** 1070.
50. Castillo, M. G., Goodson, M. S., and McFall-Ngai, M. 2009. Identification and molecular characterization of a complement C3 molecule in a lophotrochozoan, the Hawaiian bobtail squid Euprymna scolopes. Dev Comp Immunol **33:** 69.
51. Prado-Alvarez, M., Rotllant, J., Gestal, C., Novoa, B., and Figueras, A. 2009. Characterization of a C3 and a factor B-like in the carpet-shell clam, Ruditapes decussatus. Fish Shellfish Immunol **26:** 305.
52. Jauneau, A. C., Ischenko, A., Chan, P., and Fontaine, M. 2003. Complement component anaphylatoxins upregulate chemokine expression by human astrocytes. FEBS Lett **537:** 17.
53. Ramaglia, V., Daha, M. R., and Baas, F. 2008. The complement system in the peripheral nerve: friend or foe? Mol Immunol **45:** 3865.
54. Speth, C., Dierich, M. P., and Gasque, P. 2002. Neuroinvasion by pathogens: a key role of the complement system. Mol Immunol **38:** 669.
55. Tahtouh, M., Croq, F., Vizioli, J., Sautiere, P. E., Van Camp, C., Salzet, M., Daha, M. R., Pestel, J., and Lefebvre, C. 2009. Evidence for a novel chemotactic C1q domain-containing factor in the leech nerve cord. Mol Immunol **46:** 523.
56. Kimura, A., Sakaguchi, E., and Nonaka, M. 2009. Multi-component complement system of Cnidaria: C3, Bf, and MASP genes expressed in the endodermal tissues of a sea anemone, Nematostella vectensis. Immunobiology **214:** 165.
57. Dishaw, L. J., Smith, S. L., and Bigger, C. H. 2005. Characterization of a C3-like cDNA in a coral: phylogenetic implications. Immunogenetics **57:** 535.
58. Vegh, Z., Kew, R. R., Gruber, B. L., and Ghebrehiwet, B. 2006. Chemotaxis of human monocyte-derived dendritic cells to complement component C1q is mediated by the receptors gC1qR and cC1qR. Mol Immunol **43:** 1402.

Caractérisation de *Hm*C1q : un nouveau facteur chimiotactique contenant le domaine C1q dans le système nerveux de la sangsue *Hirudo medicinalis*

1. La réponse microgliale.

Afin d'assurer sa protection contre d'éventuels agents microbiens, le SNC des vertébrés est capable de mettre en place une réponse immunitaire innée très élaborée. Les cellules microgliales constituent l'une des populations cellulaires les plus importantes impliquées dans la protection immunitaire du SNC. Suite à une lésion de ce dernier, ces cellules sentinelles seront activées par de nombreux stimuli inflammatoires [Nakamura et al., 1999; Piehl and Lidman, 2001]. Après être devenues amiboïdes, elles seront recrutées vers les sites de lésion où elles participent à l'élimination des débris cellulaires et des corps apoptotiques [Aloisi, 2001; Hanisch, 2002]. Les cellules microgliales activées sont impliquées dans les mécanismes de neuroinflammation en synthétisant un large panel de molécules pro-inflammatoires [Nakamura, 2002; Qin et al., 2006] et de nombreux facteurs qui contrôlent la réponse immunitaire innée [Kielian, 2004].

Vu la complexité du SNC des vertébrés et son incapacité à régénérer efficacement suite à une lésion, le recours à des modèles invertébrés plus simples et capables de réparer efficacement leur tissu nerveux endommagé, semble constituer une alternative intéressante. Ceci pourrait apporter des informations essentielles à la compréhension de l'implication des cellules microgliales dans l'initiation et le contrôle de la neuroinflammation, phénomène nécessaire pour la réparation nerveuse.

Au sein de notre équipe au Laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides, nous avons choisi de travailler sur un modèle invertébré bien connu en neurobiologie et capable de réparer efficacement son système nerveux suite à une lésion [Baylor and Nicholls, 1971; Jansen and Nicholls, 1972], la sangsue *Hirudo medicinalis*. L'approche expérimentale choisie a consisté à prélever une partie de la chaîne nerveuse afin de n'observer au cours de la réponse à une lésion expérimentale que le recrutement des

cellules microgliales. En effet, l'étude de ce système nerveux *in vitro* permet d'évaluer la cinétique ainsi que l'intensité du recrutement microglial en faisant abstraction de l'infiltration possible des cellules sanguines à l'intérieur de la chaîne nerveuse. Cette particularité représente un avantage significatif comparé à la complexité structurale mais aussi cellulaire de la réponse inflammatoire chez les mammifères. Comme chez les vertébrés, les cellules microgliales de la sangsue s'accumulent rapidement au niveau du site de lésion [Babington et al., 2005; Morgese et al., 1983]. De plus, une étude récente montre que leur accumulation au site de la blessure est essentielle à la repousse axonale [Ngu et al., 2007]. En effet, une accumulation des cellules microgliales (Figure 14) est observée par un marquage nucléaire 3 heures après la lésion des connectifs (A). En parallèle, une reconnexion synaptique est mise en évidence (B). L'ATP, libéré suite à la lésion de la chaine nerveuse, est un activateur des cellules microgliales à des basses concentrations. A l'inverse, des concentrations plus élevées d'ATP causent la réduction de la migration de la microglie au site de lésion [Duan et al., 2003]. En effet, l'administration de 3 mM d'ATP a significativement réduit le taux d'accumulation des cellules microgliales au niveau du site de lésion (C). De manière intéressante, ceci a nettement retardé la reconnexion synaptique (D). Par ailleurs, l'action de l'ATP se limite, dans ces expériences, à l'inhibition du recrutement microglial et non à un effet indirect sur les axones lésés. En effet, une injection tardive d'ATP quand les cellules microgliales sont déjà accumulées au site de lésion ne perturbe pas la cinétique de reconnexion synaptique. Ce résultat met donc en évidence le rôle primordial de l'accumulation des cellules microgliales dans le phénomène de la réparation axonale chez la sangsue médicinale [Ngu et al., 2007].

Afin de déterminer l'identité des facteurs neuronaux responsables de l'accumulation des cellules microgliales chez la sangsue, une recherche dans les banques d'EST de système nerveux de *Hirudo medicinalis* a été entreprise. En effet, chez les vertébrés, les cellules microgliales activées participent à la mise en place d'une réponse immunitaire innée au niveau du SNC, notamment par leur capacité à produire et à réagir à de nombreuses cytokines pro-inflammatoires [Hanisch, 2002; Hanisch and Kettenmann, 2007]. C'est pourquoi, notre attention s'est portée sur la présence dans les banques EST

de molécules pouvant être apparentées à des facteurs chimiotactiques. Nous avons dans un premier temps privilégié l'étude d'une molécule contenant le domaine C1q.

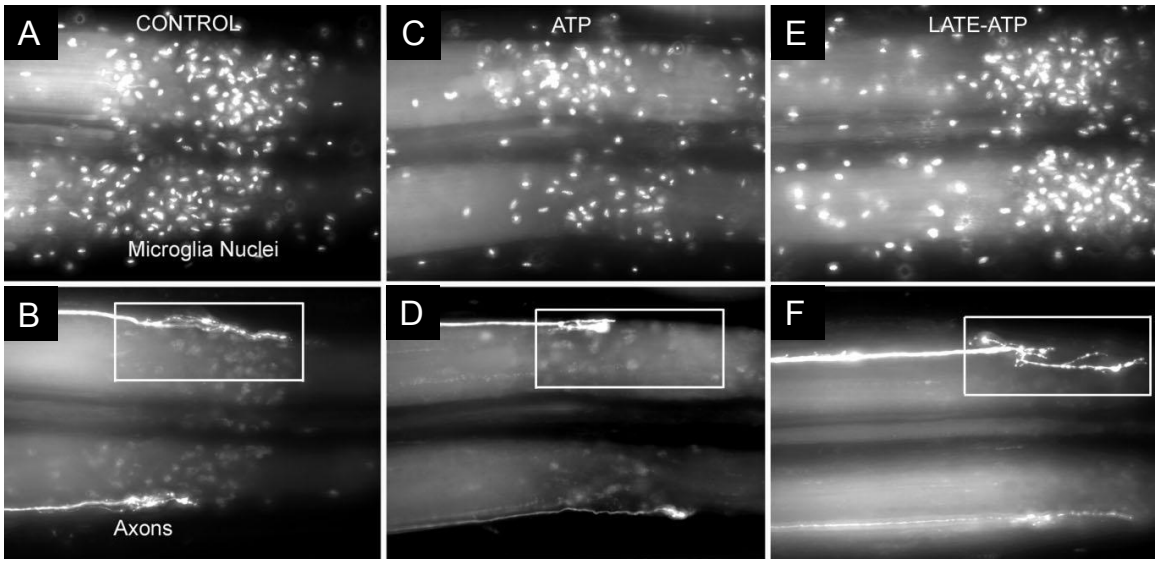


Figure 14: **L'accumulation des cellules microgliales au site de lésion est indispensable à la repousse neuronale** [Ngu et al., 2007]. Le déplacement des cellules microgliales est observé à l'aide d'un marquage nucléaire (A,C,E). La repousse axonale est mesurée dans le cadre représenté (B,D,F). Dans le contrôle, la blessure est effectuée seule (A-B). Le traitement ATP normal est réalisé 30 minutes avant la blessure et se poursuit encore durant 3 heures post-lésion (C-D). Le traitement ATP tardif dure également 3 heures et 30 minutes mais ne commence que 3 heures après la blessure (E-F). Les images correspondent à la zone de blessure.

2. La molécule C1q chez les mammifères.

Parmi les facteurs exprimés par les cellules microgliales et les neurones, la sous-unité C1q semble jouer un rôle clef dans certaines maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer [Bergamaschini et al., 2001; Tacnet-Delorme et al., 2001] et dans des maladies autoimmunes comme le lupus systémique érythémateux [Flierman and Daha, 2007; Trendelenburg, 2005]. En effet, C1q participe à l'élimination des cellules apoptotiques par les phagocytes [Fishelson et al., 2001; Nauta et al., 2002; Trouw et al., 2008]. En absence d'opsonisation, les cellules apoptotiques peuvent rester plus longtemps dans l'organisme et stimuler la production d'auto-anticorps conduisant à une réaction inflammatoire exacerbant la maladie en question [Botto, 1998; Botto, 2001; Botto and Walport, 2002]. C1q participe également au recrutement des cellules immunitaires effectrices dotées de récepteurs spécifiques au C1q (C1q binding proteins ou C1qBP)

[Vegh et al., 2006]. Pris ensemble, ces données indiquent que les cellules microgliales, en présence des cytokines et des molécules du complément dont le C1q, contrôlent la neuroinflammation au niveau du SNC.

3. La molécule apparentée au C1q chez la sangsue.

Afin d'étudier au sein du SNC de la sangsue médicinale, la molécule contenant le domaine C1q et d'évaluer son implication dans l'accumulation des cellules microgliales, un ensemble de questions s'est posé et a permis de dresser un schéma clair des objectifs à atteindre ainsi qu'une stratégie expérimentale pour y parvenir.

a) Quelle similitude présente le C1q de sangsue avec les C1q connus. Peut-on effectuer une analyse phylogénétique en mettant en relief les domaines conservés et les homologies avec les autres espèces.

Objectif : Caractérisation de la séquence complète de la molécule contenant le domaine globulaire C1q (gC1q) retrouvée dans les banques EST de la sangsue Hirudo medicinalis par des techniques de biologie moléculaire telles que la RACE RT-PCR, clonage et séquençage des séquences nucléotidiques amplifiées.

b) Une molécule C1q peut-elle exercer une activité de recrutement des cellules microgliales chez la sangsue?

Objectif : Mesurer les effets dose-dépendants du C1q sur l'accumulation cellulaire. Pour cela, utilisation de la forme recombinante du C1q humain comme facteur chimioattractant dans des tests de chimiotactisme sur les cellules microgliales de sangsue.

c) Le facteur apparenté au C1q chez la sangsue (nommé par la suite *Hm*C1q) est-il libéré à la suite de la lésion pour exercer un rôle de chimiokine sur les cellules microgliales?

Objectif : Rechercher HmC1q dans le milieu de culture ayant incubé la chaîne nerveuse lésée. Mesurer les effets de ce milieu conditionné sur l'accumulation microgliale et les conséquences d'une neutralisation de HmC1q sur la migration cellulaire. Pour cela, l'activité chimiotactique du milieu conditionné sur la microglie de sangsue sera évaluée. La même expérience sera réalisée sur des cellules incubées avec un anticorps spécifique anti-HmC1q.

Afin de répondre en partie à ces questions, la production d'un anticorps spécifique s'est avèré indispensable et fut réalisée à façon par la société Agro-Bio. Cet anticorps polyclonal anti-HmC1q fait chez le lapin permettra, en partie, d'étudier l'activité de HmC1q.

d) Quelles populations cellulaires sont responsables de l'activation microgliale par les facteurs chimioattractants? Les neurones endommagés sont-ils capables de déclencher un message d'alerte en produisant les facteurs chimiotactiques responsables de l'accumulation des cellules microgliales?

Objectif : Localisation des ARNm et de la protéine dans le SNC afin de préciser les cellules impliquées dans l'accumulation microgliale suite à une lésion. Des ribosondes construites sur la base du gène HmC1q seront utilisées dans des expériences d'hybridation in situ pour localiser les ARNm. L'anticorps polyclonal anti-HmC1q assurera quant à lui un bon suivi de la protéine et des populations cellulaires intervenant dans l'accumulation microgliale.

e) La protéine *Hm*C1q est-elle inductible après la lésion?

Objectif : Établir une comparaison des niveaux de transcrits sur des coupes de SNC lésés fixées après des délais croissants. Puisque les cellules exprimant le gène HmC1q sont disséminées dans le système nerveux, il est préférable de comparer qualitativement des tissus identiques au cours du temps de réponse à la lésion. L'analyse quantitative utilisant par exemple la PCR quantitative serait compromise par les ARNm issus de cellules ne répondant pas à la blessure mais possédant tout de même une expression

basale du dit-gène. C'est pourquoi, une stratégie reposant sur des expériences d'hybridation in situ nous permettra d'évaluer la présence d'une induction au cours de la réponse.

f) Quelles sont les cellules sensibles au facteur *Hm*C1q? Selon quels mécanismes *Hm*C1q peut-il interagir avec ces cellules microgliales pour les recruter? Y a t- il une structure réceptrice apparentée au récepteur connu du C1q chez les mammifères (gC1qR)?

Objectif : Définir s'il existe une sous-population microgliale sensible à la présence de HmC1q. Rechercher chez ce sous-type microglial la présence d'un récepteur particulier permettant à ce facteur de conduire au recrutement des cellules microgliales. Dans un premier temps, l'utilisation d'anticorps anti-gC1qR humain pourra venir compléter les outils moléculaires afin de neutraliser les voies de signalisation normalement utilisées par les cellules microgliales activées par HmC1q. Dans ces expériences, l'activation sera réalisée avec du C1q humain. L'impact sur le recrutement sera alors mesuré. Ensuite, des analyses moléculaires réalisées à partir des banques EST de système nerveux de sangsue permettront de rechercher l'existence de transcrits apparentés à ceux de tels récepteurs connus chez les mammifères.

Publication n°3

Evidence for a novel chemotactic C1q domain-containing factor in the leech nerve cord

Acceptée pour publication dans Molecular Immunology et publiée en octobre 2008.

Evidence for a novel chemotactic C1q domain-containing factor in the leech nerve cord

Muriel Tahtouh[a], Françoise Croq[a], Jacopo Vizioli[a], Pierre-Eric Sautiere[a], Christelle Van Camp[a], Michel Salzet[a], Mohamed R. Daha[b], Joël Pestel[a,*,1], Christophe Lefebvre[a,1]

[a] *Université de Lille 1 (USTL), Laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides, Centre National de la Recherche Scientifique, FRE 2933, IFR 147, F59655 Villeneuve d'Ascq, France*
[b] *Department of Nephrology, Leiden University Medical Center, Postbox 9600, Leiden 2300 RC, The Netherlands*

ARTICLE INFO

Article history:
Received 23 June 2008
Received in revised form 15 July 2008
Accepted 15 July 2008
Available online 25 October 2008

Keywords:
C1q
Chemotaxis
Microglial cells
Leech
Nerve cord repair
Innate immunity

ABSTRACT

In vertebrates, central nervous system (CNS) protection is dependent on many immune cells including microglial cells. Indeed, activated microglial cells are involved in neuroinflammation mechanisms by interacting with numerous immune factors. Unlike vertebrates, some lophotrochozoan invertebrates can fully repair their CNS following injury. In the medicinal leech *Hirudo medicinalis*, the recruitment of microglial cells at the lesion site is essential for sprouting of injured axons. Interestingly, a new molecule homologous to vertebrate C1q was characterized in leech, named *Hm*C1q (for *H. medicinalis*) and detected in neurons and glial cells. In chemotaxis assays, leech microglial cells were demonstrated to respond to human C1q. The chemotactic activity was reduced when microglia was preincubated with signaling pathway inhibitors (Pertussis Toxin or wortmannin) or anti-human gC1qR antibody suggesting the involvement of gC1qR in C1q-mediated migration in leech. Assays using cells preincubated with NO chelator (cPTIO) showed that C1q-mediated migration was associated to NO production. Of interest, by using anti-*Hm*C1q antibodies, *Hm*C1q released in the culture medium was shown to exhibit a similar chemotactic effect on microglial cells as human C1q.

In summary, we have identified, for the first time, a molecule homologous to mammalian C1q in leech CNS. Its chemoattractant activity on microglia highlights a new investigation field leading to better understand leech CNS repair mechanisms.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In vertebrates, the microglial cell is considered as one of the most important cells involved in the immune protection of the central nervous system (CNS). Following CNS injury, these quiescent cells are activated by numerous inflammatory stimuli (Nakamura et al., 1999; Piehl and Lidman, 2001), become amoeboid and are recruited to the lesion sites where they participate in the elimination of cellular debris and apoptotic bodies (Aloisi, 2001; Hanisch, 2002). Activated microglial cells are involved in neuroinflammation mechanisms by synthesizing a large panel of pro-inflammatory mediators (Nakamura, 2002; Qin et al., 2006) and numerous factors that control the innate immune response (Kielian, 2004).

Among the mediators expressed by microglial cells and neurons, the subunit C1q belonging to C1 complement factor seems to be a key-molecule in neuroinflammatory diseases, *i.e.* systemic lupus erythematosus (Flierman and Daha, 2007; Trendelenburg, 2005). Indeed, C1q was described to opsonise apoptotic cells for clearance by phagocytes (Fishelson et al., 2001; Nauta et al., 2002; Trouw et al., 2008). In the absence of such opsonization (*e.g.* in C1q or C4 deficiency), apoptotic cells may remain longer in the body and stimulate autoantibody production or undergo pro-inflammatory secondary necrosis (Botto, 1998, 2001; Botto and Walport, 2002). Studies in C1q-deficient mice have shown the presence of a large number of apoptotic bodies in CNS (Botto, 1998, 2001; Botto and Walport, 2002). C1q was also involved in various neurodegenerative pathologies as Alzheimer disease (Bergamaschini et al., 2001; Tacnet-Delorme et al., 2001). Following exposure to the amyloid beta peptide, microglial cells exhibit chemotactic migration in order to remove the peptide, but this interaction might be inhibited by C1q (Webster et al., 2000). Thus in vertebrate CNS, innate immune interactions between C1q and microglial cells may be crucial in the regulation of neuroinflammation dependent diseases.

* Corresponding author. Université Lille1, CNRS Fre 2933, Bâtiment SN3. Tel.: +33 320 335 942; fax: +33 320 434 054.
E-mail address: joel.pestel@univ-lille1.fr (J. Pestel).
[1] The authors supervised equally this work.

0161-5890/$ – see front matter © 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.molimm.2008.07.026

In addition, chemotactic properties of C1q were demonstrated for dendritic cells. Of interest, their migration is mediated through recognition of different types of C1q binding proteins (Vegh et al., 2006).

Unlike vertebrates, some lophotrochozoan invertebrates can fully repair their CNS following injury (experimental crush or section). The medicinal leech *Hirudo medicinalis* is a recognized model in neuroscience. Indeed, previous studies reported that the medicinal leech CNS can be efficiently regenerated (Baylor and Nicholls, 1971; Jansen and Nicholls, 1972).

During this repair, a microglial cell accumulation at the lesion site is observed (Morgese et al., 1983; von Bernhardi and Muller, 1995), as similarly described in mammals. Recent studies in leech strongly suggest that microglial cells are essential for the usual sprouting of injured axons (Ngu et al., 2007). In order to characterize potential immune factors involved in the recruitment of the microglial cell population, analyses of Expressed Sequence Tag (EST) library established from leech CNS were carried out. A molecule having significant homology with vertebrate C1q has been characterized. In the present study, we identified a *H. medicinalis* C1q domain containing (C1qDC) factor named *Hm*C1q (Genbank Accession number, EU581715). Interestingly, we demonstrated its implication in the recruitment of leech microglial cells following experimental injury by using *in vitro* chemotaxis assays.

2. Materials and methods

2.1. Leech central nervous system structure

The medicinal leech *H. medicinalis* is well studied in neurobiology because the CNS structure is tightly defined (Coggeshall and Fawcett, 1964). Leech CNS is included in a blood sinus and is constituted by 32 metameric ganglia connected by connectives. Fig. 1 schematically represents a dorsal view of typical midbody ganglion which contains around 400 neuron cell bodies separated in 6 groups each one enveloped by a packet glial cell. Their axonal processes and neuritic trees pass through the neuropil containing two macroglial cells (Coggeshall and Fawcett, 1964). Leech CNS contains microglial cells distributed all along the nerve cord. Their number is about 10 000–14 000 for each ganglion and about 2000 for each connective (Morgese et al., 1983). The endothelial layer present at the surface of the nerve cord constitutes an important exchange area with blood of the surrounding sinus.

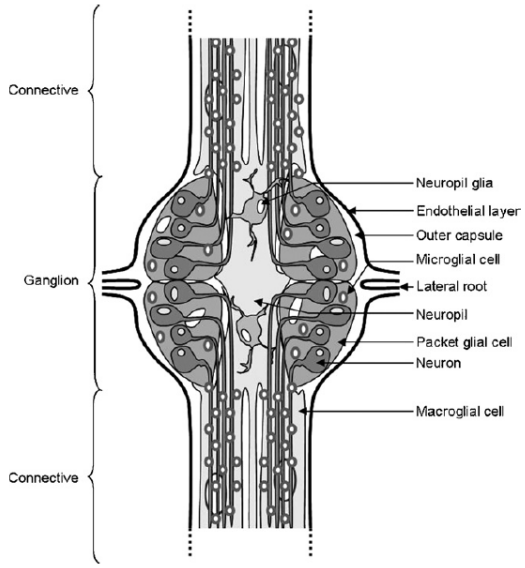


Fig. 1. Diagram of ganglion from leech CNS. The dorsal view of the ganglion shows four of the six packet glial cells enveloping neuron cell bodies. The axonal processes pass through the neuropil and are prolonged into connectives. The neuropil lies dorso-medially and has two macroglial cells. Microglial cells are distributed in ganglia and connectives. The nervous system is enclosed in the outer capsule which is covered on the outside by a visceral layer of the endothelium (lining the ventral blood sinus).

2.2. Leech CNS preparation

H. medicinalis adult leeches were obtained from Ricarimpex (Eysines, France). After anesthesia in 10% ethanol at 4 °C for 15 min, animal CNS (nerve cords) were dissected out in a sterile Ringer solution (115 mM NaCl, 1.8 mM $CaCl_2$, 4 mM KCl, 10 mM Tris maleate, pH 7.4) under a laminar flow hood. After isolation, samples were placed in 3 successive baths of antibiotics (100 UI/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin and 100 μg/ml gentamycin) for 15 min and further incubated in Leibovitz L-15 medium (Gibco, Invitrogen) complemented with 2 mM L-glutamin, 0.6% glucose and 10 mM Hepes (complete medium). The experimental injury was performed by crushing or cutting one of the two connectives between third and fourth ganglia. Then, *in situ* hybridization and immunohistochemical analyses were performed at several time points (T = 0 h or T = 6 h).

2.3. Microglial cell preparation

Nerve cords were placed in 35 mm Petri dishes with 200 μl of complete L-15 medium. Each ganglion was carefully decapsulated by removing the collagen layer enveloping the nerve cord with microscissors. Nerve cells, neurons (10–70 μm) and microglial cells (5 μm), were mechanically resuspended by gentle scraping and filtered through a 7 μm nylon mesh. The enriched microglial cell population was then collected according to the size and centrifuged at 1000 × *g* for 10 min at room temperature (RT). The cell pellet was resuspended in complete medium (100 μl per nerve cord) for migration assays.

2.4. Conditioned medium (CM) preparation

Eight nerve cords which have been crushed or cut were cultured during 24 h as described above. The medium (500 μl) was then centrifuged 20 min at 1000 × *g* to eliminate cells and tissues. The supernatant was finally used as conditioned medium (CM) for western blot and chemotaxis experiments.

2.5. Molecular characterization

Partial cDNA sequence of interest was completed by 5′ RACE PCR. *H. medicinalis* total RNA were prepared to construct a RACE cDNA library using BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit following manufacturer's protocol (Clontech). Reverse transcription was performed using antisense primers deduced from EST sequence (C1q-Rv 5′-TCAAAACGTCCTCATCCATCGTCA-3′). PCR amplifications were performed with an elongation time of 5 min. Selected PCR products were ligated into PGEM T-easy vector and cloned into JM109 cells according to the manufacturer's instructions (Promega). Finally, products were sequenced using the BigDye Terminator v3.0 polymerization kit before detection on the ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). BLAST programs

were used for sequence analysis (Altschul et al., 1997; Karlin and Altschul, 1990).

2.6. Fluorescent in situ hybridization (FISH)

Nerve cords were fixed for an hour at 4 °C in 4% paraformaldehyde just after dissection or 6 h after incubation in complete L-15 medium. 5' biotin labeled specific antisense probes and sense probe (negative control) were generated from a linearized cDNA plasmid by *in vitro* transcription using DIG/Biotin RNA-labeling kit according to the manufacturer's instructions (Roche). The hybridization protocol was followed as previously described (Nardelli-Haefliger and Shankland, 1992). Nerve cords were incubated with a secondary anti-biotin antibody conjugated to Alexa Fluor 488 (Invitrogen) diluted 1:5000 in PBS, rinsed with PBS and finally mounted with Glycergel (Sigma Life Science). Samples were kept at 4 °C in the dark until observation with a Zeiss LSM 510 Laser Scanning Confocal Microscope.

2.7. Western blotting

CNS protein extract analysis was performed from 10 nerve cords as previously described (Vergote et al., 2006). Twenty-five micrograms of proteins were loaded onto SDS-PAGE. Immunoblot analyses were also carried out using purified conditioned medium as follow. CM (500 μl) was acidified with 0.1% Trifluoroacetic Acid (TFA) and proteins were prepurified on SepPak C18 cartridge (Waters). Elution was performed with 50% acidified acetonitrile (0.1% TFA). The fraction was then dried and reconstituted in 20 μl of Læmmli buffer before loading onto the SDS-PAGE. It was performed according to Tastet and collaborators with a 12% acrylamide running gel and a 4% acrylamide stacking gel (Tastet et al., 2003). Migration was performed using a cathode buffer (0.6% Tris base, 2.5% Taurine, and 0.1% SDS) and an anode buffer (0.6% Tris base, 2.8% Glycine, and 0.1% SDS). Gels ran at 70 V for 15 min and at 120 V for 45 min. Separated proteins were transferred to Nitrocellulose Transfer Membrane Protran® BA 83 (Schleicher & Schuell) by electroblotting. After preincubation in blocking solution (BS) (PBS containing 0.05% Tween 20 and 2% ovalbumin fraction V) membranes were incubated overnight at 4 °C with specific antisera: mouse monoclonal anti-human gC1qR (Santa Cruz Biotechnologies), rabbit polyclonal anti-*Hm*C1q or pre-immune serum (dilution 1:1000 in BS). Specific rabbit polyclonal anti-*Hm*C1q antibodies were raised using a synthetic peptide corresponding to predicted His_{197}-Thr_{212} region of *Hm*C1q protein (Agrobio). After three PBS washes, goat anti-rabbit or anti-mouse IgG antibodies conjugated with horseradish peroxidase (dilution 1:20 000) (Jackson Immunoresearch) were added for 1 h at RT. The final washes were performed in PBS and immunolabelled proteins were revealed with the ECL Kit SuperSignal West Pico Chemoluminescent Substrate (Pierce) and Kodak® X-Omat LS film (Sigma–Aldrich).

2.8. Immunohistochemistry

In experiments with anti-human C1q antibody, analyses were performed on dissociated nerve cells (see above), cytocentrifuged (Shandon Cytospin® 3) at RT for 8 min at 2000 × *g* on poly-L-lysine-coated slides and stored at 4 °C. Nerve cords or dissociated nerve cells were fixed for 60 min at 4 °C in 4% paraformaldehyde just after dissection or 6 h after incubation in complete L-15 medium. Fixed samples were washed in PBS, permeabilized by a 24 h-incubation at RT in 1% Triton X100 in PBS and preincubated for 8 h at RT in 1% Triton, 3% Normal Donkey Serum (NDS) and 1% Ovalbumin in PBS. Samples were then incubated overnight at 4 °C with rabbit polyclonal anti-*Hm*C1q antibodies (1:5000) or rabbit polyclonal anti-human C1q antibodies diluted in PBS containing 1% BSA, 0.05% Triton, 1% NDS and 1% ovalbumin. After three washes with PBS, donkey anti-rabbit IgG antibody (Invitrogen) conjugated to Alexa Fluor 488 was added. Secondary antibodies incubation, sample mounting and confocal microscope observation were performed as for FISH experiments. Samples without the addition of primary antibody were used as negative control.

2.9. Chemotaxis assay

Chemotaxis assays were performed by using the double-P assay as described by Köhidai et al. with minor modifications (Kohidai, 1995). Thirty-five millimeters Petri dishes were filled with 1 ml of a 0.5% agar and 1% gelatin solution. After drying, two 6 mm diameter wells were done, each one presenting a parallel individual channel. One well was filled with 50 μl of purified microglial cells and the other one with chemotactic factors or negative controls. A channel was further created perpendicularly to others with a coverslip. One hour later, cells in the chemoattractant containing well were collected. Either human C1q (0, 5, 25, 50 and 100 nM) or conditioned medium (50 μl) were used as chemotactic molecules. In any experiment, negative controls were carried out with complete L-15 medium alone. Inhibitory chemotactic experiments were performed with neutralizing antibodies and scavengers. Concerning the study of human C1q, cells were preincubated for 30 min at RT with mouse monoclonal anti-human gC1qR antibody (dilution 1:25), Pertussis Toxin (PTX) (500 ng/ml), G-protein inhibitors: wortmannin (10 mM) or nitric oxide chelator: 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-l-oxyl-3-oxide (cPTIO, 50 μM) (Sigma–Aldrich). Concerning the study of leech-conditioned medium, cells were preincubated for 30 min at RT with rabbit polyclonal anti-*Hm*C1q antibody (dilutions 1:100; 1:50; 1:25) and, as negative control, pre-immune serum (dilution 1:25). The number of migrating cells was counted on a hemocytometer (three different counts) under Zeiss Axioskop microscope. Experiments were done in triplicate. The results were expressed as the mean cell number ± S.D. Comparisons between means were made using Student's *t*-test. Statistical differences were considered to be significant if p was <0.01.

3. Results

3.1. Molecular characterization of HmC1q

EST library was constructed from total RNA of nerve cords isolated from adult leeches. Following sequencing and identification analyses, molecules homologous to complement factors were identified. We focused our attention on a C1q domain containing molecule. In order to achieve its complete nucleotide sequence, 5′RACE-PCRs based on specific EST library cDNA were carried out. Final molecular cloning has led to identify 1837 nucleotides sequence presenting an open reading frame (960 nucleotides) coding a 320-amino acids protein (Fig. 2A). The analysis of the sequence by Signal-P V1.1 program predicted a putative signal peptide corresponding to amino acid regions 1–23 of the protein (Nielsen et al., 1997). The putative mature chain (24–320) has a predicted molecular weight of 32.6 kDa. Translated sequence has been compared in databases with the BLAST-P and BLAST-X programs (Altschul et al., 1997; Karlin and Altschul, 1990). Interestingly, the sequence contains two conserved domains usually related to vertebrate C1q domain containing (C1qDC) protein family: the collagen-like domain containing several G–X–Y motifs and the globular C1q domain (Fig. 2A). In addition, BLAST-P alignment program showed significant homologies with mammalian C1qDC proteins. Thus,

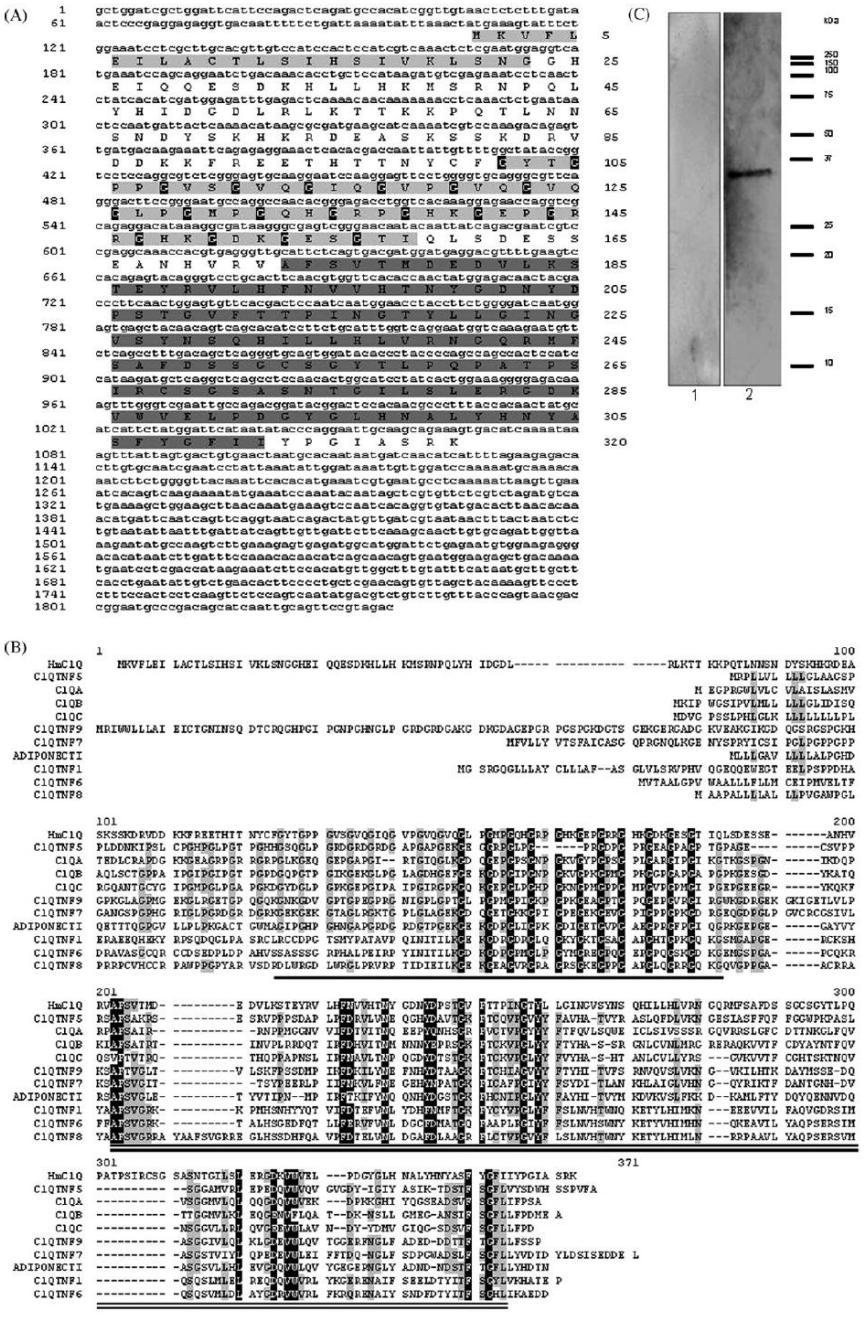


Fig. 2. Molecular characterization of *Hm*C1q molecule in leech nerve cord. (A) Molecular characterization of *Hm*C1q reveals a full-length cDNA containing a coding region of 960 bases (nucleotide positions 106–1066). The amino acid sequence (320 amino acids), which was deduced from this nucleotide sequence is constituted of a putative signal peptide (highlighted in light grey, 1–23), a collagen-like region (highlighted in light grey, 102–158) which contains G–X–Y repeat domains (G are highlighted in black) and the C1q domain (highlighted in dark grey, 173–312). Numbers for nucleotides and amino acids are, respectively, indicated on left and right of the sequence. (B) Multiple alignment

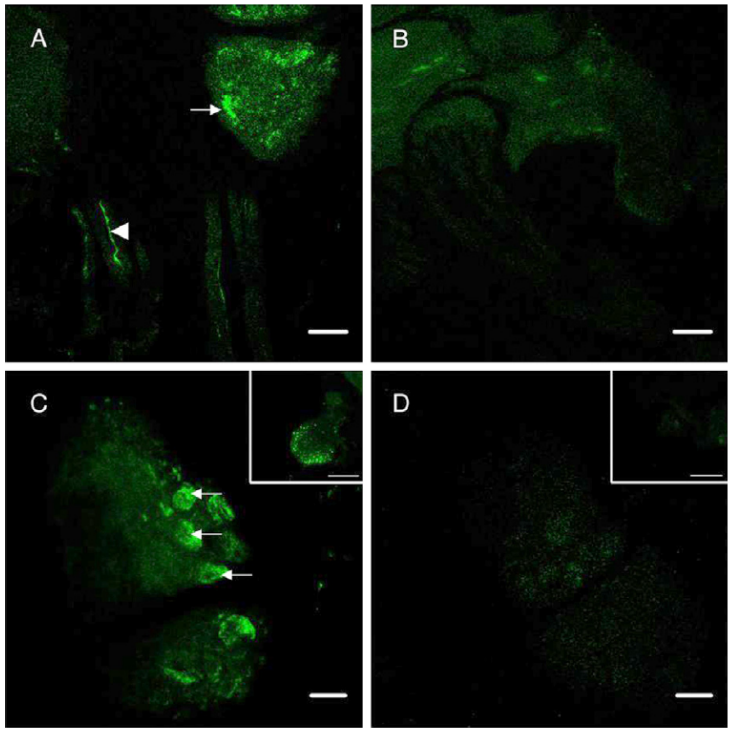


Fig. 3. Fluorescence *in situ* hybridization on whole mount nerve cords. Confocal microscopy images show mRNA localization using antisense *HmC1q* riboprobes immediately ($T = 0$ h) in neuron cell bodies (arrow) and connectives (arrowhead) (A) and 6 h ($T = 6$ h) following injury in a packet of neurons (C). Sense probes were used as negative controls (B and D). Insets in C and D show a detail of a neuron cell body. Scale bars correspond to 20 μm.

we named the molecule as *Hm*C1q (Genbank accession number EU581715) according to the conserved domains and homologies.

Since *Hm*C1q sequence presents similarities with many vertebrate C1qDC proteins, we preferred to limit the comparison to human molecules (Corpet, 1988) (Fig. 2B). Relative homologies in amino acid sequences with leech C1q, indicated in the legend of Fig. 2, vary between 41% and 45%. Similar homology values were obtained for C1q families of other mammals.

Finally, western blot analysis using rabbit polyclonal anti-*Hm*C1q antibody allowed detection of a product (about 33 kDa), which is relevant with the mature form (residues 24–320) of known C1q proteins (Fig. 2C). Pre-immune serum was used as negative control. In addition, because the analysis used protein extract from nervous system culture medium, the presence of specific signal indicates that *Hm*C1q protein may be released by nervous cell populations during *in vitro* repair processes.

3.2. *HmC1q mRNA distribution in the leech nervous system*

In order to locate the presence of related *HmC1q* transcripts in the leech nervous system, specific fluorescence *in situ* hybridizations were carried out on whole nerve cords (Fig. 3). The transcripts are constitutively present in neuron cell bodies outside of the nucleus and mainly at the periphery of the cytoplasm. Fluorescent probes were also detected in some nerve fibers of connectives relying metameric ganglia (Fig. 3A). Six hours after nerve injury, transcripts were only observed in ganglion compartments including neuron bodies and packet glial cells (Fig. 3C). Similar results were obtained in whole ganglia (Fig. 3C, inset) and dissociated neurons (data not shown). No specific signals were detected with sense probes (Fig. 3B and D).

3.3. *Immunolocalization of HmC1q protein*

Distribution of *Hm*C1q was showed in different elements of leech nervous system after injury. By using polyclonal anti-human C1q antibodies with isolated leech neurons, the staining was limited to cell body cytoplasm (Fig. 4A). A similar pattern was observed in neurons stained with specific anti-*Hm*C1q polyclonal antibodies. Indeed, the anti-*Hm*C1q signal was clearly detected on the confocal microscopy image of one packet of neurons (Fig. 4B). The ganglion endothelium layer and the packet glial cell surround-

programs show two conserved domains which are the collagen domain and the C1q domain (respectively underlined with single line and double line). Conserved residues are represented in grey (relatively conserved) and black (highly conserved). In order to present large molecular diversity, the alignment does only consider the human molecules. C1QTNF5 (Accession Q9BXJ0), C1QTNF1 (Accession Q9BXJ1), C1QA (Accession P02745), C1QB (Accession P02746), C1QC (Accession P02747), C1QTNF9 (Accession Q5VX65), C1QTNF7 (Accession Q9BXJ2), C1QTNF6 (Accession Q9BXI9), ADIPOQ (adiponectin) (Accession Q15848) and C1QTNF8 (Accession P60827) respectively present 46, 45, 40, 45, 43, 45, 45, 44, 44 and 41% homologies with *Hm*C1q. (C) Western blotting analysis was realized from conditioned medium protein extract. Comparatively to pre-immune serum as negative control (lane 1), rabbit polyclonal anti-*Hm*C1q antibody revealed a product of about 33 kDa (lane 2).

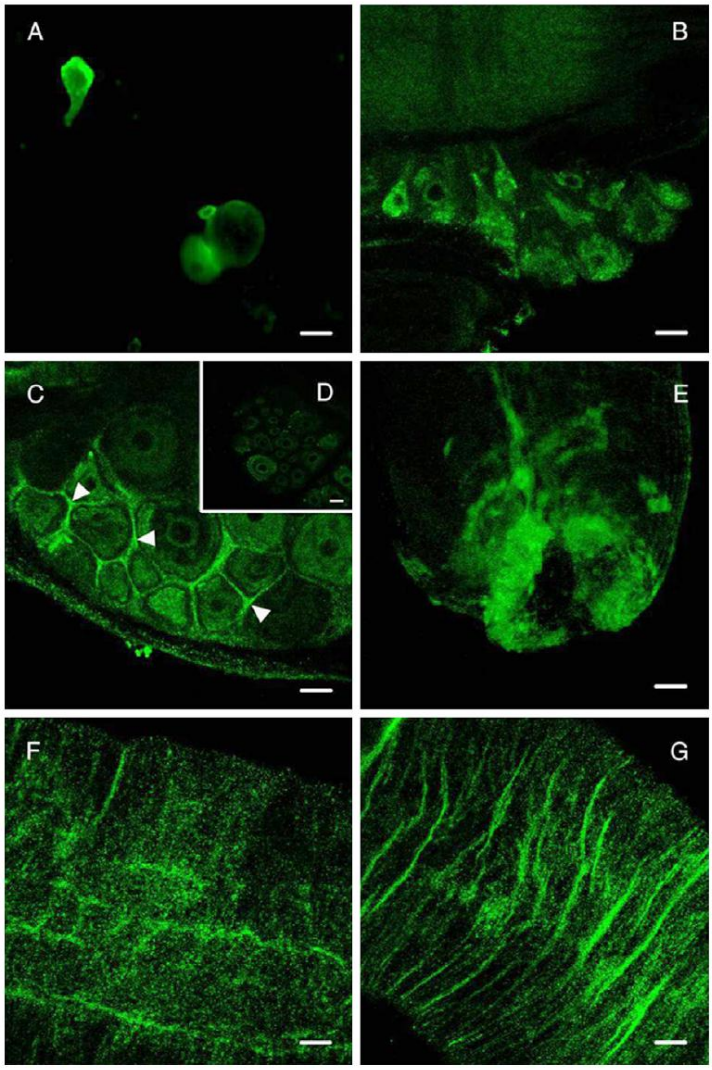


Fig. 4. Fluorescent immunostaining of leech CNS by using anti-C1q antibodies. (A) Isolated neurons are immunopositive with anti-human C1q antibody. (B–G) Confocal microscope analysis of the immunostaining obtained with rabbit pre-immune serum or anti-leech C1q (anti-*Hm*C1q) antibodies. (B) Detail of stained neurons from whole ganglion. (C) Optical section through a packet of neurons. Arrowheads show immunopositive signal for the macroglial cell enveloping neuron bodies. (D) No signal was detected on samples treated with pre-immune serum as negative control. (E) Detail of stained cut end of injured connectives (site of lesion). (F and G) Endothelial cell staining was respectively observed immediately ($T = 0$ h) and 6 h ($T = 6$ h) following injury. Scale bars correspond to 20 μm.

ing neuron cell bodies were stained (Fig. 4C) with a massive accumulation of *Hm*C1q in the apical region of that macroglial cell (data not shown). A similar sample, treated with rabbit pre-immune serum as a negative control did not show any signal (Fig. 4D). At the connective level, the end of axonal processes (site of lesion) (Fig. 4E) and the endothelial cells (Fig. 4F and G) were also immunopositive for *Hm*C1q. Interestingly, following injury, the protein appeared as spread at the surface of the tissue (Fig. 4F) and, 6 h later, was mainly associated to endothelial cells (Fig. 4G).

3.4. Chemotactic effects of human C1q and leech C1q (HmC1q) on leech microglial cells

When leech nervous system is injured, a microglial cell migration towards the lesion site is observed (Morgese et al., 1983). In vertebrates, some complement factors were reported to contribute to the chemotaxis of cells involved in inflammatory responses. Because *Hm*C1q factor presents sequence homologies with human C1q, the leech microglia recruitment was evaluated using purified human C1q. Freshly prepared leech microglial cells were found

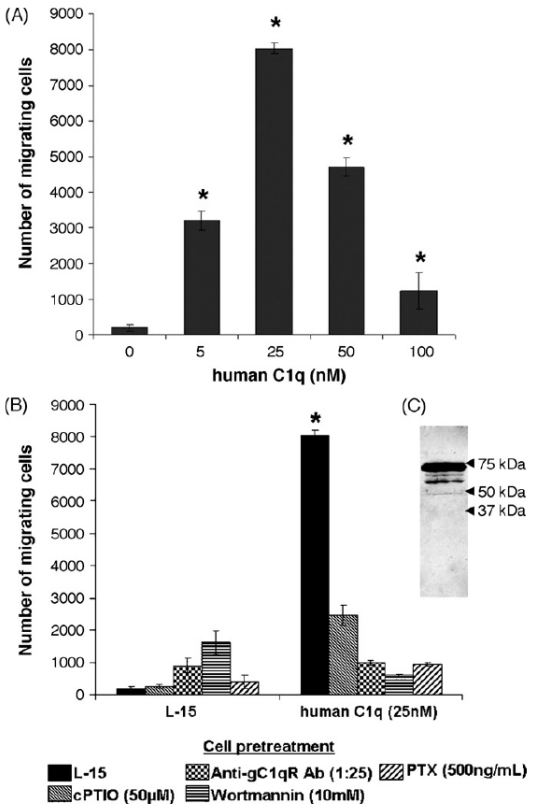


Fig. 5. (A) Chemotactic effect of human C1q on leech microglia migration. Microglial cells were tested against human C1q gradient (0, 5, 25, 50 and 100 nM) in order to study the chemotactic property and determine the optimal concentration of human C1q in chemotaxis. (B) Inhibitory effects on human C1q-mediated chemotaxis on leech microglia. Preincubations of microglial cells with cPTIO (50 μM), anti-human gC1qR antibody (1:25), wortmannin (10 mM) and PTX (500 ng/ml) were performed to analyze the mechanisms of microglia accumulation. Human C1q (25 nM) was used as chemoattractant molecule in all experimental sets and replaced by complete L-15 medium in negative controls. (C) Western blot analysis was performed from CNS protein extract using a mouse monoclonal gC1qR antibody. Signal showed numerous products ranged from 45 to 75 kDa. Chemotaxis results were realized from three independent experiments and expressed in number of migrating cells (as the mean cell number ± S.D.). (A) Asterisks denote that cell migration of the indicated sample was significantly different ($p < 0.01$) than the previous concentration of human C1q (0 vs. 5; 5 vs. 25; 25 vs. 50; 50 vs. 100 nM). (B) Asterisks denote that cell migration of the indicated sample was significantly different ($p < 0.01$) than all other ones.

to migrate towards a human C1q concentration gradient in a dose-dependent manner with a maximal migration at 25 nM (Fig. 5A). Higher concentrations of human C1q produced a diminished microglia migration corroborating the known chemotactic properties of most molecules in chemotaxis assays. The optimal migration with 25 nM human C1q was used as positive control in following experiments. As previously described, nitric oxide (NO) was reported to interfere in the regulation of leech microglia accumulation (Chen et al., 2000; Kumar et al., 2001). First, we evaluated the influence of NO chelator (cPTIO) on C1q-dependent chemotaxis. The results showed that cPTIO preincubated with microglial cells significantly reduced cell migration towards human C1q compared to positive control (Fig. 5B). In parallel, other

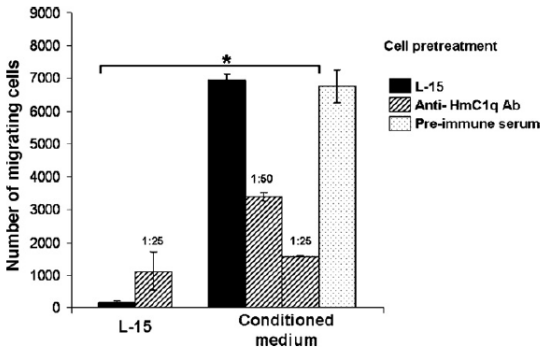


Fig. 6. Chemotactic effect of conditioned medium on leech microglia. Conditioned medium was used in all experimental sets and replaced by complete L-15 medium in negative controls. Microglial cells were preincubated with different dilutions (serum:water, 1:50, 1:25) of anti-*Hm*C1q antibodies or pre-immune serum (1:25) as control. The results from three independent experiments were expressed in number of migrating cells (as the mean cell number ± S.D.). Asterisks denote that cell migration of the indicated sample was significantly different ($p < 0.01$) than other ones inserted in bracket.

experiments were undertaken to specify the signaling pathway involved in C1q-mediated chemotaxis. Thus, two inhibitors were used: the pertussis toxin (PTX) as a inactivator of G protein and the wortmannin as a PtdIns(3,4,5)P3 kinase inhibitor. Using PTX, microglial cell migration towards the optimal C1q concentration was strongly reduced (Fig. 5B). In addition, wortmannin appeared to be a potent inhibitor of C1q-mediated chemotaxis (Fig. 5B). Both wortmannin and PTX at the tested concentrations were not known to be toxic to the microglial cells, as assessed by the shape and the number of non-migrating cells. Finally, inhibition of microglial cell migration was investigated by using specific anti-human gC1qR antibody, known to recognize part of the receptor which binds to the globular domain of the C1q molecule. Addition of this antibody at the same time with the deposit of microglial cell led to a significant reduction of the chemotactic response induced with the optimal dose of human C1q (Fig. 5B). Of interest, the anti-gC1qR antibody enabled the detection of different products ranged from 45 to 75 kDa in the CNS protein extract (Fig. 5C).

Otherwise, the conditioned medium (CM) obtained from a leech nervous system culture after a 24 h incubation exhibited a chemotactic effect similar to that observed with human C1q (Fig. 6). Incubation of microglial cells with different concentrations of the specific anti-*Hm*C1q antibody induced a significant dose-dependent decrease of cell recruitment which indirectly illustrates the importance of *Hm*C1q in leech microglia accumulation (Fig. 6). Indeed, anti-*Hm*C1q antibody did specifically recognize *Hm*C1q in CM (Fig. 2C). Moreover, CM-dependent migration was not modified when cells were incubated with pre-immune serum (Fig. 6). Thus, results demonstrated the specific implication of *Hm*C1q in cell recruitment and corroborated the response of leech microglia to purified human C1q.

4. Discussion

The C1q family proteins are considered as having an ancient evolutionary history (Endo et al., 2006). A molecule homologous to mammalian C1q was recently characterized in lamprey (Matsushita et al., 2004). By taking into account its capacity to bind GlcNAc, lamprey C1q was considered as a lectin and as an initial recognition molecule of the complement system in innate immunity before

the establishment of adaptive immunity (Matsushita et al., 2004). In deuterostome invertebrates, such a molecule was also found in sea urchin and can opsonise pathogens (Melillo et al., 2006). Interestingly, the history seems to be older. Our results emphasize the presence of C1q related factor in protostome invertebrates. Indeed, for the first time, this report shows the existence of a C1q domain-containing protein, named *Hm*C1q, in the nervous system of lophotrochozoans, the leech *H. medicinalis* and suggests its involvement in early mechanisms during nervous system repair. The existence of C1q-like molecules has never been reported in invertebrate nervous system to date. The sequence analysis of *Hm*C1q revealed high similarities with vertebrate C1q proteins but no significant homologies has been observed with invertebrates. As it exists for *Hm*C1q, the C1q family is characterized by a C-terminal conserved globular C1q domain (gC1q), which is structurally similar to the TNF domain and a collagen domain. Notably, *Hm*C1q contains residues in gC1q domain which are conserved in all known gC1q containing proteins (Kishore et al., 2004).

In vertebrates, members of C1q family, the C1qTNF proteins are involved in triggering and regulation of various inflammatory reactions (Kishore et al., 2004). In most cases, their globular carboxyl terminal portion recognizes broad categories of molecules (*e.g.* PAMPs) and the collagen-like N-terminal domain links the invading organism to complement mediated or phagocyte effector mechanisms of the immune system. Reports mentioned that C1qTNF1 factor might have a promising anti-platelet thrombotic activity and most likely by pacifying the thrombogenic site of vascular injury (Lasser et al., 2006). Their key-role in neuroinflammatory mechanisms was also underlined. Indeed, C1qTNF5 factor is implicated in late-onset retinal degeneration (Shu et al., 2006). In many neurodegenerative diseases, the globular head of C1q is involved in the capture of apoptotic cells and consequently in the regulation of the local inflammatory reaction. Recent experiments demonstrated that C1q can control neurogenesis process by tagging unwanted synapses in order to favor their complement-dependent elimination. This physiological mechanism might be aberrantly reactivated in some neurodegenerative diseases. Thus, in the mouse glaucoma model, neuronal C1q, which is normally down-regulated in the adult CNS, might be early up-regulated and synaptically relocalized in the adult retina during the glaucoma disease (Stevens et al., 2007). Finally some C1q domain containing proteins belonging to cerebellin subfamily expressed at the level of CNS synapses were recently considered as transneuronal cytokines (Yuzaki, 2008).

As previously described, unlike in mammals, leech neurons survive to lesion injury and regrow processes to restore the connections between two ganglia. Thus, we investigated the role of *Hm*C1q factor in leech CNS repair following injury. Interestingly, immediately after injury, *HmC1q* mRNA were observed in some neuron cell bodies of segmental ganglia and in some nerve fibers (axonal processes) of connectives. *Hm*C1q protein was present in neuron cell bodies but no specific signal was detected in axonal processes. In whole ganglion, immunopositive signals were observed in packet glial cells and endothelial layer. Confocal immunochemistry details of the endothelium showed that *Hm*C1q protein was spread at the surface of the tissue. Six hours post-injury, whereas *HmC1q* transcripts were only observed in some neuron cell bodies, a stronger signal was detected for the protein equally distributed in the endothelium area. From these observations, we hypothesize that, following injury, *HmC1q* mRNA might be immediately translated in axonal processes and proteins could be quickly secreted. Indeed, the protein is rapidly accumulated at the cut end of connectives and later massively present in packet glial cells and endothelial area as a potential release process towards the blood sinus. Thus, the fast *Hm*C1q protein release at the cut ends of axons might promote the recruitment of microglial cells that we have further analyzed. The presence of *Hm*C1q at the endothelium level surrounding the nerve cord is of interest. Indeed, the endothelial layer shows some irregularities and large numbers of small invaginations which allow active transport between nervous system and blood (Coggeshall and Fawcett, 1964). In a rat model of arterial hypertension, the induction of C1q expression was reported in glomerular endothelium as a potential repair mechanism of the capillary wall damage (Kreutz et al., 2007). Similarly, in leech, *Hm*C1q might be confined to the endothelial cells as well as to the lesion site enabling an efficient nerve cord repair. Further studies will investigate the potential localization of *Hm*C1q protein in the blood sinus following injury.

The chemotactic activity of C1q was then evaluated. Indeed, in leech, one of the early steps of response to nerve cord injury is the recruitment of microglial cells at lesions. In our experimental model, we clearly observed that leech microglial cells responded in a dose-dependent manner to human C1q as well as to conditioned medium containing characterized *Hm*C1q factor. The chemotactic activity of human C1q on immune cells was already reported and may implicate gC1qR and G-protein signaling (Leigh et al., 1998). The fact that human C1q exhibited such activities on invertebrate cells might be related to the sequence homology observed between leech and human molecules and mainly to the presence of the C1q domain which was described as conservative motifs along evolution. Of interest, western blot analysis from leech nerve cord culture medium using anti-*Hm*C1q antibody showed the presence secreted *Hm*C1q. In order to determine the pathway by which *Hm*C1q factor might act, signaling inhibitors were incubated with leech microglia. The first important point related to these inhibitory experiments was the demonstration that the globular part of the C1q molecule plays a key-role for an efficient binding to microglial cells and potentially induces efficient signals. Indeed, C1q-mediated chemotaxis did appear to be sensitive to PTX treatment and specific inhibitors of PtdIns3 kinase such as wortmannin. The results strongly suggested the potential involvement of G-proteins and PtdIns3 kinase in propagating the C1q induced signal for chemotaxis. In vertebrates, interaction of C1q with gC1qR exhibited similar signal pathways (Leigh et al., 1998). In addition, immature dendritic cells that express C1q receptors were reported to respond in dose-dependent manner to soluble C1q and to migrate to inflammatory sites (Vegh et al., 2003, 2006). In leech, by considering the inhibitory effect observed when microglial cells were incubated with anti-human gC1qR antibody, we can hypothesize that microglial cells might express similar receptor for *Hm*C1q. This hypothesis is supported by western blot analysis. Indeed, the specificity of monoclonal anti-gC1qR antibody enabled the detection of products whose size is relevant with known multimerized gC1qR forms (Jha et al., 2002; Lim et al., 1996). In addition, the characterization of such a potential receptor from nervous system EST is underway. The second important point is the using of a nitric oxide scavenger (cPTIO). The report showed the effect of NO chelation on microglia migration in human C1q gradient. The chemotactic effect is not completely abolished, probably because of partial inhibition of NO. In any case, the results bring evidence that the C1q effect is related to the presence of NO which plays a key-role in leech microglia recruitment required for efficient CNS repair (Chen et al., 2000; Kumar et al., 2001; Ngu et al., 2007). Further studies will investigate the interactions between production of NO and production of leech C1q (*Hm*C1q). Experiments using the *Hm*C1q recombinant form and anti-*Hm*C1q antibodies will enable to specify its chemotactic activity and characterize the potential specific receptors on target cells. In conclusion, the original evidence of *Hm*C1q in leech CNS highlights a new investigation field to better understand nervous repair mechanisms.

Acknowledgements

Authors would like to thank Dr. Christian Slomianny and Pr. Natalia Prevarskaya (Inserm, U800, Laboratoire de Physiologie Cellulaire, Université de Lille 1, France) for access to Zeiss LSM 510 Laser Scanning Confocal Microscope; Gilles Courtand (Centre Commun de Mesures Imagerie Cellulaire, Université de Lille 1, France) and Annie Desmons, Mathilde Verstraete and Céline Wichlacz for technical assistance. Supported by grants from Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and Ministère de L'Education Nationale, de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche (France). *H. medicinalis* nervous system EST databases were granted by Hirudinea Genomic Consortium.

References

Aloisi, F., 2001. Immune function of microglia. Glia 36, 165–179.
Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25, 3389–3402.
Baylor, D.A., Nicholls, J.G., 1971. Patterns of regeneration between individual nerve cells in the central nervous system of the leech. Nature 232, 268–270.
Bergamaschini, L., Donarini, C., Gobbo, G., Parnetti, L., Gallai, V., 2001. Activation of complement and contact system in Alzheimer's disease. Mech. Ageing Dev. 122, 1971–1983.
Botto, M., 1998. C1q knock-out mice for the study of complement deficiency in autoimmune disease. Exp. Clin. Immunogenet. 15, 231–234.
Botto, M., 2001. Links between complement deficiency and apoptosis. Arthritis Res. 3, 207–210.
Botto, M., Walport, M.J., 2002. C1q, autoimmunity and apoptosis. Immunobiology 205, 395–406.
Chen, A., Kumar, S.M., Sahley, C.L., Muller, K.J., 2000. Nitric oxide influences injury-induced microglial migration and accumulation in the leech CNS. J. Neurosci. 20, 1036–1043.
Coggeshall, R.E., Fawcett, D.W., 1964. The fine structure of the central nervous system of the leech, *Hirudo medicinalis*. J. Neurophysiol. 27, 229–289.
Corpet, F., 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. Nucleic Acids Res. 16, 10881–10890.
Endo, Y., Takahashi, M., Fujita, T., 2006. Lectin complement system and pattern recognition. Immunobiology 211, 283–293.
Fishelson, Z., Attali, G., Mevorach, D., 2001. Complement and apoptosis. Mol. Immunol. 38, 207–219.
Flierman, R., Daha, M.R., 2007. Pathogenic role of anti-C1q autoantibodies in the development of lupus nephritis—a hypothesis. Mol. Immunol. 44, 133–138.
Hanisch, U.K., 2002. Microglia as a source and target of cytokines. Glia 40, 140–155.
Jansen, J.K., Nicholls, J.G., 1972. Regeneration and changes in synaptic connections between individual nerve cells in the central nervous system of the leech. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69, 636–639.
Jha, B.K., Salunke, D.M., Datta, K., 2002. Disulfide bond formation through Cys186 facilitates functionally relevant dimerization of trimeric hyaluronan-binding protein 1 (HABP1)/p32/gC1qR. Eur. J. Biochem. 269, 298–306.
Karlin, S., Altschul, S.F., 1990. Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 2264–2268.
Kielian, T., 2004. Microglia and chemokines in infectious diseases of the nervous system: views and reviews. Front Biosci. 9, 732–750.
Kishore, U., Gaboriaud, C., Waters, P., Shrive, A.K., Greenhough, T.J., Reid, K.B., Sim, R.B., Arlaud, G.J., 2004. C1q and tumor necrosis factor superfamily: modularity and versatility. Trends Immunol. 25, 551–561.
Kohidai, L., 1995. Method for determination of chemoattraction in *Tetrahymena pyriformis*. Curr. Microbiol. 30, 251–253.
Kreutz, R., Schulz, A., Sietmann, A., Stoll, M., Daha, M.R., de Heer, E., Wehland, M., 2007. Induction of C1q expression in glomerular endothelium in a rat model with arterial hypertension and albuminuria. J. Hypertens. 25, 2308–2316.
Kumar, S.M., Porterfield, D.M., Muller, K.J., Smith, P.J., Sahley, C.L., 2001. Nerve injury induces a rapid efflux of nitric oxide (NO) detected with a novel NO microsensor. J. Neurosci. 21, 215–220.
Lasser, G., Guchhait, P., Ellsworth, J.L., Sheppard, P., Lewis, K., Bishop, P., Cruz, M.A., Lopez, J.A., Fruebis, J., 2006. C1qTNF-related protein-1 (CTRP-1): a vascular wall protein that inhibits collagen-induced platelet aggregation by blocking VWF binding to collagen. Blood 107, 423–430.
Leigh, L.E., Ghebrehiwet, B., Perera, T.P., Bird, I.N., Strong, P., Kishore, U., Reid, K.B., Eggleton, P., 1998. C1q-mediated chemotaxis by human neutrophils: involvement of gClqR and G-protein signalling mechanisms. Biochem. J. 330 (Part 1), 247–254.
Lim, B.L., Reid, K.B., Ghebrehiwet, B., Peerschke, E.I., Leigh, L.A., Preissner, K.T., 1996. The binding protein for globular heads of complement C1q, gC1qR. Functional expression and characterization as a novel vitronectin binding factor. J. Biol. Chem. 271, 26739–26744.
Matsushita, M., Matsushita, A., Endo, Y., Nakata, M., Kojima, N., Mizuochi, T., Fujita, T., 2004. Origin of the classical complement pathway: lamprey orthologue of mammalian C1q acts as a lectin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101, 10127–10131.
Melillo, D., Sfyroera, G., De Santis, R., Graziano, R., Marino, R., Lambris, J.D., Pinto, M.R., 2006. First identification of a chemotactic receptor in an invertebrate species: structural and functional characterization of Ciona intestinalis C3a receptor. J. Immunol. 177, 4132–4140.
Morgese, V.J., Elliott, E.J., Muller, K.J., 1983. Microglial movement to sites of nerve lesion in the leech CNS. Brain Res. 272, 166–170.
Nakamura, Y., 2002. Regulating factors for microglial activation. Biol. Pharm. Bull. 25, 945–953.
Nakamura, Y., Si, Q.S., Kataoka, K., 1999. Lipopolysaccharide-induced microglial activation in culture: temporal profiles of morphological change and release of cytokines and nitric oxide. Neurosci. Res. 35, 95–100.
Nardelli-Haefliger, D., Shankland, M., 1992. Lox2, a putative leech segment identity gene, is expressed in the same segmental domain in different stem cell lineages. Development 116, 697–710.
Nauta, A.J., Trouw, L.A., Daha, M.R., Tijsma, O., Nieuwland, R., Schwaeble, W.J., Gingras, A.R., Mantovani, A., Hack, E.C., Roos, A., 2002. Direct binding of C1q to apoptotic cells and cell blebs induces complement activation. Eur. J. Immunol. 32, 1726–1736.
Ngu, E.M., Sahley, C.L., Muller, K.J., 2007. Reduced axon sprouting after treatment that diminishes microglia accumulation at lesions in the leech CNS. J. Comp. Neurol. 503, 101–109.
Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., von Heijne, G., 1997. A neural network method for identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. Int. J. Neural. Syst. 8, 581–599.
Piehl, F., Lidman, O., 2001. Neuroinflammation in the rat—CNS cells and their role in the regulation of immune reactions. Immunol. Rev. 184, 212–225.
Qin, B., Cartier, L., Dubois-Dauphin, M., Li, B., Serrander, L., Krause, K.H., 2006. A key role for the microglial NADPH oxidase in APP-dependent killing of neurons. Neurobiol. Aging 27, 1577–1587.
Shu, X., Tulloch, B., Lennon, A., Vlachantoni, D., Zhou, X., Hayward, C., Wright, A.F., 2006. Disease mechanisms in late-onset retinal macular degeneration associated with mutation in C1QTNF5. Hum. Mol. Genet. 15, 1680–1689.
Stevens, B., Allen, N.J., Vazquez, L.E., Howell, G.R., Christopherson, K.S., Nouri, N., Micheva, K.D., Mehalow, A.K., Huberman, A.D., Stafford, B., Sher, A., Litke, A.M., Lambris, J.D., Smith, S.J., John, S.W., Barres, B.A., 2007. The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. Cell 131, 1164–1178.
Tacnet-Delorme, P., Chevallier, S., Arlaud, G.J., 2001. Beta-amyloid fibrils activate the C1 complex of complement under physiological conditions: evidence for a binding site for A beta on the C1q globular regions. J. Immunol. 167, 6374–6381.
Tastet, C., Lescuyer, P., Diemer, H., Luche, S., van Dorsselaer, A., Rabilloud, T., 2003. A versatile electrophoresis system for the analysis of high- and low-molecular-weight proteins. Electrophoresis 24, 1787–1794.
Trendelenburg, M., 2005. Antibodies against C1q in patients with systemic lupus erythematosus. Springer Semin. Immunopathol. 27, 276–285.
Trouw, L.A., Blom, A.M., Gasque, P., 2008. Role of complement and complement regulators in the removal of apoptotic cells. Mol. Immunol. 45, 1199–1207.
Vegh, Z., Goyarts, E.C., Rozengarten, K., Mazumder, A., Ghebrehiwet, B., 2003. Maturation-dependent expression of C1q-binding proteins on the cell surface of human monocyte-derived dendritic cells. Int. Immunopharmacol. 3, 345–357.
Vegh, Z., Kew, R.R., Gruber, B.L., Ghebrehiwet, B., 2006. Chemotaxis of human monocyte-derived dendritic cells to complement component C1q is mediated by the receptors gC1qR and cC1qR. Mol. Immunol. 43, 1402–1407.
Vergote, D., Macagno, E.R., Salzet, M., Sautiere, P.E., 2006. Proteome modifications of the medicinal leech nervous system under bacterial challenge. Proteomics 6, 4817–4825.
von Bernhardi, R., Muller, K.J., 1995. Repair of the central nervous system: lessons from lesions in leeches. J. Neurobiol. 27, 353–366.
Webster, S.D., Yang, A.J., Margol, L., Garzon-Rodriguez, W., Glabe, C.G., Tenner, A.J., 2000. Complement component C1q modulates the phagocytosis of Abeta by microglia. Exp. Neurol. 161, 127–138.
Yuzaki, M., 2008. Cbln and C1q family proteins—new transneuronal cytokines. Cell Mol. Life Sci..

1. Caractérisation moléculaire de *Hm*C1q.

Cette molécule candidate a été entièrement caractérisée par des expériences de 5'RACE-PCR basées sur l'ADNc issu de la banque EST et a été nommée *Hm*C1q (pour *H. medicinalis*). La séquence nucléotidique de la molécule *Hm*C1q code pour une protéine de 320 acides aminés et possède deux domaines conservés. Le domaine collagène caractérisé par des répétitions Gly-X-Y et le domaine globulaire C1q (gC1q).

Chez les vertébrés et au sein de la première composante de la voie classique du complément, on retrouve ces mêmes domaines conservés. La molécule gC1q possède une structure trimérique et assure la liaison avec les fragments constants (Fc) des anticorps, alors que le domaine collagénique est réservé à la liaison avec les récepteurs et aussi avec d'autres molécules comme l'ADN et la protéine C-reactive (CRP) [Kishore and Reid, 2000]. Il existe un panel de molécules qui possèdent le domaine gC1q à l'extrémité C-terminale et qui forment la famille C1q.

*Hm*C1q, caractérisé chez la sangsue médicinale, est ainsi un nouveau membre de cette famille. En effet, comparée aux bases de données avec les programmes BLAST-X et BLAST-P, *Hm*C1q présente des homologies avec des protéines de cette famille. Seules les homologies avec les molécules humaines ont été retenues. Cette molécule est homologue aux chaines A, B et C de la protéine du complément C1q mais aussi à des molécules de la famille C1qTNF. Cette dernière est un sous-groupe de la famille C1q, dont les membres possèdent un gC1q ayant une structure homologue au domaine C-terminal de TNF (THD : TNF Homology Domain). Chez l'homme, Il est intéressant de noter que les C1qTNFs ont été montrées comme impliquées dans la prévention d'une agrégation plaquettaire (CTRP1) [Lasser et al., 2006] et dans des mécanismes neuro-inflammatoires (CTRP5) [Shu et al., 2006]. De plus, certaines protéines appartenant à cette famille ont été sélectivement détectées au sein du système nerveux [Yuzaki, 2008].

Le résultat de la caractérisation de *Hm*C1q a mis en évidence une nouvelle molécule de la famille C1q qui se rapprochera de certains C1qTNFs par l'homologie de séquence, les domaines conservés et la présence au sein du SNC.

2. Effet chimiotactique du C1q humain sur les cellules microgliales de sangsue.

Afin d'évaluer l'implication de *Hm*C1q dans le recrutement des cellules microgliales, des tests de chimiotactisme ont été développés tel que décrit par Köhidai [Köhidai, 1995]. Dans la boite de pétri (35 mm), 2 puits ont été creusés dans la gélose. Le premier a été rempli avec les cellules microgliales purifiées dans du milieu L-15 et le deuxième sera réservé au facteur chimioattractant (L-15 avec ou sans C1q humain).

Dans ce premier test de chimiotactisme, le C1q humain, dont l'effet chimioattractant a été déjà démontré [Vegh et al., 2006], fut utilisé avec des cellules microgliales de sangsue. Ces dernières ont été recrutées par doses croissantes de C1q humain. Le recrutement optimal fut obtenu pour 25 nM de C1q humain. Cette expérience a permis de révéler que les cellules microgliales da sangsue sont sensibles au C1q en tant que facteur chimioattractant. Il est alors apparu intéressant de tester l'activité de *Hm*C1q sur les cellules microgliales.

3. Effet chimiotactique de *Hm*C1q sur les cellules microgliales de sangsue.

Dans ce test de chimiotactisme, des chaines nerveuses de sangsue ont été incubées dans du milieu L-15 pendant 24 heures, ce qui nous a permis d'obtenir un milieu conditionné par le SNC ayant libéré de nombreux facteurs actifs. L'utilisation de l'anticorps polyclonal anti-*Hm*C1q nous a amené à détecter par western blot la forme sécrétée de *Hm*C1q dans le milieu conditionné avec une taille qui correspond à la molécule caractérisée. Aucune bande n'a été détectée en western blot après une saturation avec le peptide de synthèse ou par l'utilisation du sérum pré-immun (SPI), utilisées toutes deux comme contrôles négatifs. Le milieu conditionné contenant *Hm*C1q a donc été utilisé comme chimioattractant. Les cellules microgliales ont été recrutées par le milieu conditionné de façon dose-dépendante, tout comme pour le C1q humain. De plus, l'utilisation de l'anticorps anti-*Hm*C1q avec des dilutions différentes (1:25 et 1:50 dans du milieu L-15) a inhibé cette activité avec une réduction optimale pour la dilution 1:25. Les tests de chimiotactisme avec le sérum pré-immun n'ont pas affecté la migration des cellules. Ainsi, ce résultat confirme l'implication de la molécule *Hm*C1q dans le recrutement des cellules microgliales. Afin de mieux comprendre le phénomène de recrutement, les cellules qui produisent *Hm*C1q ont été recherchées.

4. Localisation des transcrits de *Hm*C1q dans le SNC de la sangsue *Hirudo medicinalis*.

Des expériences d'hybridation *in situ* sur des chaines nerveuses entières lésées ont permis de localiser les transcrits de *Hm*C1q au cours du temps. Ces derniers ont été rapidement détectés dans les neurones à la périphérie du cytoplasme et au niveau des connectifs. La présence d'un signal spécifique au niveau neuronal suggère que ces cellules soient capables de produire le facteur chimioattractant. Six heures après la lésion, le signal a été uniquement observé dans les neurones et dans les cellules gliales du paquet.

Les transcrits de *Hm*C1q sont donc instantanément présents suite à la lésion de la chaines nerveuse, ceci au sein des neurones et des connectifs. Six heures après cette lésion, le signal a totalement disparu au niveau des connectifs lésés. Cette observation suggère que les transcrits localisés au niveau des connectifs, où s'accumule normalement la microglie, sont rapidement utilisés en réponse à la lésion nerveuse. Une série d'expériences d'immunohistochimie a été donc mise en place afin de localiser la protéine *Hm*C1q.

5. Localisation de la protéine *Hm*C1q dans le SNC de la sangsue *Hirudo medicinalis*.

Des expériences d'immunohistochimie sur des chaines nerveuses entières lésées ont permis de localiser la protéine *Hm*C1q au cours du temps. Ceci a été possible grâce à l'utilisation de l'anticorps polyclonal spécifique anti-*Hm*C1q. *Hm*C1q a été détectée dans les neurones et au niveau du tissu endothélial sur des chaînes nerveuses prélevées et immédiatement analysées mais aucun signal axonal n'a été observé. Ceci suggère que l'expression du gène codant la protéine *Hm*C1q au sein des neurones et au niveau du tissu endothélial peut être constitutive et n'est pas seulement induite en cas de lésion. Six heures après la lésion, la protéine a été fortement observée au sein du tissu endothélial et au niveau du connectif lésé, bien que les transcrits aient été limités aux neurones.

Les résultats de la localisation de la protéine *Hm*C1q confirment ainsi l'hypothèse émise suite à l'hybridation *in situ*. Les ARNm de *Hm*C1q, initialement observés dans les corps cellulaires neuronaux et la partie proximale des axones, semblent complètement utilisés au niveau des connectifs lésés afin probablement de libérer *Hm*C1q aux extrémités axonales lésées. En effet, la protéine s'accumule directement au niveau de la lésion du connectif où une sous-population de cellules microgliales est simultanément

recrutée en réponse à la lésion. Ces résultats apportent un éclairage pertinent sur le rôle chimioattractant que peut jouer *Hm*C1q dans le recrutement microglial déclenché en réponse à la blessure de la chaîne nerveuse.

6. Mécanismes d'interaction utilisés par le C1q vers les sous-types microgliaux sensibles.

L'activité chimiotactique d'un gradient croissant de C1q humain ou de milieu conditionné par le SNC de sangsue a été mesurée *in vitro* avec des cellules microgliales de sangsue. Afin de comprendre comment certaines de ces cellules peuvent répondre au facteur et migrer vers lui, nous avons amorcé l'étude des voies de signalisation pouvant être utilisées par le C1q. Ne disposant pas encore de la molécule *Hm*C1q, nous avons préféré utiliser le C1q humain. En effet, sachant que le milieu conditionné renferme plusieurs facteurs chimioattractants responsables de l'accumulation microgliale, son utilisation semblait également impossible. Ainsi, le C1q humain a été utilisé à la dose optimale préalablement observée. Dans des expériences distinctes, les cellules ont été pré-incubées avec des inhibiteurs de voies de signalisation (voir encadré consacré à ces inhibiteurs) ou encore avec un anticorps monoclonal anti-gC1qR humain (bloquant le récepteur au C1q humain). La Toxine pertussique qui inhibe les protéines G ou la wortmannine qui inactive la voie de signalisation Phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate ont réduit le recrutement des cellules microgliales assuré par le C1q humain. Cette réduction a été obtenue également lorsque les cellules cibles sont incubées avec l'anticorps monoclonal anti-gC1qR humain. Ceci suggère que l'effet chimiotactique des cellules microgliales de sangsue, médié par le C1q humain, passerait comme pour celui des cellules humaines par une molécule apparentée à gC1qR et une voie de signalisation associée aux protéines G [Leigh et al., 1998]. La reconnaissance de molécules de sangsue par cet anticorps monoclonal a été clairement illustrée en western blot sur les extractions protéiques effectuées à partir du SNC de la sangsue médicinale. Des produits dont la taille correspond à celle de la multimérisation du récepteur gC1qR chez les vertébrés ont été détectés [Jha et al., 2002; Lim et al., 1996]. L'ensemble de ces résultats suggère l'existence très probable d'un récepteur au C1q apparenté à celui du C1q chez les mammifères. La conservation à la fois fonctionnelle et évolutive d'un tel mécanisme pose de nombreuses questions portant entre autre sur l'activation microgliale dans la réponse

inflammatoire chez les mammifères et sur l'origine phylogénique du complément au sein du monde vivant.

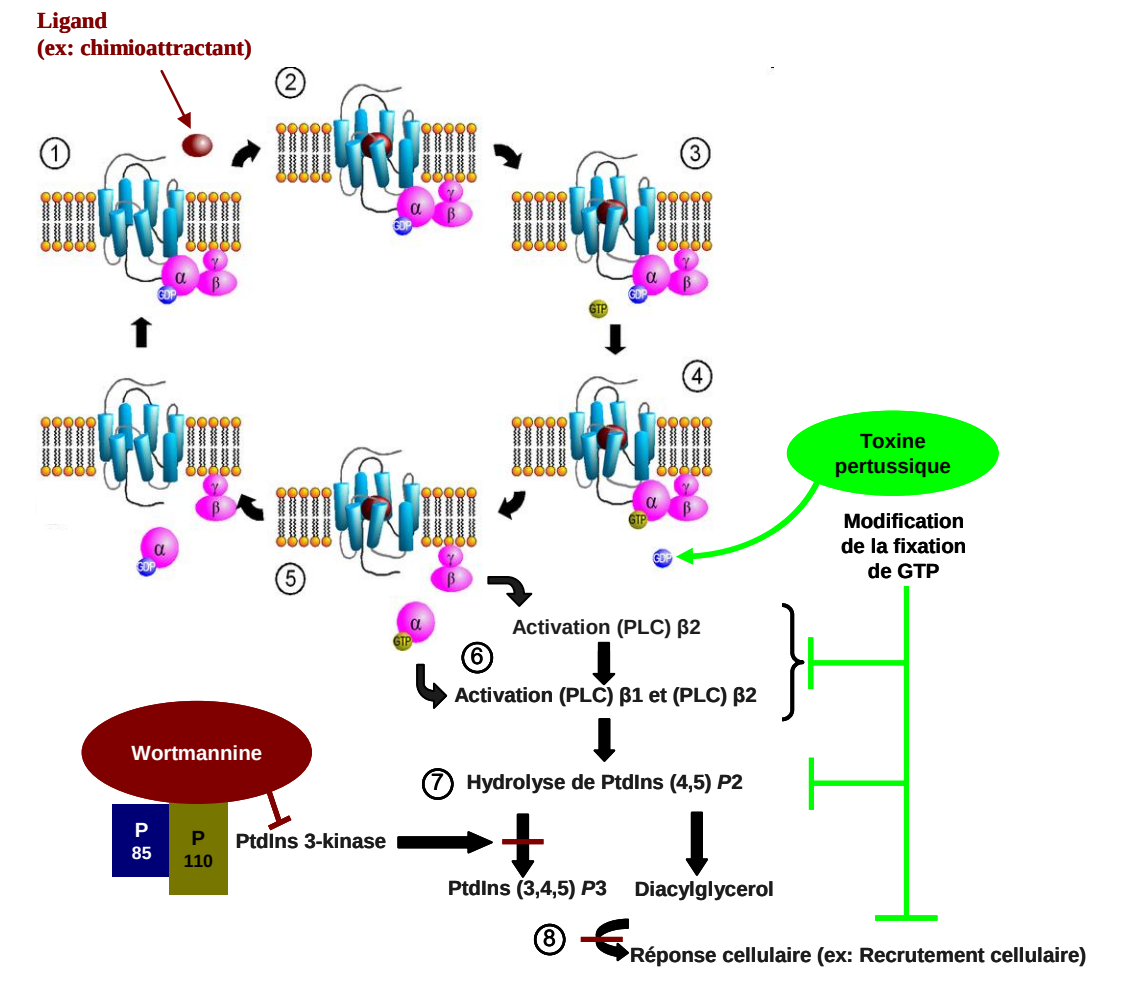
En outre, les tests utilisant des cellules pré-incubées avec le cPTIO, chélateur de monoxyde d'azote (NO), ont montré que le recrutement des cellules microgliales est également associé à la production de NO (voir encadré 2). Ce dernier résultat vient confirmer des observations précédentes montrant l'importance du NO dans la migration et dans l'accumulation des cellules microgliales [Chen et al., 2000; Kumar et al., 2001; Ngu et al., 2007]. Ce résultat montre que le NO intervient dans l'activation microgliale médiée par le C1q. La chronologie exacte des évènements reste toutefois à préciser.

Par conséquent, l'ensemble de ces résultats a permis de mettre en évidence la première molécule contenant le domaine C1q dans le système nerveux de la sangsue *Hirudo medicinalis*. Celle-ci est exprimée au niveau des neurones et des cellules gliales du SNC de la sangsue mais aussi concentrée au sein du connectif lésé, endroit où s'accumulent les cellules microgliales suite à une lésion. Son pouvoir chimioattractant envers les cellules microgliales, a été démontré pour la première fois dans le SNC d'un invertébré. Elle serait donc probablement impliquée dans l'activation de ces cellules favorisant ainsi la repousse axonale suite à une lésion. A l'issue de ce travail, il semble pertinent de rechercher le récepteur impliqué dans la reconnaissance de *Hm*C1q. Cela permettra également de pouvoir identifier la sous-population microgliale sensible à cette cytokine afin d'évaluer son importance dans la réponse neuro-inflammatoire.

Encadré 1.

Inhibition de certaines voies de signalisation.

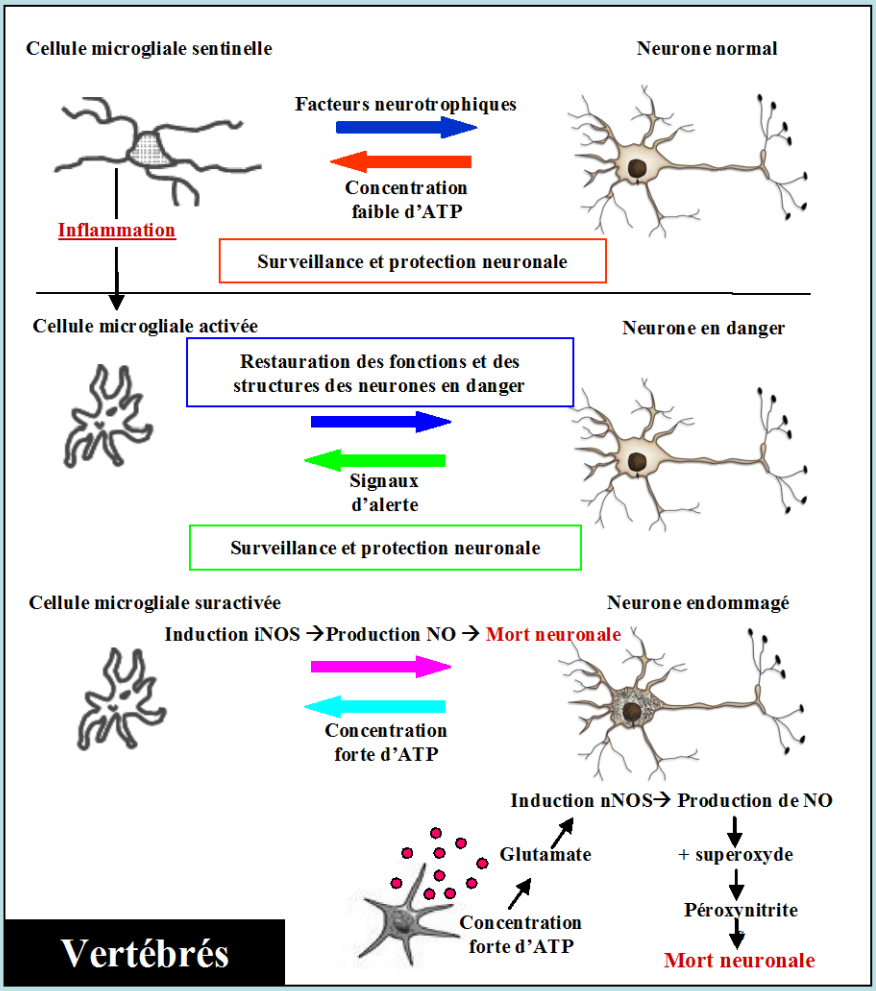
Quand un ligand (ex : un chimioattractant) active un récepteur couplé aux protéines G (1) et (2), il induit un changement conformationnel du récepteur (3) qui prend le rôle d'un facteur échangeur de Guanine (4). Il échangera donc le GDP (Guanosine diphosphate) en GTP (Guanosine triphosphate) au niveau de la sous-unité α de la protéine G qui sera donc active. Cette dernière activera à son tour les phospholipases C (PLCs) (β1 et β2) (6). L'activation des PLCs entraine l'hydrolyse de Phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (ou PtdIns (4, 5) *P*2) en Phosphatidylinositol 3, 4, 5-triphosphate (ou PtdIns (3, 4, 5) *P*3) et en diacylglycerol (7). La Phosphatidylinositol 3-kinase (ou PtdIns*P*3) catalyse la réaction produisant le PtdIns (3, 4, 5) *P*3. Cette enzyme est composée de 2 sous-unités : p85, la sous-unité régulatrice et p110, la sous-unité catalytique. La *wortmannine* (inhibition illustrée en rouge) s'avère un inhibiteur spécifique de cette enzyme. Elle se lie à la sous- unité p110 de l'enzyme et inhibe la production du PtdIns (3, 4, 5) *P*3 empêchant ainsi le déroulement de la voie de signalisation et donc la réponse cellulaire (ex : un recrutement cellulaire) (8). La *toxine pertussique* ou *PTX* (inhibition illustrée en vert) modifie la fixation du GTP sur la protéine G ce qui l'inactive et inhibe toute la voie de signalisation en question, d'où son nom d'inhibiteur de protéines G.



Encadré 2.

Le monoxyde d'azote (NO).

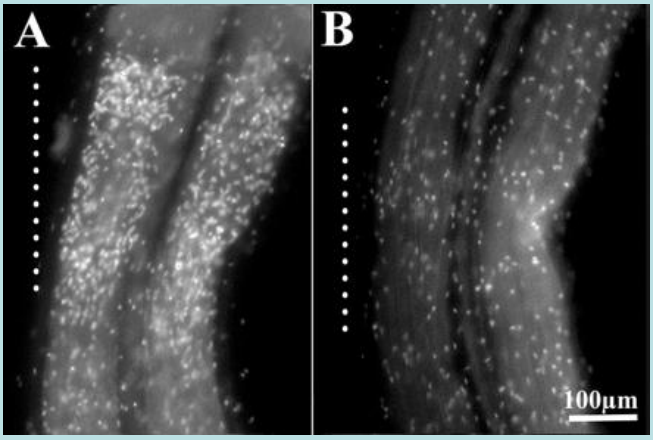
La plupart des messagers délivrent une information au travers d'un récepteur. A l'inverse, le monoxyde d'azote (NO) est l'une des plus petites molécules biologiques. En raison de sa simplicité chimique, le NO assure des effets diversifiés selon les changements de concentration, la proximité spatiale entre la source et les cellules cibles ainsi que sa durée de vie.



En absence de lésion, les cellules microgliales sont toujours en mode de surveillance et produisent un panel de facteurs neurotrophiques veillant ainsi à maintenir l'intégrité neuronale et l'homéostasie au niveau du SNC. En cas d'inflammation, les cellules microgliales seront activées par un large éventail de signaux de danger. La microglie activée sera alors capable de restaurer les fonctions et la structure des neurones en danger. Ceci en interagissant avec les autres cellules immunitaires par le biais de cytokines mais aussi par sa capacité phagocytaire efficace. Cependant, la persistance de cette inflammation ne sera que délétère. Les cellules microgliales suractivées produiront du NO par le biais de la NO-synthase inductible (iNOS). Le NO synthétisé par la microglie ajouté au NO sécrété par les neurones eux-mêmes suite à l'induction de la NO-synthase neuronale (nNOS) ne conduira qu'à la perte neuronale. La production de NO soit par la nNOS ou par la iNOS s'avère donc délétère chez les vertébrés en cas de neuroinflammation.

Chez la sangsue médicinale:

Le monoxyde d'azote (NO) est un médiateur déterminant dans la réponse précoce déclenchée par une lésion du système nerveux. En effet, l'inhibition de la production du NO - production reposant sur la NO-synthase (NOS) - avec 1mM de L-NAME réduit significativement l'accumulation des cellules microgliales au niveau du site de lésion (B) comparativement au contrôle (A). Ceci montre que le NO est nécessaire pour l'accumulation de la microglie au site de lésion (pointillés) (Chen, 2000). Par ailleurs, son rôle dans la migration des cellules microgliales s'avère double. A de fortes concentrations, le NO inhibe la migration de la microglie tandis que les faibles concentrations la favorisent (Chen, 2000). Une faible concentration de NO est donc indispensable à la migration et son blocage affecte directement le recrutement microglial.



Niveau d'implication des cellules microgliales sensibles au C1q dans la réponse à la lésion.

Comme les macrophages au sein du tissu périphérique chez les mammifères, les cellules microgliales constituent la première ligne de défense au niveau du système nerveux central des vertébrés [Aloisi, 2001]. Ces dernières sont activées par un panel étroit de signaux, notamment par la molécule C1q du complément. Le C1q a été démontré comme étant un marqueur fiable de l'activation des cellules microgliales [Hanisch and Kettenmann, 2007]. Le premier composant de la voie classique du complément est impliqué ainsi dans l'activation de la microglie qui s'accumule au niveau du site de lésion [Elliot and Muller, 1981; Hanisch and Kettenmann, 2007].

Au niveau du SNC de la sangsue *Hirudo medicinalis*, les cellules microgliales semblent partager plusieurs caractéristiques avec leurs homologues chez les vertébrés. Elles s'accumulent rapidement au niveau du site de lésion [Chen et al., 2000; Kumar et al., 2001; von Bernhardi and Muller, 1995] et présentent le même changement de morphologie au cours des différents stades d'activation [Elliot and Muller, 1981; Masuda-Nakagawa et al., 1990]. *Hm*C1q contenant le domaine globulaire C1q a été entièrement caractérisée au sein du système nerveux de la sangsue médicinale (publication 3).

Son étude a permis de montrer une homologie avec les protéines de la famille C1q. Par une homologie de séquences et/ou de domaines conservés et la présence au sein du SNC, elle se rapproche de certains membres de la famille C1qTNF. De plus, elle présente une analogie fonctionnelle avec le C1q humain.

En effet, l'ensemble des travaux montre à présent que *Hm*C1q est un facteur chimioattractant libéré très vite (détecté par western blot dans le milieu conditionné) par les neurones, les cellules gliales du paquet afin d'exercer une activité chimioattractante, dose-dépendante sur les cellules microgliales. L'incubation des cellules microgliales avec l'anticorps polyclonal spécifique anti-*Hm*C1q permet de limiter ce recrutement.

L'activation microgliale étant déterminante dans la réparation du SNC, il convient alors de poser les questions essentielles pour comprendre l'importance de *Hm*C1q dans la neuro-inflammation suite à une lésion.

a) L'activité de *Hm*C1q : caractéristique des chimiokines ?

Objectif : Etablir une courbe en cloche également pour la protéine HmC1q afin de dresser le profil caractéristique d'une chimiokine comme précédemment décrit avec le C1q humain.

b) Quelle est l'importance des cellules microgliales sensibles au C1q dans la réponse neuro-inflammatoire ?

Objectif 1: Reproduire les tests de chimiotactisme in vitro en utilisant cette fois-ci directement le HmC1q et non le milieu conditionné complet, et en neutralisant par l'anticorps polyclonal anti-HmC1q. Ceci aura pour but de préciser l'effet chimioattractant directement lié à HmC1q et non une inhibition partielle montrant indirectement son impact. En effet, le milieu conditionné complet contient un panel de molécules secrétées et pouvant avoir un effet chimioattractant (ex : la molécule apparentée à l'interleukine-16 ou encore la molécule apparentée à EMAP-II déjà caractérisées au laboratoire). Ces molécules sont aussi capables de recruter leurs propres sous-populations de cellules microgliales. Ainsi, il est nécessaire d'exclure les effets de ces facteurs pour pouvoir déterminer le niveau d'importance du recrutement médié par HmC1q.

Objectif 2 : Préciser la rapidité de l'accumulation des cellules microgliales sensibles à HmC1q comparativement aux autres sous-types microgliaux recrutés par d'autres facteurs chimioattractants du SNC. Replacer par des marquages immunohistochimiques la chronologie de l'activation microgliale dépendante de HmC1q par rapport à chaque sous-population microgliale.

Objectif 3 : Comprendre les notions de dialogue microglie recrutée - neurones lésés.

Pour répondre à ces questions, il est nécessaire de rechercher les interactants de *Hm*C1q et plus particulièrement son récepteur. Cette information permettra de confirmer ou non les données préliminaires de la troisième publication sur la présence d'un analogue du gC1qR humain. Elle sera déterminante également pour définir les sous-populations microgliales exposant le récepteur du *Hm*C1q.

Un outil indispensable pour répondre à toutes ces questions développées ci-dessus serait la production de la protéine recombinante r*Hm*C1q. La forme recombinante de la protéine *Hm*C1q a été produite chez la levure *Pichia pastoris*. Cette dernière présente plusieurs avantages de production (elle peut être facilement manipulée et elle produit de grandes quantités de protéines très proches des molécules eucaryotes comparativement à d'autres vecteurs) [Cregg et al., 2000]. De plus, elle a été démontrée efficace dans la production des éléments appartenant au système du complément, notamment celle de l'inhibiteur de la molécule C1 (C1-inh) [Bos et al., 2003]. Les surnageants de culture de *P. pastoris* ont été testés en western blot avec l'anticorps spécifique anti-*Hm*C1q et le clone révélé positif a été purifié en HPLC en phase inverse. Des tests de chimiotactisme ont été ainsi effectués sur le clone positif sélectionné ainsi que sur la fraction positive éluée en HPLC. Dès lors, toutes les études ont été basées sur la fraction purifiée en HPLC qui sera désignée par r*Hm*C1q. Afin de déterminer ses interactants, et notamment le récepteur de *Hm*C1q au niveau du SNC, une recherche d'une séquence homologue à gC1qR a été entreprise dans la banque EST de la sangsue médicinale. Des expériences de cytométrie de flux nous ont permis d'étudier l'interaction de r*Hm*C1q avec les cellules du SNC de la sangsue avec l'usage de l'anticorps monoclonal anti-gC1qR humain. De même, le milieu enrichi en protéines membranaires du SNC de la sangsue, a été incubé avec r*Hm*C1q. Les tests d'immunoprécipitation suivis des analyses en spectrométrie de masse ont permis ensuite d'enclencher la caractérisation du récepteur.

Publication n°4

***Hm*C1q induces leech microglial cells chemotaxis via a binding to gC1qR homolog in *Hirudo medicinalis*.**

Soumise pour publication dans Glia

*Hm*C1q induces leech microglial cells chemotaxis via a binding to gC1qR homolog in *Hirudo medicinalis*.

MURIEL TAHTOUH[1], FRANÇOISE CROQ[1], JACOPO VIZIOLI[1], ANNELISE GARCON-BOCQUET[1], PIERRE-ERIC SAUTIERE[1], CHRISTELLE VAN CAMP[1], MICHEL SALZET[1], PATRICIA NAGNAN-LE MEILLOUR[2], JOEL PESTEL[1‡], CHRISTOPHE LEFEBVRE[1‡*]

[1] Université Lille Nord de France, Université Lille 1, Laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides, Centre National de la Recherche Scientifique, FRE 3249, IFR 147, F59655, Villeneuve d'Ascq, France.

[2] Institut national de la recherche agronomique, Université Lille Nord de France, Université Lille 1, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 8576, IFR 147, F59655, Villeneuve d'Ascq, Cedex,

[*] Corresponding authors: Joel Pestel and Christophe Lefebvre. Université Lille 1, Cité Scientifique, SN3, 59655, Villeneuve d'Ascq cedex, France.

Tel: (33)3 20 43 41 27. E-mail: christophe.lefebvre@univ-lille1.fr

[‡] The authors supervised equally this work

Abstract

A novel chemotactic *Hirudo medicinalis* C1q domain-containing factor, named *Hm*C1q recently identified in the nervous system of the leech (Tahtouh et al., 2009b) was expressed in the yeast *Pichia pastoris* to investigate its functional properties and to characterize the potential specific receptors on target cells. In contrast to mammal, the medicinal leech *H. medicinalis* is able to restore normal functions of its CNS after injury. Microglia move toward the lesion and accumulate at the damage site. This cell migration was shown to be an essential step for the axon sprouting required for an efficient regeneration. Thus, in the present study, we investigated *in vitro* microglial cell migration brought by the recombinant *Hm*C1q (r*Hm*C1q). We found that it stimulated leech microglia migration in a dose-dependant manner similar to that obtained using human C1q in our previous study (Tahtouh et al., 2009b). This r*Hm*C1Q-induced chemotaxis could be reduced by a specific rabbit anti-*Hm*IL-16 Ab. In mammals, the collagen tail of C1q appeared to mediate chemotaxis. gC1qR, globular C1q-binding protein which interacts with the globular heads of C1q, has been reported to participate in C1q-mediated chemotaxis of murine mast cells, human eosinophils and human neutrophils. Treatment with monoclonal anti-human gC1qR antibody before chemotactic assays abroged the leech microglia migratory response suggesting that r*Hm*C1q driven microglia migratory response could be mediated by gC1qR. Interestingly, a C1qBP related sequences was found in leech CNS from EST library analyses. *Hm*C1qBP is newly characterized in invertebrates and for the first time in the nervous system. *Hm*C1q BP mRNA was observed in microglial cells of ganglion after nerve cord injury. In a previous study, the fast *Hm*C1q protein release at the cut end of the axons was observed. Thus, following injury, *Hm*C1q might promote the recruitment of microglia which would be mediated through the receptor *Hm*C1qBP on microglia cell surface. Flow cytometry analyses and co-immunoprecipitation experiments using anti-human gC1qR confirmed the presence of a r*Hm*C1q binding protein. Altogether, these results highlight the importance of the interactions between C1q and microglial cells in the mechanisms of nerve repair.

Introduction

In the mammalian CNS, microglial cells constitute the resident immune cells maintaining the integrity of the nervous system and able to respond to any kind of brain damages (Olson and Miller, 2004). In the normal, healthy brain resting microglial cells show a ramified morphology (Gehrmann, 1996). Under pathophysiological conditions, they rapidly change their morphology and turn to amoeboid activated microglia. In mammals, microglial activation is controlled by 'on' or 'off' signals (Hanisch and Kettenmann, 2007). Complement proteins are potential candidates to exert such 'on' signals on microglia (Farber et al., 2009). Indeed the complement system can be activated by three different pathways, the classical, lectin-dependent and the alternative pathway and following several T cell or not T dell dependent mechanisms can induce neuronal cell death (Farber et al., 2009). Moreover, following human brain infection or injury, the production of complement by resident cells was clearly demonstrated to be activated and highly increased (Speth et al., 2002). Interestingly C1q, the first component of the classical complement pathway, may serve as a reliable marker of microglial activation ranging from undetectable levels of C1q biosynthesis in resident microglia to high C1q expression in activated, non-ramified microglia. C1q synthesized and released by activated microglia was described to maintain and regulate microglial activation in the diseased CNS tissue (Farber et al., 2009; Lynch et al., 2004; Mariani and Kielian, 2009). Thus taken together, C1q might regulate some microglial functions during nerve injury.

Unlike mammals, the medicinal leech can fully regenerate its CNS after injury and restore function and synapses of individual neurons (Duan et al., 2005; Mladinic et al., 2009). Thus for this reason and because leech central nervous system (CNS) combines simplicity and well known organization (Coggeshall and Fawcett, 1964), *Hirudo medicinalis* became particularly attractive in neurobiology for decades. After injury, leech microglia immediately move toward the lesion site which may be largely essential to promote a successful nervous system repair (Chen et al., 2000; Kumar et al., 2001; von Bernhardi and Muller, 1995). Interestingly, leech microglial cells have the same morphological change as vertebrate microglia and migrate in response to tissue damage (Elliott and Muller, 1983; Masuda-Nakagawa et al., 1990). The microglia migration was shown to be an essential step for the axon sprouting required for an efficient regeneration (Ngu et al., 2007). In our laboratory, we were interested to point out the role of C1q in the microglial cells accumulation after leech CNS injury. We

already characterized for the first time in an invertebrate nervous system, a *H. medicinalis* C1q domain containing (C1qDC) factor named *Hm*C1q (Tahtouh et al., 2009b). Of interest, its implication in the leech microglia recruitment following experimental injury has been clearly demonstrated. In order to draw a clear picture for the role of this protein in microglial cells chemotaxis and be able to study its interaction with the CNS cells, the recombinant form of *Hm*C1q (r*Hm*C1q) was produced in the yeast *Pichia pastoris*. In the present report, we demonstrated the chemotactic activity of this recombinant protein on microglia and we also used the r*Hm*C1q to tightly explore its functions in the leech nervous system following trauma. Its chemotactic activity on microglia was also demonstrated. In vertebrates, C1q was demonstrated to exert its chemotactic activity through C1q receptors expressed on immune cells (Vegh et al., 2006). Finally, the interaction between r*Hm*C1q and the leech CNS cells was studied and allowed the identification of a C1qBP related molecule which was named *Hm*C1qBP, homologous to mammalian C1q receptor (alias gC1qR, p32, p33, C1qBP, HABP1; SF2p32, TAP) (Ghebrehiwet et al., 1994).

Materials and methods

Recombinant HmC1q production and purification.

Expression vector construction. The cDNA encoding the *Hm*C1q (Genbank accession number EU581715) (Tahtouh et al., 2009b) was amplified by PCR from total leech CNS cDNA as template. Amplification was performed using specific forward (5′gcgccc**tacgta**atgaaagtatttctggaaatcctcgc3′) and reverse (5'taatt**gcggccgc**tcactttctgct tgcaatt3′) primers containing SnaBI (forward, bold) and NotI (reverse, bold) restriction sites, respectively, together with the predicted natural signal peptide sequence (forward, underlined). PCR amplifications were carried out on a Thermal Cycler (Mastercycler Gradient, Eppendorf, France) with 150 ng of cDNA in a solution containing 1.25 U of Hot Start Proofreading DNA polymerase (Accu Prime™ Pfx, Invitrogen, USA), 0.3 µM of each PCR primer, 1× of DNA polymerase manufacturer's buffer containing dNTP in a final volume of 50 µl. The reaction cycles were performed as follows: 95°C for 2 min, followed by 35 cycles of 15 s at 95°C, 30 s at 60°C and 1 min at 68°C. A single PCR product was obtained and ligated into the SnaBI and NotI digested pPIC3.5K vector with T4 DNA Ligase (Invitrogen, USA) according to the instructions of the Multi-Copy *Pichia pastoris* Expression Kit manual (Invitrogen, USA). The plasmid DNA *Hm*C1q/pPIC3.5K was amplified into

Escherichia coli Top10F′ chemically competent cells (Invitrogen, USA). Cloning steps were verified by both strands DNA sequencing (Eurogentec, Belgium).

Transformation of Pichia pastoris *strain and screening for protein expression.* Recombinant plasmids *Hm*C1q/pPIC3.5K (see above) were linearized with SacI and used to transform GS115 *P. pastoris* strain by electroporation according to the method described in the manufacturer's manual (Invitrogen, USA). Selection of His+/Mut+ transformants was achieved as previously described (Briand et al., 1999). The recombinant clones were screened on YPD agar plates containing growing doses of G418 (Geneticin, Invitrogen, USA) for the presence of multiple inserts. Twenty clones were inoculated in 10 ml of BMGY medium (1% w/v yeast extract, 2% w/v peptone, 1.34% w/v Yeast Nitrogen Base, 4 $\mu g.ml^{-1}$ D-biotin, 100 mM potassium phosphate, pH 6.0, 1% v/v glycerol) and incubated at 29°C under gentle agitation. After 48 hours, cells were pelleted by centrifugation for 2 min at 1000×g at room temperature (RT). The pellets were gently resuspended in 2 ml of BMM medium (1.34% w/v YNB, 4 $\mu g.ml^{-1}$ D-biotin, 100 mM potassium phosphate, pH 6.0, 0.5% v/v MeOH) and incubated at 29°C under gentle agitation. After 48 hours, the cultures were centrifuged (10000×g, 10 min, 4°C), and the supernatants were dried under vacuum to be checked for protein expression by western-blot. The clone corresponding to the highest production of protein was stored in glycerol at -80°C.

Purification of recombinant proteins. Aliquots of supernatants obtained from 20 cultures of 2 ml were concentrated until a 1 ml volume (Centricon YM-10, Millipore, France). Purification was achieved in one step by RP-HPLC with C_8 column (250 x 4.1 mm, Vydac, USA) with a diphasic gradient in acetonitrile (ACN) in acidified water (0,1% Trifluroacetic acid) of 2–32% ACN for 60 min and 32-82% ACN for 50 min at a flow rate of 1 ml/min. The eluted fractions were checked by western blotting. The RP-HPLC fraction containing the recombinant protein was dried under vacuum and stored at -20°C.

For further analyses, the transformed *P. pastoris* culture supernatant and the non-transformed *P. pastoris* culture supernatant will be respectively resumed as "r*Hm*C1q supernatant" and "control supernatant". The RP-HPLC-purified recombinant protein will be named "purified r*Hm*C1q".

Western blotting.

Samples (either r*Hm*C1q supernatant, control supernatant or purified r*Hm*C1q) were reconstituted in Læmmli buffer before loading onto a SDS-AA gel (12% acrylamide running

gel and 4% acrylamide stacking gel). Following SDS-PAGE was performed according to Tastet and collaborators with a (Tastet et al., 2003). Briefly, migration was carried out using a cathode buffer (0.6% Tris base, 2.5% Taurine, and 0.1% SDS) and an anode buffer (0.6% Tris base, 2.8% Glycine, and 0.1% SDS). Gels ran at 70 V for 15 min and at 120 V for 45 min. Separated proteins were transferred to Nitrocellulose Transfer Membrane Protran® BA 83 (Schleicher & Schuell, USA) by electroblotting. After preincubation in blocking solution (BS) (PBS containing 0.05% Tween 20 and 2% ovalbumin fraction V) membranes were incubated overnight at 4°C with specific antisera: rabbit polyclonal anti-*Hm*C1q, pre-immune serum (dilution 1:1000 in PBS) or a mouse monoclonal anti-human gC1qR (60.11) antibody (dilution 1:250 in PBS) (Santa Cruz Biotechnology, USA). Specific rabbit polyclonal anti-*Hm*C1q antibodies were raised using a synthetic peptide corresponding to predicted His^{197}-Thr^{212} region of *Hm*C1q protein (Agrobio, France) (Tahtouh et al., 2009b). After three PBS washes, goat anti-rabbit or anti-mouse IgG antibodies conjugated with horseradish peroxidase (dilution 1:20 000 in PBS) (Jackson Immunoresearch, USA) were added for 1 h at RT. The final washes were performed in PBS and immunolabelled proteins were revealed with the ECL Kit SuperSignal West Pico Chemoluminescent Substrate (Pierce, USA) and Kodak® X-Omat LS film (Sigma–Aldrich, USA).

Leech CNS and microglial cell preparation.

H. medicinalis adult leeches were obtained from Ricarimpex (Eysines, France). After anesthesia in 10% ethanol at 4°C for 15 min, animal CNS (nerve cords) were dissected out in a sterile Ringer solution (115 mM NaCl, 1.8 mM CaCl2, 4 mM KCl, 10 mM Tris maleate, pH 7.4) under a laminar flow hood. After isolation, samples were placed in 3 successive baths of antibiotics (100 UI/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 100 µg/ml gentamycin) for 15 min and further incubated in Leibovitz L-15 medium (Invitrogen, USA) complemented with 2 mM L-glutamin, 0.6% glucose and 10 mM Hepes (complete medium). The experimental injury was performed by crushing the connectives between third and fourth ganglia. Nerve cords were used for *ex vivo* recruitment assays, whole mount *in situ* hybridization or nerve cell preparation.

For microglial cell isolation, nerve cords treated as indicated above were placed in 35 mm Petri dishes with 200 µl of complete L-15 medium. Each ganglion was carefully decapsulated by removing with microscissors the collagen layer enveloping the nerve cord. Nerve cells, neurons (10-70 µm) and microglial cells (5 µm), were mechanically resuspended by gentle scraping and filtered through a 7µm nylon mesh. The enriched microglial cell population was

then collected according to the size and centrifuged at 1000×g for 10 min at RT. The cell pellet was resuspended in L-15 medium (100 µl per nerve cord) for migration assays.

Chemotaxis assays.

In vitro chemotaxis assays were performed by using the double-P assay as described by Köhidai et al. with minor modifications (Kohidai, 1995). Thirty-five millimeters Petri dishes were filled with 1 ml of a 0.5% agar and 1% gelatin solution. After drying, two 6mm diameter wells were done, each one presenting a parallel individual channel. One well was filled with 50 µl of purified microglial cells (see above) and the other one with chemotactic factors or negative controls reagents. A channel was further created perpendicularly to others with a coverslip. One hour later, cells in the chemoattractant containing well were collected. Either r*Hm*C1q supernatant (0.1, 1, 3, 8 and 15 µl) or control supernatant (0.1, 1, 3, 8 and 15 µl) were used as chemotactic molecules. Inhibitory chemotactic experiments were performed with rabbit polyclonal anti-*Hm*C1q antibody (dilutions 1:25 in L-15 medium) or with mouse monoclonal anti-human gC1qR antibody (dilution 1:25 in L-15 medium). Cells were preincubated for 1 hour at RT with rabbit polyclonal anti-*Hm*C1q antibody, with mouse monoclonal anti-human gC1qR antibody or pre-immune serum as negative control (dilution 1:25 in L-15 medium). The number of migrating cells was counted on a hemocytometer (three different counts) under Zeiss Axioskop microscope. Additional experiments were performed with RP-HPLC-purified r*Hm*C1q as chemoattractant in similar conditions. Experiments were done in triplicate. The results were expressed as the mean cell number ± S.D. Comparisons between means were made using Student's t-test. Statistical differences were considered to be significant if p was <0.01.

Ex vivo *recruitment assays.*

Ganglia 2, 3, 4 and 5 were dissected from the animal and pinned in separate plastic 35 mm Petri dishes (Falcon 3005 Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) coated with silicone rubber (Sylgard 184 ; Dow Corning Midland, USA) and placed in L-15 complete medium. Different injections (8 µl) were then realized inside the connectives separating the ganglia 3 and 4 : PBS; r*Hm*C1q supernatant; r*Hm*C1q supernatant + anti-*Hm*C1q antibody (dilution 1:5000); r*Hm*C1q supernatant + pre-immune serum (dilution 1:5000) or the control supernatant. For injections, patch pipettes were pulled from borosilicate glass capillaries (outer diameter 1.5 mm, Clark GC 150F-10) using a two-stage horizontal micropipette puller (model P-97, Sutter instrument, USA) (pipette resistance 3-5 M Ω). The connectives were crushed immediately

after injection with fine forceps on both side of the injection site and the tissues were fixed in buffered 4% paraformaldehyde, pH 7.4 4h after the injection. The Hœchst 33342 (Invitrogen, USA) fluorescent dye (dilution 1:1000 in L-15 medium) was then applied on injured nerve cords for 30 min to counterstain the microglial cells nuclei. Microglial cells movement in response to these different injections was then observed with an inverted microscope (Leica DMIRE2).

Fluorescent in situ *hybridization (FISH)*

Nerve cords were fixed for an hour at 4°C in 4% paraformaldehyde just after dissection or 24 h after incubation in complete L-15 medium. The sequence of the C1qBP related molecule comes from the leech CNS EST library constructed in pT7T3-pac vector (Soares et al., 1994). The 5' biotin-labeled specific antisense probe and sense probe (negative control) were generated from the linearized plasmid by *in vitro* transcription using DIG/Biotin RNA-labeling kit according to the manufacturer's instructions (Roche, Switzerland). The hybridization protocol was followed as previously described (Nardelli-Haefliger and Shankland, 1992). Nerve cords were incubated with a secondary anti-biotin antibody conjugated to Alexa Fluor 488 (dilution 1:5000 in PBS) (Invitrogen, USA), rinsed with PBS and finally mounted with Glycergel (Sigma Life Science, USA). Samples were kept at 4°C in the dark until observation with a Zeiss LSM 510 Laser Scanning Confocal Microscope.

Flow cytometry analyses.

Total nerve cells isolated as described above from eight nerve cords were equally distributed (about 10^6 cells per tube) and kept for 24 hours at RT in L-15 medium either alone or with purified r*Hm*C1q. Then, they were incubated for 30 min with the fluorescein-labeled mouse monoclonal anti-human gC1qR (60.11) antibody (dilution 1: 250 in L-15 medium) (Santa Cruz Biotechnology, USA). Nerve cells were then washed with L-15 medium, centrifuged for 8 min at 1000×g at 4°C. Cell pellet was resuspended in 500 µl L-15 medium. Finally, they were examined by fluorescence-activated cell sorter (FACS). Flow cytometry was performed using an EPICS XL4-MCL (Beckman Coulter, High Wycombe, UK) equipped with an argon ion laser with an excitation power of 15 mW at 488 nm. Forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) were analyzed on linear scales, while green (FL1) was analyzed on logarithmic scales. Data acquisition and analysis were performed using Expo32 software.

Membrane protein preparation. Ten leech nerve cords were dissected and used for the membrane protein-enriched extraction as previously described (Vergote et al., 2006). Briefly, the protein extraction's protocol consisted of freezing/defrosting cycles, ultrasonic extraction, TCA/acetone precipitation and resuspension in lysis buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% shaps and 5 mM tributyl phosphine solution). The protein concentration of each sample was determined using the Bradford method (Bio-Rad, USA). Protein extracts were then stored at -20°C for the further experiments.

Co-immunoprecipitation. Specific anti-*Hm*C1q polyclonal antibody (dilution 1:50 in Ringer medium) was incubated with either the Ringer medium alone (negative control) or mixed with the purified r*Hm*C1q (dilution 1:50 in Ringer medium) overnight at 4°C under shaking. Twenty microliters of protein A/G PLUS agarose beads (Santa Cruz Biotechnology, USA) were then added to these samples. In the last step, concerning the antibody-r*Hm*C1q sample, 50 µl of the membrane protein-enriched extraction were added (co-immunoprecipitation) or not (negative control). Meanwhile, following a centrifugation for 5 min at 1000×g at 4°C, pellets were washed 4 times with RIPA (Radio Immuno Precipitation Assay) buffer (Santa Cruz Biotechnology, USA). Finally, 24 hours after the incubation with the membrane enriched extract at 4°C under agitation, we washed the mix as described above for the other tubes. The final pellets were reconstituted in Læmmli buffer in denaturizing conditions and were heated at 95°C for 5 min to denature the protein and separate it from the protein A/G agarose beads. Samples were loaded on a 12% SDS-PAGE and analyzed by western blotting using a mouse monoclonal anti-human gC1qR (60.11) antibody (see method above).

Results

Biochemical characterization of r*Hm*C1q.

*Hm*C1q was expressed by the yeast *Pichia pastoris* under control of the methanol-inducible alcohol oxidase promoter and secreted using its natural signal peptide. A positive clone was selected following the detection of a signal using the polyclonal anti-*Hm*C1q antibodies by western blot because of its relevance to the native *Hm*C1q detection as previously described (Fig. 1A, control) (Tahtouh et al., 2009b). No significant difference was detected between the recognition of r*Hm*C1q in the transformed yeast supernatant and native *Hm*C1q released in the conditioned medium (Fig. 1A, control). The negative control performed using a non-transformed yeast clone did not show any immunoreactive band. The presence of three products shows slight differences in the recombinant protein suggesting different levels of

glycosylation. The shared immunoreactivity suggests that r*Hm*C1q has the same size and migration profile as the native *Hm*C1q. The expression of r*Hm*C1q was observed until 4 days without any significant proteolytic degradation (data not shown). The protein was purified by RP-HPLC and eluted as the major peak at 10 % of acetonitrile (see arrow in Fig. 1B). The corresponding molecule (purified r*Hm*C1q) was then analyzed by western blot by using the same antisera and showed the similar protein profile (Fig. 1B).

Chemotactic effects r*Hm*C1q on leech microglial cells.

Our previous data showed the capacity of the native *Hm*C1q to recruit the leech microglial cells in a dose dependent manner (Tahtouh et al., 2009b). In this present study, the r*Hm*C1q supernatant was compared to the control supernatant using similar volumes in respective chemotaxis assays (0.1, 1, 3, 8, 15 µL). Freshly prepared leech microglial cells were found to migrate towards r*Hm*C1q supernatant also in a dose dependent manner. The optimal effect was observed by using 8 µl of r*Hm*C1q supernatant while a higher amount (15 µl) caused a decreased migration of the microglia. This effect is a characteristic of cytokines and has been already described for other chemoattractant factors contained in leech CNS conditioned medium (Croq et al., 2010). The control supernatant was used as negative control and did not exert any significant effect on microglial cell recruitment (Fig. 2A). Of interest, similar dose-dependent results were obtained by using purified r*Hm*C1q (data not shown). In order to maintain a relevant comparison between r*Hm*C1q and a pertinent negative control, we still used the r*Hm*C1q supernatant (8 µl) as positive control and the control supernatant (8 µl) as negative control. Chemotaxis assays were performed using the r*Hm*C1q supernatant and two negative control media (L-15 and control supernatant) in presence of blocking antibodies directed against the leech protein (anti-*Hm*C1q) and the human C1q receptor molecule (anti-gC1qR), respectively (Fig. 2B). Compared to r*Hm*C1q supernatant, negative controls using the control supernatant or L-15 medium did not exert any significant effect on cell movement (Fig. 2B). In addition, the r*Hm*C1q supernatant-mediated microglial recruitment was inhibited by using polyclonal anti-*Hm*C1q antibodies (Fig. 2B, hatched bars) whereas no significant inhibitory effect was notable with the pre-immune serum (data not shown). No significant inhibition of cell migration was demonstrated by pre-incubation of cells with polyclonal anti-*Hm*C1q antibodies in negative controls (L-15 medium or the control supernatant). Finally, the role of *Hm*C1q receptor in mediating microglia chemotaxis to r*Hm*C1q was investigated. Pretreatment of microglial cells with mouse monoclonal anti-human gC1qR antibody abrogated the chemotactic response to r*Hm*C1q (Fig. 2B, dotted bars) in a response

comparable to that obtained using rabbit polyclonal anti-*Hm*C1q antibody whereas there was no effect of the antibody in negative controls (L-15 or control supernatant) (Fig.2B). Interestingly, these results clearly indicate that the leech microglial cells moved towards r*Hm*C1q concentration gradient in a dose dependent manner and that chemotaxis is inhibited by polyclonal anti-*Hm*C1q antisera as described for the native *Hm*C1q (Tahtouh et al., 2009b). It strongly suggests that microglia migration is mediated by a gC1qR-related molecule. These chemotaxis assays were corroborated in *ex vivo* experiments performed from collected whole injured nerve cords. The cell movement was analyzed by using of Hœchst dye counterstaining because microglia are the only circulating resident cells present in connectives (Fig. 2C). Nerve cord crushes were performed simultaneously to the injection of the different molecules and the microglial accumulation at the lesion site was observed 4 hours later. The accumulation of microglia to the site of injury strongly increases 4 hours following PBS injection (Fig. 2C, a vs. b). When the cell movement was observed 4 hours after injury, the injection of r*Hm*C1q supernatant enhanced the microglia recruitment comparatively either to the presence of PBS only (Fig. 2C, b vs. c) or to the injection of the control supernatant (Fig. 2C, c vs. d). Of interest, while pre-incubation with rabbit pre-immune serum does not present any significant neutralizing effect on r*Hm*C1q-mediated recruitment (Fig. 2C, c vs. e), the injection of rabbit polyclonal anti-*Hm*C1q antibodies reduced the r*Hm*C1q supernatant-mediated chemotactic activity (Fig. 2C, c vs. f). These results specifically confirmed the capacity of r*Hm*C1q to increase the microglial cells recruitment compared to a normal accumulation in the presence of PBS following injury.

Molecular characterization of *Hm*C1qBP mature form.

After the characterization of *Hm*C1q and the production of its recombinant form in the yeast *P. pastoris*, our attention was drawn to the identification of its target cells. In order to accomplish this study, we examined the presence of a potential binding protein (receptor like) in the EST library constructed from total RNA of nerve cords isolated from adult leeches. A partial sequence for a C1qBP related molecule was identified encoding a 258 amino acid sequence (Fig. 3A). Similarly to mammalian C1q binding proteins, this sequence presents a MAM33 domain (Fig. 3A) and contains the mature form as described for the human C1qBP (Ghebrehiwet et al., 1994). Blast-P analyses of this sequence revealed exclusive homologies with many known C1qBP sequences (Fig.3B). Only the first results obtained after the comparison with databases were presented, showing the largest homology percentages (ranging from 55% to 47%).

*Hm*C1qBP mRNA localization in injured nerve cord

In order to specify the cell localization of *Hm*C1qBP transcripts in the leech nervous system, a specific fluorescence *in situ* hybridization was carried out on injured nerve cords. The transcripts were mainly detected in the microglial cells of ganglia (Fig. 3C) while no specific signals were detected with sense probe as negative control (Fig. 3C').

Flow cytometric analysis of leech nerve cells by using anti-human gC1qR antibody.

In the presence of both the purified r*Hm*C1q and the deduced *Hm*C1qBP sequence, it became largely interesting to study the possible interaction between *Hm*C1q and its potential binding protein. Flow cytometry analyses were then carried out (Fig. 4). The leech nerve cells were incubated overnight in L-15 medium and their dot plot was deduced in (Fig. 4A on the right). Among the selected gate, 2.86% of the nerve cells (shown in green on the dot plot) were auto-fluorescent (Fig. 4A, on the left). This percentage rapidly increased and reached 46.26% in cells incubated for 24 hours in L-15 and subsequently exposed for 30 min to the fluorescein-labeled mouse monoclonal anti-human gC1qR antibody (Fig. 4B shown in red on the dot plot and FL1 scale). This antibody recognized a leech protein localized on the surface of nerve cells and did not affect the cells dot plot overview. The antibody's target protein was strongly masked when the nerve cells were preincubated overnight with the purified r*Hm*C1q (Fig. 4C on the right for the dot plot and left for FL1 scale). Indeed, flow cytometry histogram overlay clearly showed the shift in fluorescence in the presence of the fluorescein-labeled mouse monoclonal anti-human gC1qR antibody alone compared to the nerve cells exposed to the same antibody and preincubated with r*Hm*C1q (Fig. 4D).

Co-immunoprecipitation of C1qBP related molecule by using r*Hm*C1q.

The co-immunoprecipitation studies were performed with the rabbit polyclonal anti-*Hm*C1q antibodies in order to co-purify the r*Hm*C1q with natural interactants. The samples were analyzed by western blotting using a mouse monoclonal anti-human gC1qR (60.11) antibody. The results are depicted in Figure 4E and show that 60.11 mAb allowed detection of r*Hm*C1q-co-immunoprecipitated products whose size might be relevant with polymerized forms of C1qBP molecules (lane 1). Negative controls using only agarose beads with anti-*Hm*C1q Ab (lane 2) or agarose beads using anti-*Hm*C1q Ab interacting with only r*Hm*C1q (lane 3) did not reveal the products of interest (Fig. 4E).

Discussion

In mammals, microglial cells are regulators of tissue homeostasis and are involved in pathological processes orchestrating tissue remodeling. Microglia are currently considered to function as sensors in the brain (Kreutzberg, 1996) They respond to any kind of pathology with a reaction termed microglial activation. Under neuropathological conditions, microglia are activated and migrate to and within the lesions. Activated microglia are characterized by a morphological transition from a quiescent stellate form to a macrophage-like phenotype. As we know, several regulatory factors are secreted by activated microglia. Among the mediators expressed by microglial cells and neurons, the subunit C1q belonging to C1 complement factor seems to be a key molecule in neuroinflammatory diseases, *i.e.* systemic lupus erythematosus (Flierman and Daha, 2007; Trendelenburg, 2005). This complement protein is involved in a large panel of vital functions such as the modulation of various immune cells, clearance of apoptotic cells and unwanted synapses, phagocytosis and chemotaxis (Chu et al., 2010; Nauta et al., 2004; Nayak et al., 2010). Furthermore, it plays a notable role in several neurodegenerative diseases (Tahtouh et al., 2009a). Thus, in vertebrate CNS innate immunity, the tight interactions between C1q and microglial cells may be crucial in the regulation of neuroinflammation-dependent diseases. C1q biosynthesis rapidly increases when microglial cells are activated, C1q being thus considered as a reliable marker for microglia activation. Recent studies have suggested that C1q synthesized and released by activated microglia is likely to contribute in an autocrine/paracrine way to maintain and balance microglial activation in the diseased CNS tissue (Farber et al., 2009).

To date, C1q - the first component of the classical pathway - has never been studied in another invertebrate nervous system than that of leech. Only sequences were deduced in several invertebrate models but no functional analyses related to the central nervous system were achieved yet. In deuterostome invertebrates, such a molecule was found in sea urchin and can opsonize pathogens (Melillo et al., 2006). In protostome invertebrates, an *Mg*C1q gene was characterized in the mussel *Mytilus galloprovincialis* and an increasing detection was noticed all along the mussel ontogeny. The gene expression was modulated by Gram positive and Gram negative bacteria but no relation with the nervous system and no chemotactic activity were established (Gestal et al., 2010). Moreover, in the Zhikong scallop *Chlamys farreri*, a novel member of C1q-domain-containing protein family was identified (designated as *Cf*C1qDC). This molecule displayed a significantly strong activity to bind LPS from *E. coli* (Zhang et al., 2008). Thus, C1qDC factors might be involved in the recognition

of invading microorganisms probably as a pattern recognition molecule in mollusks. Indeed, a novel C1q-domain-containing protein exerting fungi agglutinating activity was also characterized in many peripheral organs from bay scallop *Argopecten irradians* (*Ai*C1qDC-1) (Kong et al., 2010). Even in the cephalochordates which are close living relatives of vertebrates, Amphioxus *Branchiostoma floridae* seems to carry a sophisticated complement system. Hundreds of complement-related molecules and 75 C1q-like sequences were highlighted (Huang et al., 2008). But functional aspects are still to elucidate.

Originally, a previous report showed the existence of a C1q domain-containing protein, named *Hm*C1q, in the *Hirudo medicinalis* nervous system and showed its involvement in early mechanisms during nervous system repair (Tahtouh et al., 2009b). Of interest in vertebrates, C1q appears to be a potent chemoattractant factor. Indeed, it recruits human dendritic cells (DC), neutrophils, eosinophils and mast cells (Liu et al., 2008; Vegh et al., 2006). C1q can also initiate this process to maintain an activation balance during CNS diseases (Farber et al., 2009). Immature dendritic cells that express C1q receptors were reported to respond in dose-dependent manner to soluble C1q and to migrate to the inflammatory sites (Vegh et al., 2003; Vegh et al., 2006). Leech microglia resemble to vertebrate microglia because of their ability to migrate in response to tissue damage, and to change their morphology upon activation events (Coggeshall and Fawcett, 1964; Elliott and Muller, 1981; Masuda-Nakagawa et al., 1990). When the leech nerve cord is injured *in vivo*, microglia move toward the lesion and accumulate at the damage site (McGlade-McCulloh et al., 1989). The recruitment of microglial cells to the lesion site is an essential step for the axon sprouting, a key step in axon regeneration (Ngu et al., 2007). In a previous study, we clearly demonstrated that leech microglia responded in a dose-dependent manner to human C1q as well to conditioned medium containing characterized *Hm*C1q factor (Tahtouh et al., 2009b). Moreover, as recently published, we demonstrated that crushed nerve cord-conditioned medium contained another chemoattractant factor, a homologous to interleukin-16 mature form, named *Hm*IL-16, that also promotes microglial cell migration (Croq et al., 2010). Therefore, in leech, there might be the presence of multiple signals for migration and recruitment of different subsets of microglial cells at the lesion site.

Thus, in order (i) to specify the only part of *Hm*C1q on microglia recruitment, (ii) to investigate its functional properties and (iii) to characterize the potential specific receptors on target cells, the recombinant *Hm*C1q was produced in the yeast *Pichia pastoris*, an organism that can be easily manipulated at the molecular genetic level and may express proteins at high levels, intracellularly or extracellularly. In addition, *P. pastoris* performs 'higher eukaryotic'

protein modifications, such as glycosylation, disulfide-bond formation, and proteolytic processing compared to bacteria, *Saccharomyces cerevisiae* or baculovirus (Cregg et al., 2000). Actually, a successful recombinant production of human C1-inhibitor was accomplished in *P. pastoris* after several earlier attempts failures (Bos et al., 2003). In the present report, a r*Hm*C1q immunopositive *P. pastoris* clone gave by western blotting three distinct immunoreactive products, located in the region corresponding to that of the native *Hm*C1q (32.6 kDa). *P. pastoris* is able to add both *O*-linked and *N*-linked carbohydrate moieties to secreted proteins. As usually observed, slight shift in the final recombinant protein size can be easily caused by differences in the number and type of added sugar units. Of interest, the recombinant supernatant was then purified and used for chemotactic assays on leech microglial cells. Similar dose-dependent chemotactic effect to human C1q on microglia were pointed out between purified r*Hm*C1q and r*Hm*C1q supernatant (transformed *P. pastoris* culture supernatant). Moreover, r*Hm*C1q supernatant amount over 8µL produced diminished migration which is typical of most chemoattractants. The specificity of r*Hm*C1q-mediated microglia migration was evaluated using anti-*Hm*C1q antibodies to inhibit cell migration. The pre-incubation of microglial cells with specific rabbit anti-*Hm*C1q Ab clearly showed that the chemotactic effect on microglia was effectively dependent on the presence of r*Hm*C1q.

Thus, our attention was drawn to investigate the role of r*Hm*C1q in the leech CNS repair. In *ex vivo* recruitment assays, an enhancement of microglia accumulation at the lesion site was clearly noticed in the presence of r*Hm*C1q compared to the basic condition with PBS. This accumulation is notably inhibited using the specific anti-*Hm*C1q antibody.

As it exists for *Hm*C1q, the C1q family is characterized by a C-terminal conserved globular C1q domain (gC1q), which is structurally similar to the TNF domain and collagen domain. Notably, *Hm*C1q holds a gC1q domain having several residues conserved in all known gC1q containing proteins (Kishore et al., 2004). In vertebrates, C1q was demonstrated to exert its chemotactic activity through C1q receptors expressed on immune cells (Vegh et al., 2006). The gC1qR molecule, globular C1q-binding protein which interacts with the globular heads of C1q, has been reported to participate in C1q-mediated chemotaxis of murine mast cells (Ghebrehiwet et al., 1994), human eosinophils (Kuna et al., 1996) and human neutrophils (Leigh et al., 1998). Complement C1q binding sites were also shown in some invertebrates *e.g.* nematodes like *Haemonchus contortus* (Naresha et al., 2009), but no ligand was defined yet.

In leech, by considering the inhibitory effect on chemotaxis when microglia were incubated with monoclonal anti-human gC1qR antibody against human C1q, we can hypothesize that

microglial cells might express similar receptor for *Hm*C1q (Tahtouh et al., 2009b). Moreover, the specificity of anti-human gC1qR enabled the detection of products whose size is relevant with known multimerized gC1qR forms (Jha et al., 2002; Lim et al., 1996). Thus, to ascertain that the r*Hm*C1q-mediated microglia migration is indeed mediated by a gC1qR related molecule, experiments were performed in which microglial cells were incubated with anti-gC1qR antibodies prior to the chemotactic assays. Treatment with anti-gC1qR abrogated the microglia migratory response. These results demonstrate that *Hm*C1q functions as a chemotactic factor for leech microglial cells and migration is mediated through binding to a gC1qR related molecule.

Thus, in the leech nervous system, we did look for the presence of a putative r*Hm*C1q binding protein. C1qBP related sequence was found in leech CNS from EST library analyses. This sequence contains a MAM33 domain, an acidic protein of the mitochondrial matrix involved in oxidative phosphorylation, which is related to the human complement receptor C1qBP (or gC1qR) (Seytter et al., 1998).

Interestingly, after nerve cord injury, *Hm*C1q BP mRNA was observed in microglial cells of ganglion. In a previous study, we hypothesize that, following injury, *Hm*C1q mRNA, which was observed in some neuron bodies and axonal processes, might be immediately translated in axonal processes and proteins could be quickly secreted. Indeed, the protein is rapidly accumulated at the cut end of connectives (Tahtouh et al., 2009b). Thus, the fast *Hm*C1q protein release at the cut end of the axons might promote the recruitment of microglial cells which would be mediated through the receptor *Hm*C1qBP on microglia cell surface. To our knowledge, this is the first time that a gC1qR is found in the nervous system. Flow cytometry analyses came to support our idea. Indeed, the anti-human gC1qR antibody was found to bind to a subpopulation of microglial cells (46, 26%). The recombinant *Hm*C1q seems to share the same protein target as the antibody on the surface of microglial cells because of the shift observed when microglia are incubated with r*Hm*C1q before binding of anti-human gC1qR antibody. By using a polyclonal antibody, gC1qR has been shown to be present on the surface as well as in the cytosolic fraction of human neutrophils (Eggleton et al., 1995). The molecule gC1qR is a multi-compartmental protein expressed both intracellularly and on the cell surface (Ghebrehiwet and Peerschke, 2004).

In order to purify and characterize the *Hm*C1q binding molecules, co-immunoprecipitation experiments were performed between recombinant *Hm*C1q and membrane protein-enriched extracts from nerve cells. Of interest, the results confirmed that r*Hm*C1q binding proteins were immunopositive with anti-human gC1qR antibody. Further experiments will focus on

the characterization of these molecules to verify that C1qBP related molecule found from leech CNS databases corresponds to the natural ligand for *Hm*C1q.

Three types of cell surface proteins that bind to the subcomponent C1q have been described and they are distinguished by their ligand recognition specificity. C1qRp, a high molecular mass receptor of 126 kDa (Nepomuceno et al., 1997) which, in interaction with C1q, mediates the enhancement of microglia phagocytosis (Webster et al., 2000). The gC1qR (p32, p33, C1qBP, TAP) interacts with the globular heads of C1q (Eggleton et al., 1995; Ghebrehiwet et al., 1994) whereas the other type of C1q-binding protein, the cC1qR (calreticulin) binds to the collagenous portion of C1q (Erdei and Reid, 1988), collagen-like sequence which is present in *Hm*C1q. Moreover, results clearly demonstrated that C1q functions as a chemotactic factor for immature dendritic cells, and migration is mediated through ligation of both gC1qR and cC1qR (Vegh et al., 2006). Interestingly, by examinating the presence of a potential binding protein for the collagen domain of C1q (receptor like) in the EST library, a partial deduced sequence for a cC1qR related molecule was identified. Blast-P analyses of this sequence revealed homologies with many known cC1qR (calreticulin) sequences. Additional experimentations will permit to completely characterize this sequence and to establish if the *Hm*C1q-mediated leech microglia migration could also involve a cC1qR related molecule.

Finally, this paper comes out with new interesting data concerning the recombinant form of *Hm*C1q that is the first invertebrate C1q to be characterized in invertebrate CNS. The use of r*Hm*C1q is able to increase microglial cells accumulation at the lesion site demonstrating its efficient chemoattractant activity. In addition, the present report shows that *Hm*C1q might work through a specific *Hm*C1qBP. In conclusion, the production of r*Hm*C1q and the evidence of *Hm*C1qBP in the leech CNS contribute to the better understanding mechanisms of microglia activation leading to the nerve repair. Taken together, the invertebrate data on complement system in the CNS could lead to further researches enabling to specify the C1q in synaptic functions and maintenance of the CNS, as recently suggested in mammals (Shimono et al., 2010).

Acknowledgements

Authors would like to thank Dr. Christian Slomianny and Pr Natalia Prevarskaya (Inserm, U800, Laboratoire de Physiologie Cellulaire, Université de Lille 1, France) for access to Zeiss LSM 510 Laser Scanning Confocal Microscope; Nathalie Jouy and Dr. Thierry Idziorek (Service Commun de Cytométrie et de Tri Cellulaire, Institut de Recherches sur le Cancer de Lille) for access to Beckman Coulter EPICS XL3-MCL flow cytometer and the Centre Commun de Mesure et d'Imagerie Cellulaire (CCMIC, Université de Lille 1, France). This work was supported by grants from Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (France). *H. medicinalis* nervous system EST databases were granted by Hirudinae Genomic Consortium.

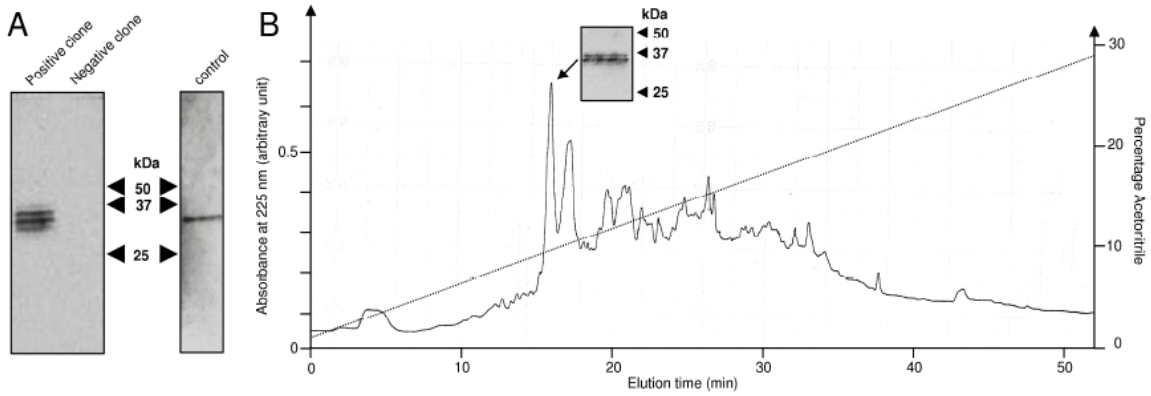


Figure 1:
Expression of r*Hm*C1q in the *P. pastoris* yeast host system. (A) The immunodetection of r*Hm*C1q (selected positive clone) by western blot with the polyclonal anti-*Hm*C1q antibodies is compared with the native *Hm*C1q released in the leech CNS-conditioned medium (control). The supernatant from the non transformed yeast culture was used as negative control. (B) Part of the chromatogram of the yeast culture illustrating the purification of r*Hm*C1q by RP-HPLC. The r*Hm*C1q molecule was eluted at 10% of acetonitrile (see arrow) and was detected by western blot with the polyclonal anti-*Hm*C1q antibody

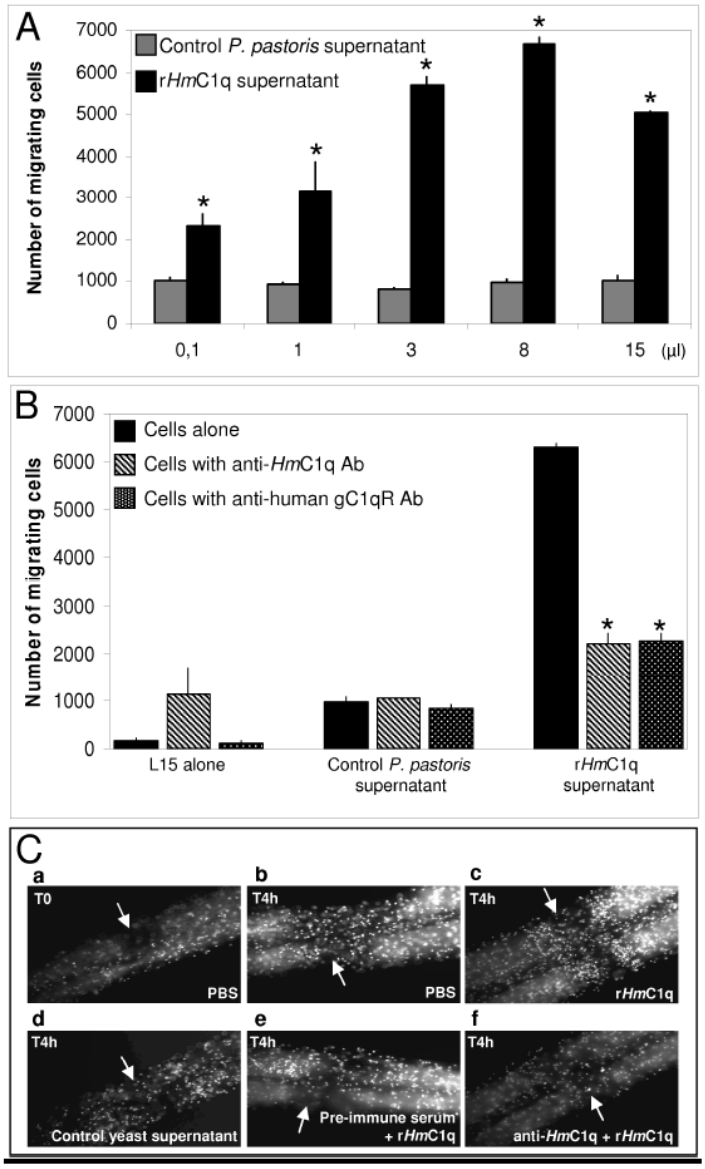
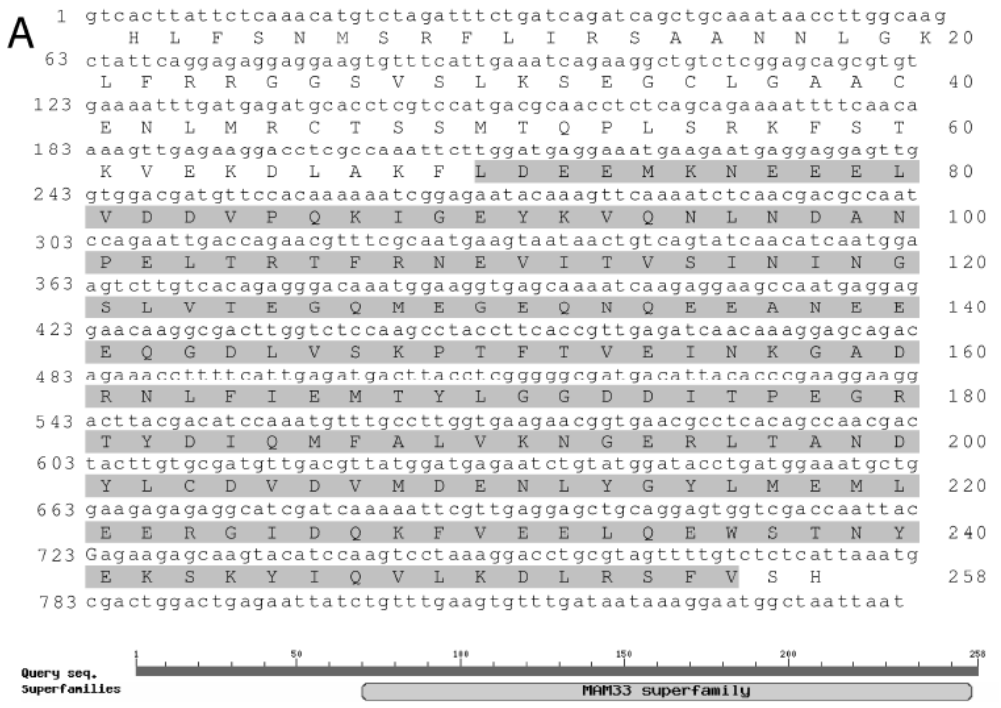


Figure 2:
(A) Chemotactic effect of r*Hm*C1q on leech microglia migration. The r*Hm*C1q supernatant was compared to the control supernatant using similar volumes in respective chemotaxis assays (0.1, 1, 3, 8, 15 µL). Diagram illustrates the chemotactic activity of r*Hm*C1q in a dose-dependent manner. Asterisks denote that cell migration of the indicated sample was significantly different ($p < 0.01$) than the corresponding control value. (B) Inhibitory effects on r*Hm*C1q-mediated leech microglia chemotaxis. The leech microglia migration was respectively evaluated with either L15 medium, control *P. pastoris* supernatant or r*Hm*C1q-containing supernatant as chemoattractant. The inhibition of r*Hm*C1q effect was demonstrated by pre-incubation of cells either with the rabbit polyclonal anti-*Hm*C1q antibodies diluted at 1:25 (hatched in each condition) or with a mouse monoclonal anti-human gC1qR antibody (dotted in each condition). Asterisks denote that cell migration of the indicated sample was significantly different ($p < 0.01$) than the corresponding used chemoattractant. (C) Chemotactic effect of r*Hm*C1q on leech microglia in *ex vivo* assays. The microglial accumulation is observed 4 hours following crushing (see arrows). The lesion is simultaneously performed with the injection of respective molecules into connectives. The microglia accumulation is observed 4 hours after injury (a) compared to T=0 with injection of PBS as control (b). The injection of r*Hm*C1q increased the microglial cells recruitment (c) compared either to the presence of PBS only (b) or to the control yeast supernatant (d). The injection of r*Hm*C1q is not significantly chemoattractant when tissues are injected with polyclonal anti-*Hm*C1q antibody (f) while pre-incubation with pre-immune serum does not exert any neutralizing effect on r*Hm*C1q (e). The using of Hœchst dye is possible because only microglia are present in connective as circulating resident cells.



B

Accession number	Protein ID	Species	Homology
ref|XP_002400595.1|	glycoprotein gC1qBP, putative	Ixodes scapularis	55%
ref|NP_001017858.1|	complement component 1, q subcomponent binding protein	Danio rerio	52%
gb|ACO07818.1|	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial precursor	Oncorhynchus mykiss	52%
gb|ACI67786.1|	Complement component 1 Q subcomponent binding protein, mitochondrial precursor	Salmo salar	52%
ref|NP_031599.2|	complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial	Mus musculus	47%
ref|NP_062132.2|	complement component 1, q subcomponent binding protein precursor	Rattus norvegicus	47%

Figure 3:
Partial characterization of *a* C1qBP related molecule in the medicinal leech nerve cord (named *Hm*C1qBP). (A) The present nucleotide sequence was obtained from a specific EST library constructed from total RNA of adult leech nerve cords. It encodes an amino acid sequence (258 amino acids) containing the MAM33 conserved domain (highlighted in light grey, 70-256). Numbers of nucleotides and amino acids are, respectively, indicated on left and right of the sequence. (B) Blast P alignment showed mst important homologies (ranging from 47% to 55%) concerning some C1qBP molecules. (C) Fluorescence *in situ* hybridization on injured nerve cords. Confocal microscopy images show mRNA localization using *Hm*C1qBP antisense riboprobe in microglial cells (arrows) of a ganglion. Sense probe was used as negative control and did not show any signal (inset in c').

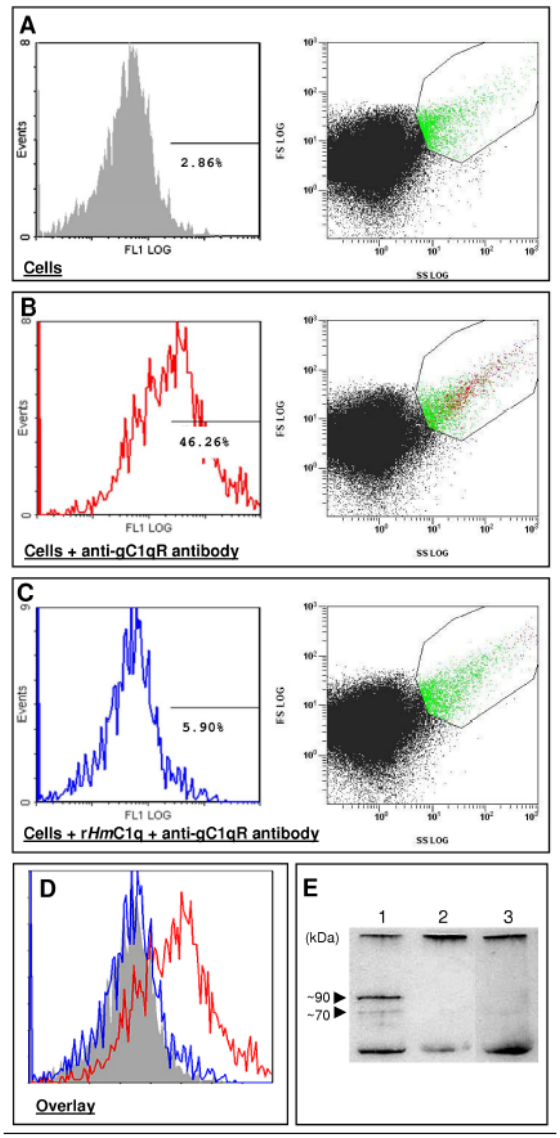


Figure 4:
Flow cytometric analysis of the leech nerve cells by using anti-human gC1qR antibody. (A) On the right side, we represented an FSC versus SSC dot plot for the leech nerve cells incubated overnight. Among the cells in the studied gate, 2.86% of auto-fluorescence are shown on FL1 scale on the left. (B) On the right, we represented an FSC versus SSC dot plot for the leech nerve cells incubated overnight with the fluorescein-labeled mouse monoclonal anti-human gC1qR antibody for 30 min (dilution 1:250 in L-15 medium). In the studied gate, 46.26 % of the leech nerve cells were stained as shown on FL1 scale on the left. The use of the monoclonal antibody did not affect the cells dot plot profile. (C) On the right, we represented an FSC versus SSC dot plot for the leech nerve cells incubated overnight with 8 µl of r*Hm*C1q supernatant then treated with the fluorescein-labeled mouse monoclonal anti-human gC1qR antibody for 30 min (dilution 1:250 in L-15 medium). The fluorescence rapidly decreased and only 5.90% of the nerve cells were stained on FL1 scale on the left. (D) Flow cytometry histogram overlay shows a shift in fluorescence when the nerve cells are incubated with anti-human gC1qR antibody (red) compared to either the nerve cells that were previously incubated with r*Hm*C1q supernatant (blue) or the nerve cells alone (grey). These data are representative of three independent experiments. (E) Co-immunoprecipitation experiments were used protein A/G PLUS agarose beads which were coupled to a molecular complex (rabbit polyclonal anti-*Hm*C1q antibodies incubated with recombinant *Hm*C1q). Then samples were co-immunoprecipitated with leech CNS membrane protein-enriched extract (lane 1). Two negative controls were used prior to incubate with protein A/G PLUS agarose beads and corresponded either to the anti-*Hm*C1q Ab/rHmC1q complex without any incubation with protein extract (lane 2) or to the anti-*Hm*C1q Ab alone (lane 3). A western blotting analysis using a mouse monoclonal anti-human gC1qR (60.11) antibody allowed the detection of two products (lane 1, ~70 kDa and ~90 kDa respectively) which were not observed in negative controls (lanes 2 and 3).

References

Bos IG, de Bruin EC, Karuntu YA, Modderman PW, Eldering E, Hack CE. 2003. Recombinant human C1-inhibitor produced in Pichia pastoris has the same inhibitory capacity as plasma C1-inhibitor. Biochim Biophys Acta 1648(1-2):75-83.

Briand L, Perez V, Huet JC, Danty E, Masson C, Pernollet JC. 1999. Optimization of the production of a honeybee odorant-binding protein by Pichia pastoris. Protein Expr Purif 15(3):362-9.

Chen A, Kumar SM, Sahley CL, Muller KJ. 2000. Nitric oxide influences injury-induced microglial migration and accumulation in the leech CNS. J Neurosci 20(3):1036-43.

Chu Y, Jin X, Parada I, Pesic A, Stevens B, Barres B, Prince DA. 2010. Enhanced synaptic connectivity and epilepsy in C1q knockout mice. Proc Natl Acad Sci U S A 107(17):7975-80.

Coggeshall RE, Fawcett DW. 1964. The Fine Structure of the Central Nervous System of the Leech, Hirudo Medicinalis. J Neurophysiol 27:229-89.

Cregg JM, Cereghino JL, Shi J, Higgins DR. 2000. Recombinant protein expression in Pichia pastoris. Mol Biotechnol 16(1):23-52.

Croq F, Vizioli J, Tuzova M, Tahtouh M, Sautiere PE, Van Camp C, Salzet M, Cruikshank WW, Pestel J, Lefebvre C. 2010. A homologous of interleukin 16 active form is implicated in microglia recruitment in leech Hirudo medicinalis following nervous system injury. Glia in press.

Duan Y, Panoff J, Burrell BD, Sahley CL, Muller KJ. 2005. Repair and regeneration of functional synaptic connections: cellular and molecular interactions in the leech. Cell Mol Neurobiol 25(2):441-50.

Eggleton P, Ghebrehiwet B, Sastry KN, Coburn JP, Zaner KS, Reid KB, Tauber AI. 1995. Identification of a gC1q-binding protein (gC1q-R) on the surface of human neutrophils. Subcellular localization and binding properties in comparison with the cC1q-R. J Clin Invest 95(4):1569-78.

Elliott EJ, Muller KJ. 1981. Long-term survival of glial segments during nerve regeneration in the leech. Brain Res 218(1-2):99-113.

Elliott EJ, Muller KJ. 1983. Sprouting and regeneration of sensory axons after destruction of ensheathing glial cells in the leech central nervous system. J Neurosci 3(10):1994-2006.

Erdei A, Reid KB. 1988. Characterization of C1q-binding material released from the membranes of Raji and U937 cells by limited proteolysis with trypsin. Biochem J 255(2):493-9.

Farber K, Cheung G, Mitchell D, Wallis R, Weihe E, Schwaeble W, Kettenmann H. 2009. C1q, the recognition subcomponent of the classical pathway of complement, drives microglial activation. J Neurosci Res 87(3):644-52.

Flierman R, Daha MR. 2007. Pathogenic role of anti-C1q autoantibodies in the development of lupus nephritis--a hypothesis. Mol Immunol 44(1-3):133-8.

Gehrmann J. 1996. Microglia: a sensor to threats in the nervous system? Res Virol 147(2-3):79-88.

Gestal C, Pallavicini A, Venier P, Novoa B, Figueras A. 2010. MgC1q, a novel C1q-domain-containing protein involved in the immune response of Mytilus galloprovincialis. Dev Comp Immunol.

Ghebrehiwet B, Lim BL, Peerschke EI, Willis AC, Reid KB. 1994. Isolation, cDNA cloning, and overexpression of a 33-kD cell surface glycoprotein that binds to the globular "heads" of C1q. J Exp Med 179(6):1809-21.

Ghebrehiwet B, Peerschke EI. 2004. cC1q-R (calreticulin) and gC1q-R/p33: ubiquitously expressed multi-ligand binding cellular proteins involved in inflammation and infection. Mol Immunol 41(2-3):173-83.

Hanisch UK, Kettenmann H. 2007. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. Nat Neurosci 10(11):1387-94.

Huang S, Yuan S, Guo L, Yu Y, Li J, Wu T, Liu T, Yang M, Wu K, Liu H and others. 2008. Genomic analysis of the immune gene repertoire of amphioxus reveals extraordinary innate complexity and diversity. Genome Res 18(7):1112-26.

Jha BK, Salunke DM, Datta K. 2002. Disulfide bond formation through Cys186 facilitates functionally relevant dimerization of trimeric hyaluronan-binding protein 1 (HABP1)/p32/gC1qR. Eur J Biochem 269(1):298-306.

Kishore U, Gaboriaud C, Waters P, Shrive AK, Greenhough TJ, Reid KB, Sim RB, Arlaud GJ. 2004. C1q and tumor necrosis factor superfamily: modularity and versatility. Trends Immunol 25(10):551-61.

Kohidai L. 1995. Method for determination of chemoattraction in Tetrahymena pyriformis. Curr Microbiol 30(4):251-3.

Kong P, Zhang H, Wang L, Zhou Z, Yang J, Zhang Y, Qiu L, Wang L, Song L. 2010. AiC1qDC-1, a novel gC1q-domain-containing protein from bay scallop Argopecten irradians with fungi agglutinating activity. Dev Comp Immunol.

Kreutzberg GW. 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. Trends Neurosci 19(8):312-8.

Kumar SM, Porterfield DM, Muller KJ, Smith PJ, Sahley CL. 2001. Nerve injury induces a rapid efflux of nitric oxide (NO) detected with a novel NO microsensor. J Neurosci 21(1):215-20.

Kuna P, Iyer M, Peerschke EI, Kaplan AP, Reid KB, Ghebrehiwet B. 1996. Human C1q induces eosinophil migration. Clin Immunol Immunopathol 81(1):48-54.

Leigh LE, Ghebrehiwet B, Perera TP, Bird IN, Strong P, Kishore U, Reid KB, Eggleton P. 1998. C1q-mediated chemotaxis by human neutrophils: involvement of gClqR and G-protein signalling mechanisms. Biochem J 330 (Pt 1):247-54.

Lim BL, Reid KB, Ghebrehiwet B, Peerschke EI, Leigh LA, Preissner KT. 1996. The binding protein for globular heads of complement C1q, gC1qR. Functional expression and characterization as a novel vitronectin binding factor. J Biol Chem 271(43):26739-44.

Liu S, Wu J, Zhang T, Qian B, Wu P, Li L, Yu Y, Cao X. 2008. Complement C1q chemoattracts human dendritic cells and enhances migration of mature dendritic cells to CCL19 via activation of AKT and MAPK pathways. Mol Immunol 46(2):242-9.

Lynch NJ, Willis CL, Nolan CC, Roscher S, Fowler MJ, Weihe E, Ray DE, Schwaeble WJ. 2004. Microglial activation and increased synthesis of complement component C1q precedes blood-brain barrier dysfunction in rats. Mol Immunol 40(10):709-16.

Mariani MM, Kielian T. 2009. Microglia in Infectious Diseases of the Central Nervous System. J Neuroimmune Pharmacol.

Masuda-Nakagawa LM, Muller KJ, Nicholls JG. 1990. Accumulation of laminin and microglial cells at sites of injury and regeneration in the central nervous system of the leech. Proc Biol Sci 241(1302):201-6.

McGlade-McCulloh E, Morrissey AM, Norona F, Muller KJ. 1989. Individual microglia move rapidly and directly to nerve lesions in the leech central nervous system. Proc Natl Acad Sci U S A 86(3):1093-7.

Melillo D, Sfyroera G, De Santis R, Graziano R, Marino R, Lambris JD, Pinto MR. 2006. First identification of a chemotactic receptor in an invertebrate species: structural and functional characterization of Ciona intestinalis C3a receptor. J Immunol 177(6):4132-40.

Mladinic M, Muller KJ, Nicholls JG. 2009. Central nervous system regeneration: from leech to opossum. J Physiol 587(Pt 12):2775-82.

Nardelli-Haefliger D, Shankland M. 1992. Lox2, a putative leech segment identity gene, is expressed in the same segmental domain in different stem cell lineages. Development 116(3):697-710.

Naresha S, Suryawanshi A, Agarwal M, Singh BP, Joshi P. 2009. Mapping the complement C1q binding site in Haemonchus contortus calreticulin. Mol Biochem Parasitol 166(1):42-6.

Nauta AJ, Castellano G, Xu W, Woltman AM, Borrias MC, Daha MR, van Kooten C, Roos A. 2004. Opsonization with C1q and mannose-binding lectin targets apoptotic cells to dendritic cells. J Immunol 173(5):3044-50.

Nayak A, Ferluga J, Tsolaki A, Kishore U. 2010. The non-classical functions of the classical complement pathway recognition subcomponent C1q. Immunol Lett.

Nepomuceno RR, Henschen-Edman AH, Burgess WH, Tenner AJ. 1997. cDNA cloning and primary structure analysis of C1qR(P), the human C1q/MBL/SPA receptor that mediates enhanced phagocytosis in vitro. Immunity 6(2):119-29.

Ngu EM, Sahley CL, Muller KJ. 2007. Reduced axon sprouting after treatment that diminishes microglia accumulation at lesions in the leech CNS. J Comp Neurol 503(1):101-109.

Olson JK, Miller SD. 2004. Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. J Immunol 173(6):3916-24.

Seytter T, Lottspeich F, Neupert W, Schwarz E. 1998. Mam33p, an oligomeric, acidic protein in the mitochondrial matrix of Saccharomyces cerevisiae is related to the human complement receptor gC1q-R. Yeast 14(4):303-10.

Shimono C, Manabe R, Yamada T, Fukuda S, Kawai J, Furutani Y, Tsutsui K, Ikenaka K, Hayashizaki Y, Sekiguchi K. 2010. Identification and characterization of nCLP2, a novel C1q family protein expressed in the central nervous system. J Biochem 147(4):565-79.

Soares MB, Bonaldo MF, Jelene P, Su L, Lawton L, Efstratiadis A. 1994. Construction and characterization of a normalized cDNA library. Proc Natl Acad Sci U S A 91(20):9228-32.

Speth C, Dierich MP, Gasque P. 2002. Neuroinvasion by pathogens: a key role of the complement system. Mol Immunol 38(9):669-79.

Tahtouh M, Croq F, Lefebvre C, Pestel J. 2009a. Is complement good, bad, or both? New functions of the complement factors associated with inflammation mechanisms in the central nervous system. Eur Cytokine Netw 20(3):95-100.

Tahtouh M, Croq F, Vizioli J, Sautiere PE, Van Camp C, Salzet M, Daha MR, Pestel J, Lefebvre C. 2009b. Evidence for a novel chemotactic C1q domain-containing factor in the leech nerve cord. Mol Immunol 46(4):523-31.

Tastet C, Lescuyer P, Diemer H, Luche S, van Dorsselaer A, Rabilloud T. 2003. A versatile electrophoresis system for the analysis of high- and low-molecular-weight proteins. Electrophoresis 24(11):1787-94.

Trendelenburg M. 2005. Antibodies against C1q in patients with systemic lupus erythematosus. Springer Semin Immunopathol 27(3):276-85.

Vegh Z, Goyarts EC, Rozengarten K, Mazumder A, Ghebrehiwet B. 2003. Maturation-dependent expression of C1q-binding proteins on the cell surface of human monocyte-derived dendritic cells. Int Immunopharmacol 3(3):345-57.

Vegh Z, Kew RR, Gruber BL, Ghebrehiwet B. 2006. Chemotaxis of human monocyte-derived dendritic cells to complement component C1q is mediated by the receptors gC1qR and cC1qR. Mol Immunol 43(9):1402-7.

Vergote D, Macagno ER, Salzet M, Sautiere PE. 2006. Proteome modifications of the medicinal leech nervous system under bacterial challenge. Proteomics 6(17):4817-25.

von Bernhardi R, Muller KJ. 1995. Repair of the central nervous system: lessons from lesions in leeches. J Neurobiol 27(3):353-66.

Webster SD, Yang AJ, Margol L, Garzon-Rodriguez W, Glabe CG, Tenner AJ. 2000. Complement component C1q modulates the phagocytosis of Abeta by microglia. Exp Neurol 161(1):127-38.

Zhang H, Song L, Li C, Zhao J, Wang H, Qiu L, Ni D, Zhang Y. 2008. A novel C1q-domain-containing protein from Zhikong scallop Chlamys farreri with lipopolysaccharide binding activity. Fish Shellfish Immunol 25(3):281-9.

1. Caractérisation biochimique de r*Hm*C1q.

La forme recombinante de *Hm*C1q a été exprimée par la levure *P. pastoris* sous le contrôle du promoteur alcool oxydase inductible par le méthanol et sécrétée à l'aide de son peptide signal naturel. Des surnageants de levures transformées ont été testés en western blot avec l'anticorps spécifique anti-*Hm*C1q. Un clone positif a été sélectionné. Ce dernier a donné trois produits de tailles très proches dans une gamme correspondant à celle de la protéine native. La levure *P. pastoris* est capable d'ajouter des N- et O-glycosylations [Cregg et al., 2000]. Ceci a probablement abouti à la production d'une protéine finale différemment glycosylée ce qui justifie les trois produits observés en western blot. Le clone positif sélectionné a été purifié par HPLC. La forme recombinante a été majoritairement éluée par un taux d'acétonitrile de 10%. Le western blot de cette fraction avec l'anticorps spécifique anti-*Hm*C1q a révélé un signal dont la taille correspond à la forme native de la molécule *Hm*C1q.

2. Effets chimiotactiques de la forme recombinante de *Hm*C1q sur les cellules microgliales de la sangsue médicinale.

Les données de la publication n°3 ont montré la capacité de la forme secrétée de *Hm*C1q à recruter les cellules microgliales de la sangsue de façon dose-dépendante. Possédant la forme recombinante, l'effet du surnageant du clone positif sélectionné a été testé sur la migration des cellules microgliales. Au final, 18.1 % des cellules microgliales ont été recrutées par le surnageant contenant r*Hm*C1q également de façon dose-dépendante. Le surnageant contrôle *P. pastoris* issu d'une culture de levures non transformées, a été utilisé comme contrôle négatif et n'a exercé aucun effet significatif sur la migration cellulaire. De manière intéressante, le recrutement initié par le r*Hm*C1q a été inhibé par l'utilisation de l'anticorps polyclonal anti-*Hm*C1q (2.8 % des cellules ont été seulement recrutées). Des résultats similaires d'accumulation ont été observés en utilisant la fraction positive de r*Hm*C1q purifiée par HPLC en phase inverse. Ainsi, les résultats indiquent clairement que les cellules microgliales de sangsue répondent à la forme recombinante de la protéine *Hm*C1q contenue dans le surnageant du clone purifié et dans la fraction purifiée en HPLC. Cette réponse est également dose-dépendante

comme cela avait été noté pour la forme humaine du C1q (publication 3). Cette donnée ne vient pas juste valider les effets obtenus avec la protéine native secrétée dans le milieu, mais elle apporte aussi la preuve que la molécule recombinante *Hm*C1q exerce une activité de cytokine, capable d'agir toute seule et directement pour recruter une sous-population spécifique de cellules microgliales du SNC de la sangsue.

3. Caractérisation moléculaire partielle du récepteur *Hm*C1qBP:

- La fraction positive de la forme recombinante de *Hm*C1q purifiée en HPLC sera utilisée dans la suite des expériences et sera nommée r*Hm*C1q. Dans le but de caractériser la structure réceptrice de r*Hm*C1q, nous avons consulté la banque d'EST du système nerveux de *Hirudo medicinalis*. Une séquence que nous avons, pour des raisons d'homologies de séquence, nommée *Hm*C1qBP a été déduite et code pour une protéine de 258 acides aminés. Comparée aux bases de données avec le programme BLAST-P, *Hm*C1qBP présente des homologies, variant de 47 à 55%, avec des molécules C1qBP (également connues sous les termes de gC1qR; GC1QBP ; gC1Q-R; p32; HABP1; SF2p32). De plus, elle possède le domaine conservé par les molécules appartenant à la famille C1qBP, le domaine MAM33. Ce domaine est conservé dans des protéines de la matrice mitochondriale se liant aux têtes globulaires de C1q [Seytter et al., 1998]. En effet, *Hm*C1qBP est homologue à des protéines C1qBP mitochondriales (ex : C1qBP de la souris). Chez les vertébrés, les cellules microgliales expriment ce récepteur (C1qBP). Au sein du SNC de la sangsue, les transcrits de *Hm*C1qBP ont été détectés au sein des cellules microgliales de la sangsue par hybridation *in situ*. Cette dernière observation est très prometteuse, surtout que les cellules microgliales ont été démontrées comme étant capables d'interagir avec la protéine *Hm*C1q (publication 4) et aussi avec sa forme recombinante.

- Des chaines nerveuses de la sangsue médicinale ont été isolées et les cellules nerveuses ont été dissociées et incubées avec r*Hm*C1q. L'anticorps monoclonal anti-gC1qR humain a été ensuite utilisé pour 30 minutes. Cet anticorps a été produit en utilisant un peptide synthétique correspondant à la région (acides aminés 74-282) de la séquence de C1qBP mature humaine et a été marqué à la fluorescéine (sc-23885 FITC).

Les cellules ont été ensuite analysées en cytométrie de flux. Les résultats viennent conforter l'idée de la présence d'un récepteur pour *Hm*C1q exprimé par les cellules nerveuses de la sangsue médicinale. En effet, la pré-incubation des cellules nerveuses avec la molécule recombinante avait inhibé l'accès de l'anticorps monoclonal anti-gC1qR humain. Le pourcentage des cellules marquées est passé de 46.26 % en absence de r*Hm*C1q à seulement 5.90% en présence de la protéine recombinante. La molécule r*Hm*C1q semble donc interagir avec une structure réceptrice reconnue par l'anticorps anti-gC1qR humain.

Prises ensemble, ces données mettent en évidence la présence d'une séquence *Hm*C1qBP homologue à celle des vertébrés dans la banque EST du SNC de la sangsue médicinale. Ses transcrits ont été détectés au niveau des cellules microgliales par hybridation *in situ*. De plus, en cytométrie de flux, la forme recombinante de la molécule *Hm*C1q semble interagir avec une structure réceptrice exprimée sur les cellules du SNC et peut correspondre à la séquence déduite dans la banque. Cette donnée vient confirmer le résultat obtenu dans la publication 3 portant sur l'utilisation de l'anticorps monoclonal anti-gC1qR humain qui avait reconnu en western blot des produits dont la taille correspond à celle de la multimérisation du récepteur gC1qR chez les vertébrés [Jha et al., 2002; Lim et al., 1996]. Dans le but d'identifier ce récepteur, le milieu enrichi en protéines membranaires du SNC de la sangsue, a été incubé avec r*Hm*C1q. Les tests d'immunoprécipitations révélées en western blot avec l'anticorps monoclonal anti-gC1qR humain ont mis en évidence des molécules membranaires apparentées au gC1qR humain. Le western blot avec l'anticorps secondaire seul a été utilisé en contrôle négatif. Des analyses en spectrométrie de masse avec diverses stratégies « bottom-up » et « top down » font actuellement l'objet d'une grande attention pour caractériser définitivement le produit reconnu par l'anticorps monoclonal humain et confirmer qu'il s'agisse de la molécule nommée *Hm*C1qBP. La participation d'autres structures réceptrices pour *Hm*C1q n'est pas à exclure. En effet, la découverte dans les banques de données de système nerveux de sangsue de molécules apparentées au cC1qR (calréticuline), un partenaire de gC1qR contribuant à l'activité chimioattractante du C1q chez les vertébrés [Vegh et al., 2006], nous incite à rechercher l'ensemble des interactants de *Hm*C1q.

L'ensemble de ces résultats a permis de caractériser une forme recombinante de la protéine *Hm*C1q. Sa capacité à recruter une sous-population de cellules microgliales au sein du SNC de la sangsue a confirmé sa fonction de cytokine. Ce travail a aussi mis en évidence une structure réceptrice *Hm*C1qBP dans la banque EST du système nerveux de la sangsue médicinale qui nous permettra de suivre plus précisément l'activation microgliale médiée par *Hm*C1q. Ainsi, son importance à la fois dans l'intensité et dans la rapidité du recrutement de la microglie sera étudiée afin de mieux comprendre cette étape déterminante menant à la réparation nerveuse chez la sangsue.

Discussion

L'ensemble des travaux réalisés au cours de ma thèse met en évidence, pour la première fois dans le SNC d'un invertébré, l'existence de la molécule *Hm*C1q, homologue à la protéine C1q des vertébrés. En vue d'étudier ses fonctions et son influence directe sur l'accumulation des cellules microgliales au site de lésion, sa forme recombinante a été produite chez la levure *Pichia pastoris*.

Au niveau du SNC de la sangsue *Hirudo medicinalis*, les cellules microgliales s'accumulent rapidement au niveau du site de lésion [Babington et al., 2005; Morgese et al., 1983]. La protéine *Hm*C1q, constitutivement exprimée au sein des neurones, est impliquée dans ce phénomène d'accumulation précoce de la microglie. En effet, cette molécule s'accumule directement au niveau de la lésion du connectif, et a été démontrée capable d'augmenter le recrutement d'une sous-population de cellules microgliales en réponse à la blessure. *Hm*C1q joue donc le rôle d'une cytokine capable d'agir directement, pour recruter d'une façon dose-dépendante une sous-population cible de cellules microgliales.

L'activité de la protéine *Hm*C1q est dépendante d'une structure réceptrice homologue à gC1qR des vertébrés. Ceci a été observé (1) dans les tests de chimiotactisme où le recrutement des cellules microgliales de sangsue a été inhibé en présence de l'anticorps monoclonal anti-gC1qR humain, (2) dans les expériences de cytométrie de flux où *Hm*C1q a interagi avec une structure réceptrice reconnue par l'anticorps humain et (3) dans les tests d'immunoprécipitation où l'anticorps monoclonal anti-gC1qR a reconnu une protéine membranaire interagissant avec la protéine *Hm*C1q. L'ensemble de ces résultats apporte une forte présomption sur l'existence d'une structure réceptrice homologue à gC1qR dans le SNC de la sangsue.

A cela, s'ajoute une séquence homologue à gC1qR déduite à partir de la banque EST du système nerveux de la sangsue médicinale. Cette séquence est exclusivement homologue aux protéines gC1qR des vertébrés et contient le domaine conservé MAM33 qui est spécifique de cette famille de récepteurs [Seytter et al., 1998]. L'ensemble des résultats est illustré dans la figure 15. Suite à une lésion de la chaîne nerveuse de la

sangsue médicinale, les cellules microgliales s'accumulent au niveau du site de blessure. Cette accumulation est rapidement accompagnée d'une libération de la protéine *Hm*C1q à l'extrémité des axones lésés. *Hm*C1q augmente le recrutement d'une sous-population spécifique de cellules microgliales. Présentes au niveau du site de lésion, ces cellules contribuent à la réparation efficace du SNC de la sangsue bien que leur rôle n'ait été défini précisément à ce jour. L'activité de *Hm*C1q passe par une structure réceptrice homologue à gC1qR des vertébrés. Ce récepteur serait porté par la sous-population des cellules cibles.

Une étude récente a montré que l'accumulation de la microglie au site de la blessure est essentielle à la repousse axonale [Ngu et al., 2007]. Sachant que la molécule *Hm*C1q est impliquée dans l'accumulation des cellules microgliales au sein de la lésion, elle pourrait donc jouer un rôle primordial dans la réponse neuro-inflammatoire et dans la repousse axonale chez la sangsue médicinale.

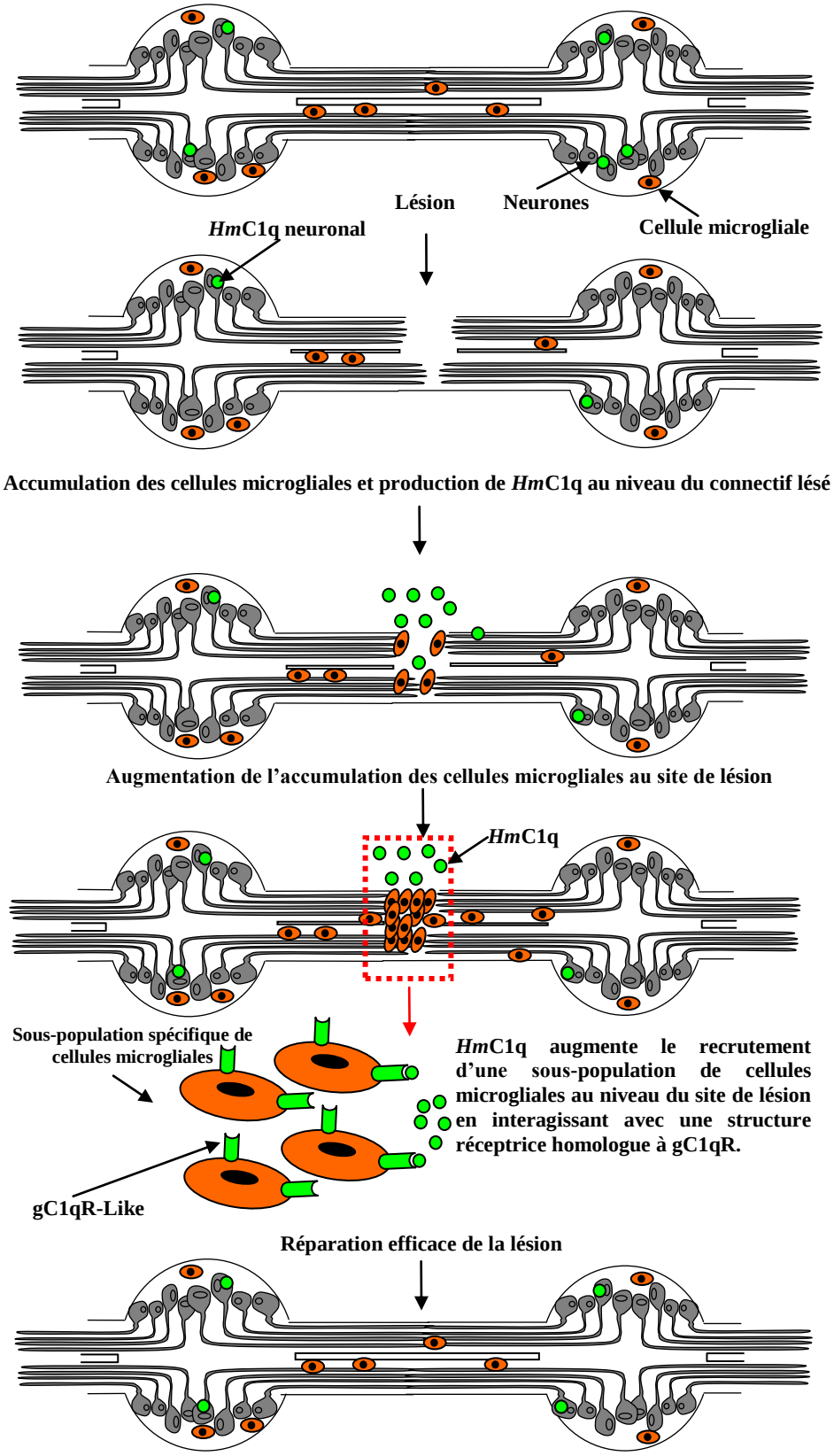


Figure 15 : **Récapitulatif de l'ensemble des résultats.**

Existe t-il des molécules apparentées à C1q dans le système nerveux d'invertébrés autre que la sangsue médicinale?

C1q est connue pour être la composante essentielle de la voie classique du complément chez les vertébrés. Des séquences apparentées à cette molécule ont été aussi retrouvées chez des modèles invertébrés. Des séquences homologues à C1q ont été mises en évidence dans le génome de l'oursin [Hibino et al., 2006]. Cependant, basé sur la structure primaire du domaine C1q, il est difficile d'étudier l'implication de ces molécules dans l'une des voies d'activation du complément connues chez les vertébrés.

D'autres molécules apparentées au C1q ont été caractérisées à l'échelle moléculaire mais également à l'échelle fonctionnelle. En effet, une molécule complètement caractérisée chez l'amphioxus *Branchiostoma floridae* a été nommée AmphiC1q1. Elle présente des homologies avec la CTRP1 appartenant aussi à la famille C1q. De plus, elle est capable de se lier aux LPS des bactéries à Gram négatif, et d'induire une activation et une agrégation plaquettaire comme celle observée avec C1q et CTRP1 chez les mammifères. Cette molécule est ainsi capable de reconnaître les structures bactériennes et d'induire une agrégation cellulaire [Huang et al., 2008; Yu et al., 2008].

De même, chez la moule *Mytilus galloprovincialis*, une protéine *Mg*C1q a été caractérisée. Cette protéine a été détectée tout au long de l'ontogenèse du bivalve et est modulée par les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Elle présente une similitude élevée avec une lectine liant l'acide sialique. Cette molécule semble donc jouer le rôle d'une lectine qui peut reconnaître des motifs bactériens définis [Gestal et al., 2010].

Ces données au niveau des tissus périphériques, suggèrent que le C1q chez les invertébrés pourrait faire partie d'une voie d'activation similaire à celle des lectines chez les vertébrés, plutôt qu'intervenir dans la voie classique qui repose sur la présence des complexes immuns anticorps-antigène [Gestal et al., 2010]. Dans ce contexte, la protéine *Hm*C1q caractérisée dans le système nerveux de la sangsue médicinale est apparentée aux molécules de la famille C1q des vertébrés et à certaines molécules C1qTNF appartenant à

cette famille. Néanmoins, il n'y a pas de voie classique possible en absence des complexes immuns anticorps-antigènes chez les invertébrés. Deux hypothèses seraient donc envisageables (1) la protéine *Hm*C1q participerait à une cascade du complément où elle jouerait le rôle d'une lectine reconnaissant des motifs portés par les microorganismes ou aussi en interagissant avec d'autres molécules du complément aussi présentes dans le SNC de la sangsue (Voir encadré numéro 3) ou (2) elle pourrait aussi jouer le rôle de certaines C1qTNFs sélectivement présents au sein du système nerveux comme il est observé pour la molécule Cbln1 [Yuzaki, 2008]. Des expériences analysant la structure/ fonction de *Hm*C1q devraient permettre de trancher entre ces deux hypothèses.

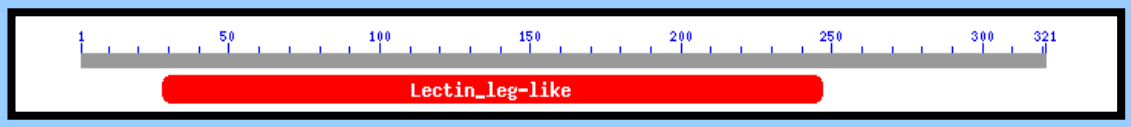
Bien que C1q semble jouer un rôle primordial dans la réponse neuro-inflammatoire chez les vertébrés en interagissant avec les cellules microgliales [Hanisch and Kettenmann, 2007], aucune étude n'a été effectuée dans le SNC d'un invertébré permettant de caractériser des molécules apparentées à C1q et d'évaluer leur rôle dans cette réponse.

Le recours à des modèles invertébrés plus simples et capables de réparer efficacement leur tissu nerveux endommagé peut donc constituer une approche intéressante pour tenter d'élucider le rôle du C1q au niveau du système nerveux central. Ainsi, les données préalablement présentées représentent la caractérisation de la première molécule apparentée à C1q dans le système nerveux d'un invertébré, la sangsue médicinale. Cette molécule joue le rôle d'une cytokine participant à l'accumulation des cellules microgliales au site de lésion. La poursuite de l'étude fonctionnelle pourrait éclaircir le rôle de notre molécule dans la réponse neuro-inflammatoire et préciser son intervention dans le dialogue neurones-microglie lors de la repousse axonale chez la sangsue.

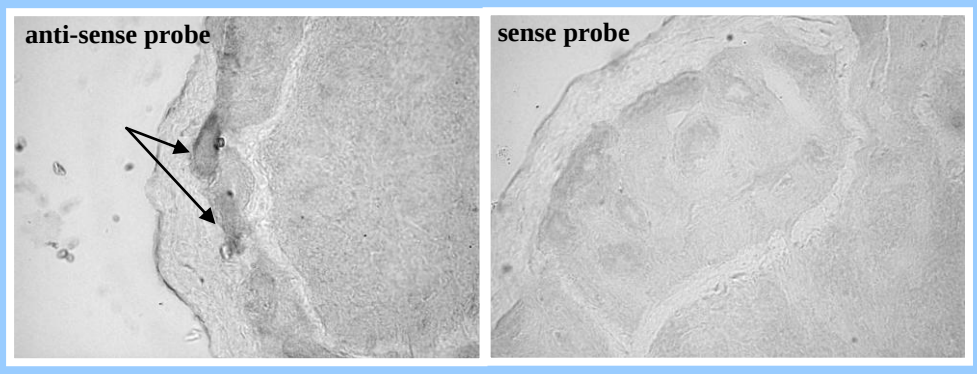
Encadré 3:

Dans la banque EST du SNC de la sangsue médicinale il existe plusieurs molécules apparentées au système du complément comme la MBL-like ou aussi la CD109-like. Ces protéines pourraient participer à une même cascade avec *Hm*C1q dont l'étude a été privilégiée. Cependant, la caractérisation des autres molécules est en cours et quelques résultats ont été déjà obtenus.

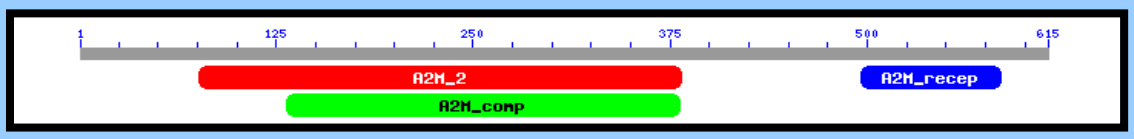
Une protéine MBL-like a été retrouvée dans la banque EST de la sangsue médicinale. Cette dernière contient le domaine conservé Lectin-Leg-Like. Le résultat de blast-P montre son homologie avec les protéines des vertébrés liant le mannose. Ses transcrits ont été retrouvés dans certains neurones par hybridation *in situ* sur des ganglions de sangsue médicinale.



>gb|EDL41187.1|lectin, mannose-binding 2 [Mus musculus] Length=358
Identities = 124/236 (52%), Positives = 165/236 (69%).
>gb|EAW85014.1|lectin, mannose-binding 2 [Homo sapiens]Length=356
Identities = 135/269 (50%), Positives = 179/269 (66%).



De même, une molécule apparentée aux alpha2-macroglobulines a été retrouvée dans la banque EST. Elle contient les domaines conservés alpha2-macroglobulines et s'avère homologue aux TEPs et à la protéine CD109 humaine.



>gb|EAT39604.1| tep3 [Aedes aegypti]Length=1451, Identities = 229/599 (38%), Positives = 332/599 (55%).>
>gb|AAN78483.1| activated T-cell marker CD109 [Homo sapiens]Length=1445, Identities = 222/596 (37%), Positives = 329/596 (55%).

Quelles sont les caractéristiques des cellules microgliales de la sangsue ?

Chez les vertébrés, les cellules microgliales assurent l'immuno-surveillance du système nerveux central et sont maintenues dans un état quiescent en absence de blessure. En revanche, en réponse à une perturbation de leur environnement, elles sont les premières cellules à être activées, migrent sur le site de l'agression, prolifèrent et organisent la réponse immune la mieux adaptée.

Chez la sangsue médicinale, des études ont permis d'étudier la transformation morphologique des cellules microgliales, et donc le passage de l'état quiescent à l'état activé suite à la lésion du connectif. Dans des expériences d'immunohistochimie, un anticorps monoclonal anti-gliarine a été utilisé au laboratoire [Croq, 2010]. La gliarine fait partie des filaments protéiques exprimés spécifiquement au sein des cellules gliales du système nerveux de la sangsue médicinale [Xu et al., 1999]. En microscopie confocale, les cellules microgliales ramifiées, marquées avec l'anti-gliarine sont observées au sein du connectif (Figure 16A) et aussi au niveau des ganglions (Figure 16A') En microscopie électronique à transmission sur des ganglions non-lésés, les cellules microgliales (m) localisées dans le paquet de neurones, apparaissent allongées avec de nombreux pseudopodes (Figure 16B). Leur noyau est allongé et large. Vingt quatre heures après la lésion, un changement morphologique est observé. Les cellules microgliales, devenues rondes et activées, migrent vers le site de lésion au sein du connectif (Figure 16C). En microscopie électronique à balayage, ces cellules microgliales activées ont été observées au niveau de l'extrémité lésée du connectif (Figure 16D).

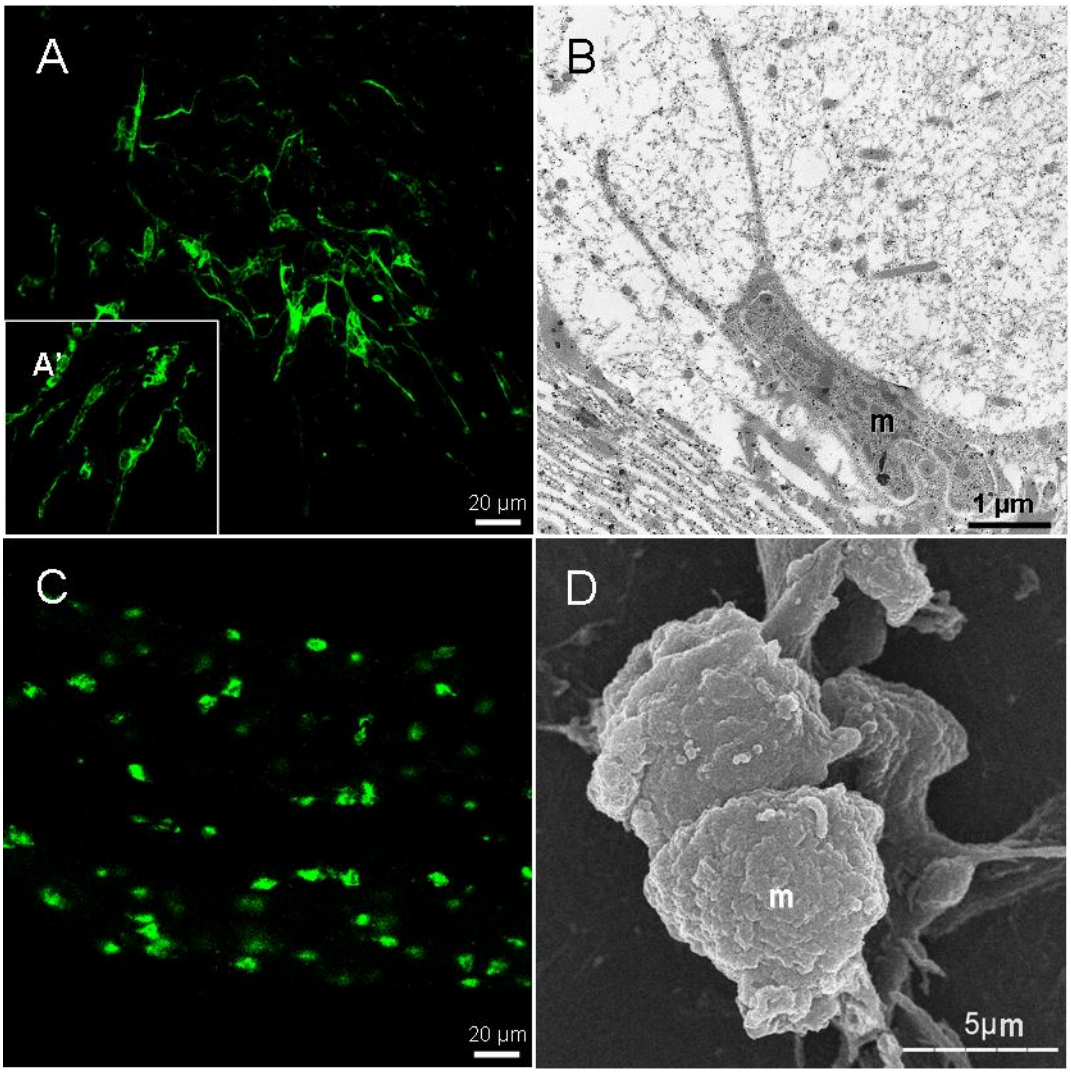


Figure 16 : **Changement morphologique des cellules microgliales (m)**. Passage de l'état **quiescent, ramifié** (A-A'et B) en absence d'une lésion, à un état **activé, arrondi** (C et D) suite à une lésion du connectif [Croq, 2010].

Ainsi, comme chez les vertébrés, les cellules microgliales de sangsue s'avèrent rapidement activées suite à une lésion. Elles changent de morphologie et migrent vers le site blessé. *Hm*C1q est une molécule homologue au C1q des vertébrés et participe à ce recrutement microglial au site de lésion. Mais cette molécule ne constitue qu'une pièce d'un grand puzzle de molécules présentes au sein du SNC de la sangsue, participant également à l'accumulation des sous-populations de cellules microgliales, au contrôle de la réponse neuro-inflammatoire et donc à une repousse neuronale efficace.

Quels sont les autres facteurs connus pour être impliqués dans le recrutement et l'accumulation des cellules microgliales de la sangsue médicinale au site de lésion?

Un homologue de l'interleukine-16 humaine chez la sangsue : *Hm*IL-16 (Voir publication 5).

L'IL-16 humaine est une cytokine pro-inflammatoire, nommée à l'origine « lymphocyte chemoattractant factor ou LCF» pour son activité de chimioattraction [Cruikshank and Center, 1982]. IL-16 est produite par plusieurs types cellulaires incluant les lymphocytes et les cellules microgliales [Center et al., 2000]. La forme mature de l'IL-16 correspond à un peptide sécrété suite à un clivage par la caspase 3, bioactif en formant des multimères [Zhang et al., 2001]. Ce dernier est un ligand de CD4 et est capable d'induire la migration de différents types de cellules CD4+ tel que les lymphocytes B et T, les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques. Dans le cerveau humain, dans des conditions pathologiques, IL-16 est constitutivement exprimée par une sous-population de cellules microgliales et peut assurer l'infiltration des lymphocytes CD4+ à travers la Barrière HématoEncéphalique-BHE [Schluesener et al., 1996]. De plus, la protéine IL-16 semble être impliquée dans des maladies neurodégénératives comme la sclérose en plaques où sa surexpression est associée à rôle dans la régulation de l'inflammation au sein des axones endommagés [Mittelbronn et al., 2001; Skundric et al., 2006]. Par ailleurs, des traitements de certaines maladies comme l'Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale (EAE) sont basés sur la neutralisation de l'IL-16 pro-inflammatoire. En effet, les souris traitées présentaient moins d'infiltration

de lymphocytes CD4+ et moins de démyélinisation axonale [Skundric et al., 2005a; Skundric et al., 2005b].

Une nouvelle molécule homologue de l'interleukine-16 humaine, nommée *Hm*IL-16, a été mise en évidence au laboratoire dans le SNC de la sangsue médicinale. La séquence partielle de *Hm*IL-16 contient le domaine PDZ en C-terminal. Elle contient également le motif GVGF et le résidu tryptophane (W) essentiels à la conformation connue de l'IL-16. De même, le résidu Arg^{107}, indispensable au chimiotactisme, est conservé dans la molécule de sangsue. En effet, *Hm*IL-16 possède une fonction de chimiokine, capable de recruter une sous-population de cellules microgliales de sangsue au site de lésion. Comme *Hm*C1q, cette protéine est constitutivement exprimée par les neurones. La forme neuronale de *Hm*IL-16 semble donc activer les cellules microgliales qui vont migrer vers le site de blessure. Les cellules microgliales vont elles-mêmes, plus tardivement, produire *Hm*IL-16 afin probablement de maintenir leur accumulation au site de lésion. Cette cytokine présente ainsi une forte activité chimioattractante capable de recruter une sous-population de cellules microgliales. Cette activité de recrutement cellulaire semble utiliser un homologue du CD4 - ligand naturel de l'IL-16 humaine - exprimé par les cellules microgliales. En effet, les lymphocytes T CD4+ humains, dont la migration chez les vertébrés est dépendante du CD4, ont été recrutés sous l'effet de la cytokine de sangsue *Hm*IL-16 dans des expériences *in vitro*. Ce recrutement a été significativement réduit en présence d'inhibiteur compétitif de l'IL-16 humaine agissant en saturant le CD4. Ce blocage d'effet chimioattractant a pu également être obtenu en présence de la forme soluble du CD4 dans la préparation, forme qui entre en compétition avec le CD4 membranaire sans toutefois activer les cellules cibles. Chez la sangsue, l'utilisation de l'anticorps hétérologue anti-CD4 humain a permis (1) par western blot sur des extraits de protéines totales du SNC de la sangsue la détection de deux produits dont la taille (55 et 75 kDa) est en concordance avec le CD4 humain, (2) par cytométrie de flux le marquage de 4,5% des cellules microgliales de sangsue. La caractérisation d'un tel récepteur est actuellement en cours au laboratoire.

Aucune molécule apparentée à l'IL-16 n'a été encore caractérisée chez les protostomiens. La protéine *Hm*IL-16 représente ainsi la première molécule apparentée à

l'IL-16 humaine, mise en évidence au niveau du système nerveux d'un invertébré, la sangsue médicinale. *Hm*IL-16, par son activité chimioattractante sur une sous- population de cellules microgliales à la suite d'une lésion, semble participer à la régulation de la réponse neuro-inflammatoire aboutissant à la réparation du système nerveux endommagé [Croq, 2010].

Un homologue du complexe p43/endothelial monocyte activating polypeptide II (EMAPII) :

Chez les vertébrés, les cellules microgliales activées sont impliquées dans la mise en place de la réponse immunitaire innée du SNC, notamment par leur capacité à produire de nombreuses cytokines proinflammatoires (Kreutzberg 1996 ; Kielian, 2004).

Chez les mammifères, EMAPII est considéré comme un modulateur de la réponse immunitaire innée. Différentes expériences utilisant des anticorps reconnaissant EMAPII montrent un immunomarquage accru des cellules microgliales lors de pathologies du SNC [Brabeck et al., 2002; Mueller et al., 2003].

Des travaux menés au laboratoire ont recherché, dans les banques d'EST de système nerveux de sangsue *H. medicinalis*, l'existence de molécules comparables à celles produites par les cellules microgliales de vertébrés, ceci afin d'étudier leurs rôles dans la réponse immunitaire du SNC de cet invertébré. En plus de *Hm*C1q et de *Hm*IL-16, une molécule présentant une importante identité avec la cytokine proinflammatoire humaine EMAPII (*Endothelial Monocyte-Activating Polypeptide II*) a été mise en évidence [Schikorski et al., 2009]. Cette protéine est issue du clivage d'un précurseur, la protéine P43 (complexe P43/EMAPII). L'ADNc complet codant le précurseur p43 a été complètement caractérisé. Ensuite, le rôle de la protéine *Hm*-EMAPII a été étudié au cours de la réponse immunitaire du SNC de la sangsue médicinale. La séquence protéique déduite de l'ADNc d'*Hm*-EMAPII montre 58% d'identité avec son homologue humaine (*h*EMAPII). L'utilisation d'un anticorps polyclonal hétérologue dirigé contre la molécule *h*EMAPII a permis de confirmer l'existence de la forme clivée d'*Hm*-EMAPII et de son

précurseur *Hm*-P43/EMAPII dans le SNC de la sangsue médicinale, suggérant ainsi qu'un mécanisme de clivage comparable à celui observé chez les vertébrés pourrait avoir lieu chez notre modèle. Des expériences d'hybridation *in situ* (HIS) et d'immunocytochimie indiquent que, comme chez les vertébrés, cette cytokine est exprimée et produite par les cellules microgliales et par les neurones de sangsue. Des analyses par PCR quantitative montrent que le niveau d'expression du gène *Hm*p43/EMAPII est induit à la fois lors d'une lésion de la chaîne nerveuse mais également lors d'une stimulation de celle-ci par des bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Ce gène semble donc être impliqué dans les processus de régénération du SNC de la sangsue mais également dans la mise en place de la réponse immunitaire innée induite lors d'une infection bactérienne. Des analyses d'immunohistochimie, réalisées sur des chaînes nerveuses axotomisées et cultivées ou non en conditions aseptiques, mettent en évidence une importante synthèse de cette molécule au niveau du site de lésion du système nerveux notamment par les cellules microgliales s'y étant accumulées. De plus, l'expression du gène *Hm*EMAPII semble être contrôlée par le récepteur de type Toll récemment caractérisé chez la sangsue, le *Hm*TLR1. Enfin, des tests de chimiotactisme réalisés en conditions hétérologues ont permis de révéler que la protéine recombinante *h*EMAPII (forme humaine) possédait un effet chémoattractant vis à vis des cellules microgliales de sangsue [Schikorski et al., 2009].

D'autres molécules homologues de la protéine P43 de vertébrés avaient préalablement été clonées chez d'autres invertébrés, tel que l'éponge *Geodia cydonium* [Pahler et al., 1998]. Cependant, lors de ces études, la localisation des sites d'expression et de production de cette molécule n'a pas été étudiée. Ces résultats acquis au sein du laboratoire, mettent ainsi en évidence une cytokine proinflammatoire présente dans le système nerveux de la sangsue médicinale *H. medicinalis*. Celle-ci participerait aux processus de défense de la chaîne nerveuse de la sangsue mais également à sa réparation.

Production du monoxyde d'azote (NO):

Le NO figure également parmi les molécules qui participent à la régénération du système nerveux central. En effet, chez des embryons de criquet l'inhibition de la production du NO altère le processus de la régénération des connectifs séparant les ganglions abdominaux [Stern and Bicker, 2008]. De même, chez la sangsue médicinale, suite à une lésion du SNC, la production en faible concentration de NO est rapidement observée et s'avère cruciale pour l'accumulation des cellules microgliales ainsi que pour le processus de régénération [Chen et al., 2000; Kumar et al., 2001; Shafer et al., 1998]. En effet, l'inhibition de la production du NO - reposant sur la NO-synthase (NOS) - avec 1mM de L-NAME réduit significativement l'accumulation des cellules microgliales au niveau du site de lésion. Cependant, son rôle dans la migration des cellules microgliales s'avère double. Libéré dans un deuxième temps en forte concentration, le NO inhibe la migration de la microglie tandis que les faibles concentrations, observées immédiatement après la lésion, la favorisent [Chen et al., 2000]. Le NO est donc indispensable au recrutement microglial et permet par un effet dose-dépendant de réguler cette migration.

Chez les vertébrés, en absence de lésion, les cellules microgliales se comportent comme des cellules sentinelles et produisent un panel de facteurs neurotrophiques veillant ainsi à maintenir l'intégrité neuronale et l'homéostasie au niveau du SNC. En cas d'inflammation, les cellules microgliales sont rapidement activées et migrent pour s'accumuler au niveau du site de lésion. La microglie activée sera alors capable de contribuer à la restauration des fonctions et de la structure des neurones en danger. Ceci en interagissant avec les autres cellules immunitaires par le biais de cytokines mais aussi par sa capacité phagocytaire efficace. Cependant, la persistance de cette inflammation ne sera que délétère. Les cellules microgliales suractivées produiront de l'oxyde nitrique (NO) par le biais de la NO-synthase induite (iNOS). Le NO synthétisé par la microglie ajouté au NO sécrété par les neurones eux mêmes grâce à la NO-synthase neuronale (nNOS) aboutira à une destruction des neurones; ceci, soit directement soit en réagissant avec le radical superoxide pour former le radical peroxynitrite [Hanisch, 2002].

L'ensemble de ces données indique que toutes les molécules caractérisées au sein du système nerveux de la sangsue médicinale offrent des potentiels très intéressants dans le dialogue de la microglie avec son environnement cellulaire. En effet, lors d'une lésion, ces protéines sont sécrétées notamment par les neurones endommagés et les extrémités lésées des connectifs afin d'activer le recrutement et l'accumulation de la microglie. Les interactions entre les cellules microgliales et les neurones semblent donc avoir un lien particulier contrôlé par un éventail de « cytokines », comme *Hm*C1q, *Hm*IL-16, *Hm*EMAPII et aussi par la production du NO. L'étude de ce lien établi *via* les différentes molécules caractérisées nous aidera à éclaircir le contrôle de réponse neuro-inflammatoire et donc à mieux comprendre les mécanismes conduisant à une réparation efficace du SNC chez la sangsue médicinale.

Dialogue entre la microglie et les autres cellules du SNC :

1. Chez les vertébrés

- *Microglie et macrophages périvasculaires*

Les cellules périvasculaires, incluant notamment les péricytes et les macrophages périvasculaires, sont comprises totalement ou partiellement dans la lame basale des vaisseaux sanguins, contrairement à la microglie, extérieure à celle-ci. Leur phénotype est proche de celui des macrophages périphériques, à savoir CD11b+, CD11c+, CD45+, CMH cl. II+, FcR+ [Ford et al., 1995; Thomas, 1999]. Le rôle protecteur des cellules périvasculaires lors d'infection par des bactéries ou des champignons a pu être montré de même que leur importance pour le recrutement des cellules immunitaires périphériques [Aguirre and Miller, 2002; Polfliet et al., 2002; Polfliet et al., 2001; Silva et al., 2004]. Il pourrait par ailleurs exister une origine commune entre microglie et macrophages périvasculaires, ces derniers pouvant infiltrer le parenchyme nerveux en traversant la lame basale des vaisseaux sanguins et se différencier en microglie [Bechmann et al., 2001; Perry et al., 2010; Thomas, 1999].

- *Microglie et astrocytes*

Les astrocytes, originaires du neurectoderme, appartiennent à la macroglie et ont un rôle fondamental au sein du système nerveux central. Ils contribuent ainsi à la formation de la BHE et ont une fonction primordiale dans l'homéostasie du système nerveux central (sécrétion de facteurs neurotrophiques, régulation du pH, régulation des fonctions neuronales). A côté de ces fonctions de soutien, lors d'une perturbation du parenchyme nerveux, les astrocytes s'activent (phénomène appelé astrogliose) et contribuent à la protection puis à la réparation des tissus lésés, puisque leur élimination par la thymidine kinase aggrave les conséquences d'une blessure pratiquée dans le parenchyme cérébral ou la moelle épinière [Faulkner et al., 2004; Myer et al., 2006]. Les astrocytes peuvent par ailleurs secréter des cytokines telles que l'IL-1, l'IFN-γ, le GM-CSF ainsi que de nombreuses chimiokines. Ces cytokines ont notamment pour particularité de recruter et d'activer très efficacement les cellules microgliales, qui à leur tour vont entretenir l'activation astrocytaire par la sécrétion d'IL-6 [Falsig et al., 2006].

- *Microglie et macrophages périphériques*

Un certain nombre de maladies neurodégénératives sont caractérisées par l'infiltration au sein du parenchyme nerveux de cellules sanguines et notamment de monocytes se différenciant *in situ* en macrophages. A cause de la difficulté à distinguer microglie activée et macrophages, les fonctions respectives de ces deux types cellulaires dans le système nerveux central sont difficiles à déterminer. Peu d'informations sur la fonction respective microglie – macrophages ont été apportées. Cependant, dans un modèle de souris chimère reconstituée par une moelle osseuse de souris transgénique GFP, dans lesquelles les cellules sanguines sont GFP+ et les cellules microgliales restent GFP-, Schilling et ses collaborateurs [Schilling et al., 2003] ont montré que les cellules microgliales GFP- étaient les premières à être activées et les plus nombreuses suite à une ischémie cérébrale. L'activation de la microglie semble donc précéder l'infiltration des macrophages périphériques.

- *Microglie et neurones*

Les cellules microgliales établissent un lien étroit avec les neurones au sein du SNC. En effet, les neurones informent continuellement la microglie sur leur état. Dans les conditions normales, les neurones sains peuvent envoyer des messages de repos à la microglie à travers divers médiateurs comme la fractalkine ou encore les faibles doses d'ATP. Les cellules microgliales veillent ainsi à l'homéostasie du système nerveux et contribuent également à la survie neuronale en sécrétant des facteurs neurotrophiques. Les cellules microgliales sont rapidement activées par la moindre perturbation et répondent aux signaux de dangers envoyés par les neurones endommagés. La microglie sera donc recrutée au site de l'agression et contribue à une réparation efficace. Cependant, les effets neurotoxiques peuvent apparaître dès que les neurones envoient à la microglie un signal de danger irréversible. Une production du NO et d'autres facteurs néfastes aboutissent à la perte neuronale [Hanisch and Kettenmann, 2007]. Un recrutement des cellules microgliales au site de lésion est donc indispensable mais doit être efficacement contrôlé afin de préserver le patrimoine nerveux.

2. Chez la sangsue médicinale

La sangsue médicinale *H. medicinalis*, grâce à la simplicité de son système nerveux, s'est avérée être un modèle idéal quant à l'étude du comportement et du rôle de ces cellules microgliales dans la réponse immunitaire du SNC des invertébrés [Duan et al., 2005; McGlade-McCulloh et al., 1989; von Bernhardi and Muller, 1995]. De plus, on retrouve au sein du SNC de la sangsue médicinale deux cellules macrogliales au niveau de chacun des connectifs reliant les ganglions adjacents [Deitmer et al., 1999]. Des travaux ont montré que même si ces deux cellules gliales sont tuées sélectivement par une injection intracellulaire de protéase *in vivo*, la formation des synapses et la régénération axonale ont quand même lieu de façon normale dans le mois suivant la lésion. Cette observation souligne ainsi l'importance des cellules microgliales dans la réparation [Elliott and Muller, 1983].

Chez la sangsue, ni la division cellulaire de la microglie ni sa capacité de phagocytose n'a été mise en évidence à ce jour. Cependant, l'existence d'une population de cellules microgliales présentant, lors d'une lésion de la chaîne nerveuse, un comportement migratoire similaire ainsi qu'un changement de morphologie similaire à celui observé chez les vertébrés, nous a conduits à envisager la possible participation de molécules chimioattractantes dans ce processus. Nos résultats sont ainsi en accord avec cette hypothèse. A présent, trois molécules ayant une activité chimioattractante ont été mises en évidence au sein du système nerveux de la sangsue.

La molécule *Hm*C1q constitue un membre du groupe des molécules apparentées aux cytokines secrétées par les cellules du SNC de la sangsue et capables de recruter les cellules microgliales au site de lésion. Il est donc possible que diverses sous-populations microgliales existent et qu'elles n'aient pas la même affinité envers les différentes molécules caractérisées. De ce fait, les résultats de recrutement microglial dans les tests de chimiotactisme pourraient ne représenter que l'activité d'une sous population donnée. Ceci pourrait expliquer également l'inhibition totale ou partielle de la migration microgliale par l'utilisation respective des anticorps spécifiques de chacune de ces molécules.

Dans ce sens, il serait ainsi intéressant de pouvoir caractériser la sous-population spécifique de la protéine *Hm*C1q. Cette sous-population de cellules microgliales sera isolée par des tests de chimiotactisme puis mise en culture. Une fois au repos, la sous-population pourra être ensuite activée par la forme recombinante de *Hm*C1q. L'effet de cette protéine sur la microglie sera donc observé et les sécrétions pourront servir dans des tests de repousse neuronale. Pour cela, l'ensemble des molécules libérées définissant le sécrétome sera injecté au niveau d'un connectif lésé de la chaîne nerveuse de la sangsue et la repousse des axones endommagés sera suivie au cours du temps; ceci comparativement aux conditions contrôle où le sécrétome des cellules microgliales non activées par *Hm*C1q sera utilisé. De même, ce test de repousse axonale suite à une lésion pourrait être effectué en injectant directement *Hm*C1q parallèlement au contrôle en absence de cette protéine, par l'usage de l'anti-*Hm*C1q.

Par ailleurs, il sera important d'observer l'interaction entre *Hm*C1q et les différents effecteurs impliqués dans le recrutement de la microglie et pouvant ainsi intervenir dans la réparation nerveuse. Pour cela, il faut envisager d'évaluer l'impact de l'inhibition de ces facteurs sur l'activité chimioattractante de *Hm*C1q. En effet, l'anti-*Hm*IL-16, l'anti-*h*EMAPII, l'inhibiteur de la NO-synthase ou le chélateur du NO seront utilisés en présence de *Hm*C1q ou du sécrétome de la sous-population des cellules microgliales activées par cette protéine. La repousse axonale sera ensuite étudiée afin d'évaluer la complémentarité dans l'action de ces molécules.

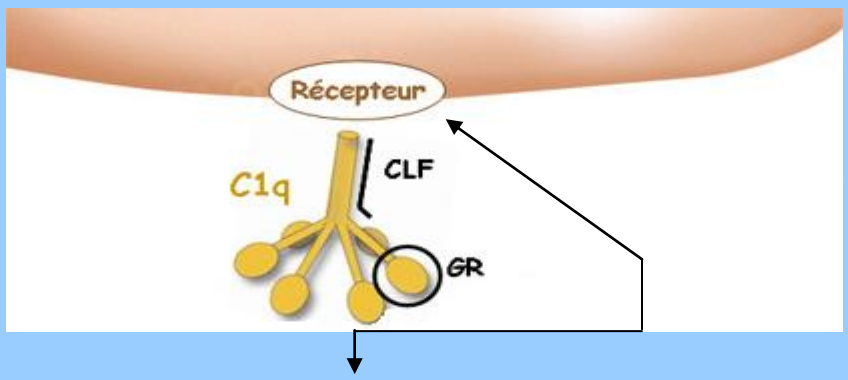
De plus, il nous semble évident que pour pouvoir comprendre le mécanisme d'action de ces molécules dans la réponse neuro-inflammatoire, il est indispensable d'élucider la chronologie des activités de ces protéines afin de mieux comprendre si leurs activités sont additives ou synergiques. Pour y parvenir, la caractérisation des sous-types microgliaux est cruciale. La caractérisation des récepteurs spécifiques, actuellement en cours, est essentielle afin de réussir à différencier sans ambiguïté chacune des sous-populations des cellules microgliales recrutées. L'activité de *Hm*C1q passe par un récepteur apparenté à gC1qR des vertébrés. L'étude du récepteur gC1qR qui reconnaît le domaine globulaire (gC1q), présent dans la banque EST de la sangsue médicinale, a été privilégiée.

Il ne faut néanmoins pas exclure l'existence d'autres récepteurs potentiels à la molécule *Hm*C1q (voir l'encadré numéro 4). Par ailleurs, l'activité de *Hm*IL-16 est très probablement dépendante d'un homologue du CD4 humain. Si l'activation de *Hm*EMAPII est plutôt dépendante d'un récepteur de type Toll (*Hm*TLR1), il reste à identifier le récepteur de *Hm*EMAPII et à savoir si les sous-populations microgliales sont exclusivement sensibles à *Hm*C1q, *Hm*IL-16 ou *Hm*EMAPII.

Encadré 4.

Principaux récepteurs reconnaissant le domaine collagénique de C1q.

C1q est un hexamère d'hétérotrimères qui comporte deux régions caractéristiques, une partie de type collagène (CLF, « collagenous-like fragment ») de laquelle émergent six régions globulaires (GR, « globular region »). Il a été mis en évidence de façon indirecte que ce sont ces GRs qui sont mises en jeu dans la reconnaissance spécifique des cellules apoptotiques, les surfaces des microorganismes et certaines structures réceptrices comme gC1qR. Les CLFs sont, elles, impliquées dans la reconnaissance de C1q à la surface des phagocytes [Paidassi et al., 2008]. Cette reconnaissance spécifique fait appel à différentes structures réceptrices au C1q.



Les récepteurs de C1q reconnaissant la partie collagénique sont:

• C1qRp est exprimé à la surface des cellules d'origine myéloïde, des plaquettes et des cellules endothéliales L'interaction entre ce récepteur et le C1q active la phagocytose de l'élément lié à C1q. Cet élément peut être une cellule apoptotique ou un microorganisme pathogène [Kishore and Reid, 2000].

• cC1qR est exprimé au niveau du réticulum endoplasmique (RE) et régule l'homéostasie de Ca^{2+} [Kishore and Reid, 2000]. Ce récepteur peut aussi s'exprimer à la surface, lier le C1q et contribuer au chimiotactisme des cellules dendritiques immatures [Vegh et al., 2006].

• CR1 est exprimé à la surface des globules rouges (GR), des monocytes, des polynucléaires neutrophiles (PNNs), des éosinophiles, des cellules NK, des lymphocytes B et T, des podocytes glomérulaires et aussi au niveau des cellules microgliales du SNC [Hanisch, 2002; Zipfel and Skerka, 2009]. Il régule l'activation du système du complément et assure l'élimination des complexes immuns une fois lié à C1q.

En résumé, il sera ainsi possible d'élucider plusieurs questions qui restent en suspend:

1. L'impact des autres molécules chimioattractantes sur l'activité de *Hm*C1q et donc l'interdépendance de ces molécules (effet additif ou synergique?).
2. La caractérisation des différentes sous-populations microgliales.
3. La chronologie des activités exercées par les différentes molécules caractérisées sur la microglie.
4. L'impact de la molécule *Hm*C1q sur la repousse axonale et donc sur la survie neuronale.

L'étude du système nerveux de la sangsue médicinale *in vitro* permet d'évaluer la cinétique ainsi que l'intensité du recrutement microglial en faisant abstraction de l'infiltration possible des cellules sanguines à l'intérieur de la chaîne nerveuse. Cette particularité représente un avantage significatif comparé à la complexité structurale mais aussi cellulaire de la réponse inflammatoire chez les mammifères. Cependant, une question devrait également être abordée concernant l'infiltration possible des cellules sanguines périphériques qui peuvent contribuer à la réaction inflammatoire comme observée chez les vertébrés [Bechmann et al., 2001; Perry et al., 2010

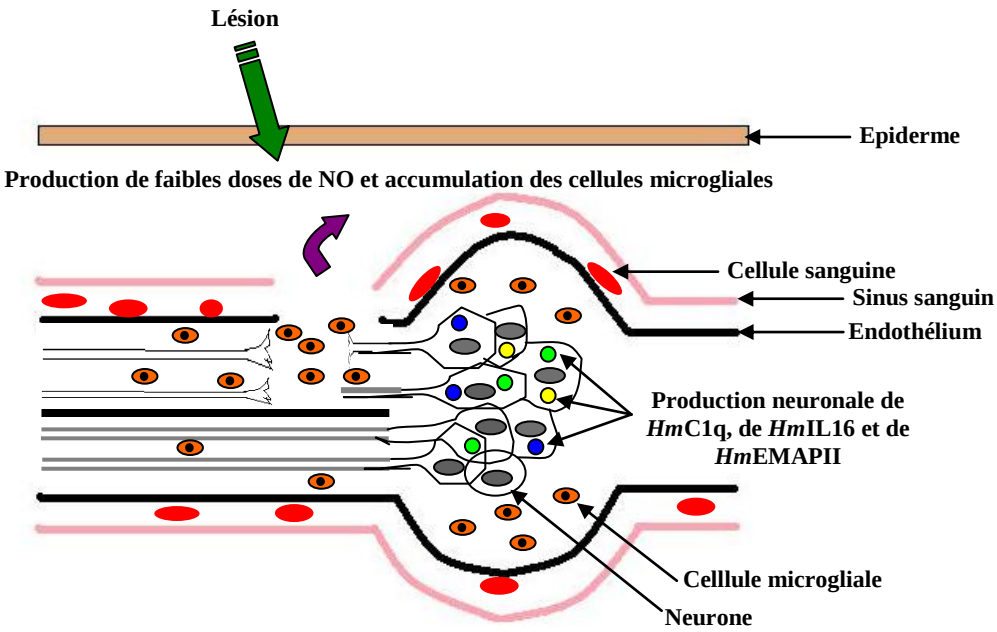
]. En effet, il est connu chez les vertébrés que les monocytes sanguins peuvent se différencier en cellules microgliales et participer à la réaction neuro-inflammatoire. Un tel recrutement doit être recherché chez la sangsue. Cette infiltration, bien que nécessaire pour la défense immunitaire, semble posséder également un côté délétère. La surdose de cytokines pro-inflammatoires secrétées par ces cellules infiltrantes contribue à la perte neuronale [Hanisch and Kettenmann, 2007]. Ceci peut être du à la surface d'échange entre le sang et le SNC qui est largement plus grande et complexe chez les vertébrés et donc offre plus d'espace pour les cellules infiltrantes pro-inflammatoires.

Ainsi, il semble indispensable de pouvoir élucider l'implication des cellules sanguines dans cette réponse neuro-inflammatoire. Dans ce but, une étude a été entreprise au sein du laboratoire pour caractériser les cellules sanguines et étudier leur interaction avec les cellules du SNC. Chez la sangsue *Hirudo medicinalis*, les cellules sanguines

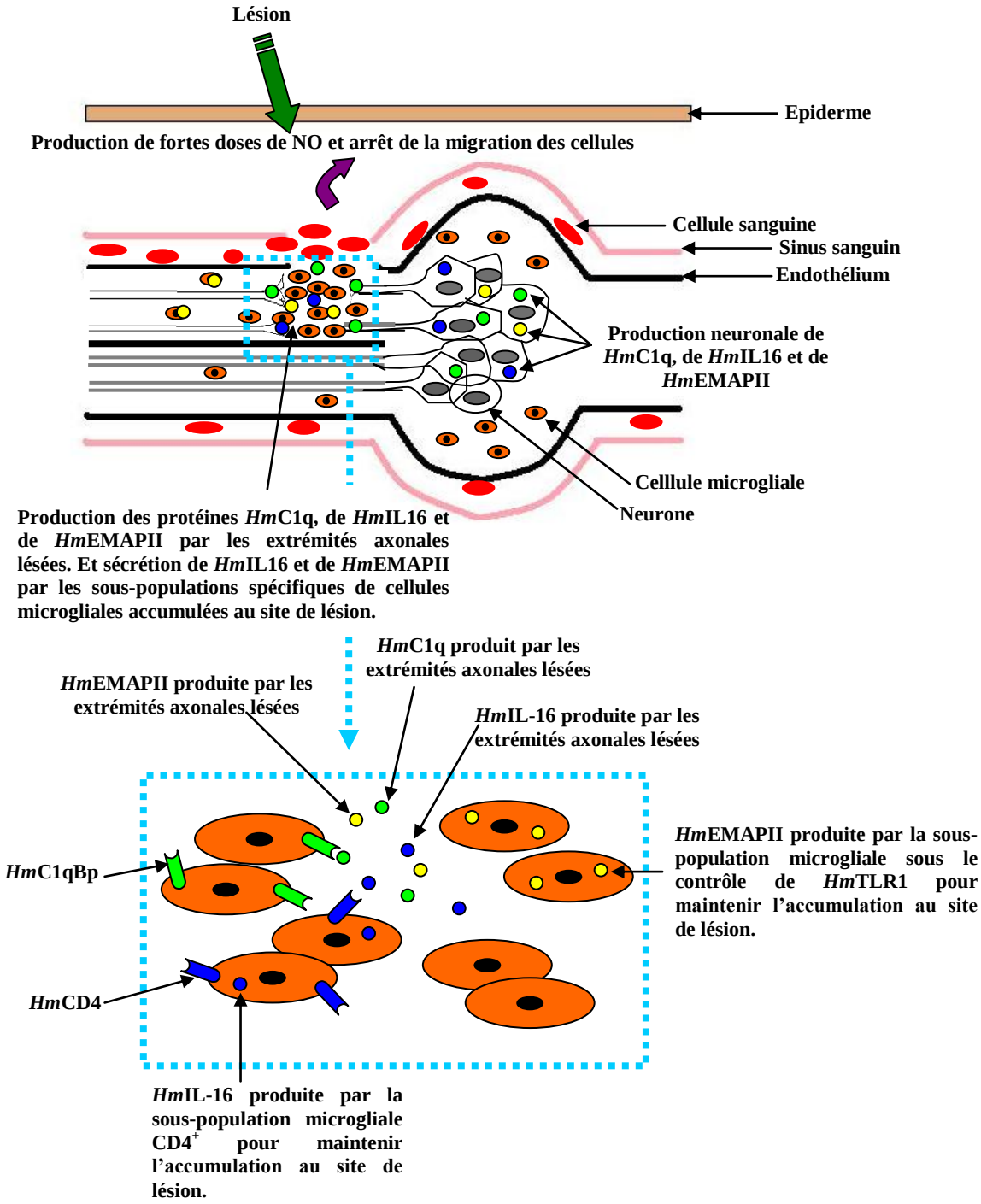
baignent dans un sinus sanguin séparé du SNC par une assise de cellules endothéliales constituant ainsi une pseudo- BHE protégeant le SNC de la sangsue médicinale. Malgré leur hétérogénéité de taille, elles appartiendraient à un seul et même type cellulaire. A l'heure actuelle, à la différence des vertébrés, il n'y a aucune évidence d'infiltration de cellules sanguines au niveau du système nerveux. *In vitro,* elles semblent participer au processus de cicatrisation du système nerveux. S'agit-il d'une simple cicatrisation tissulaire ou plutôt une réparation nerveuse efficace et fonctionnelle facilitée par le sang? Des expériences de mesure de potentiel d'action au niveau des neurones lésés devraient permettre de conclure sur la véritable fonction des cellules sanguines.

Conclusion - Perspectives

Tenant compte des données disponibles à ce jour, un modèle d'interprétation résumant les principales étapes de l'action de ces molécules en réponse à une lésion est schématisé ci-dessous:



1. La chaîne nerveuse de l'animal peut être endommagée suite à une blessure profonde. Les cellules microgliales, situées le long du connectif lésé, migreraient et s'accumuleraient au niveau du site de lésion. L'accumulation de ces cellules serait en partie due à la libération de faibles doses de NO. Les cytokines (*Hm*C1q, *Hm*IL16 et *Hm*EMAPII) sont déjà secrétées par les neurones et les cellules sanguines sont étroitement liées à la chaîne nerveuse.



2. Les extrémités axonales lésées produisent les différentes cytokines (*Hm*C1q, *Hm*IL16 et *Hm*EMAPII) augmentant ainsi le recrutement des différentes sous-populations des cellules microgliales au site de lésion. Chaque cytokine attire des cellules microgliales portant les structures réceptrices adéquates (*Hm*CD4 pour *Hm*IL-16,

*Hm*C1qBp pour *Hm*C1q). Par ailleurs, cette accumulation de la microglie est maintenue par la production de *Hm*IL16 et de *Hm*EMAPII par les cellules microgliales recrutées. La libération de fortes doses de NO constituerait le signal stop de la migration microgliale. La participation croisée de tous ces facteurs aboutirait à une réparation efficace du SNC de la sangsue médicinale.

Les résultats obtenus au cours de ce travail doivent ouvrir d'autres perspectives sur les mécanismes physiologiques de la réponse neuro-inflammatoire menant à la réparation nerveuse. La protéine *Hm*C1q exerce-elle d'autres fonctions que son activité de chimiotactisme, notamment des fonctions de facilitation de la phagocytose comme cela est observé pour le C1q des vertébrés? Serait-elle capable de lier les corps apoptotiques formés suite à la lésion et assurer leur élimination afin de promouvoir la réparation du tissu lésé?

L'étude de l'infiltration des cellules sanguines et leur implication dans la réponse neuro-inflammatoire reste encore à compléter.

L'ensemble de ce travail a permis de mieux comprendre la réponse neuro-inflammatoire mise en place au sein du SNC de la sangsue médicinale *Hirudo medicinalis*. Les données obtenues ont mis en évidence la première molécule apparentée à la protéine C1q (*Hm*C1q) agissant par le biais d'un récepteur homologue au gC1qR humain dans le SNC d'un invertébré, la sangsue médicinale. *Hm*C1q fait partie d'un ensemble de molécules caractérisées (*Hm*IL-16 et *Hm*EMAPII) dans le SNC et capables de recruter la microglie au site de lésion, phénomène reconnu comme indispensable à la réparation nerveuse de notre modèle.

Publication n°5

A homologous form of human interleukin 16 is implicated in microglia recruitment following nervous system injury in leech *Hirudo medicinalis*.

Acceptée pour publication dans Glia
le 17 mai 2010

GLIA 00:000–000 (2010)

A Homologous form of Human Interleukin 16 is Implicated in Microglia Recruitment Following Nervous System Injury in Leech *Hirudo medicinalis*

AQ1 FRANÇOISE CROQ,[1] JACOPO VIZIOLI,[1] MARINA TUZOVA,[2] MURIEL TAHTOUH,[1] PIERRE-ERIC SAUTIERE,[1] CHRISTELLE VAN CAMP,[1] MICHEL SALZET,[1] WILLIAM W. CRUIKSHANK,[2] JOEL PESTEL,[1] AND CHRISTOPHE LEFEBVRE[1]*

AQ2 [1]*Centre National de la Recherche Scientifique, Laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides, Université Lille Nord de France, Université Lille 1, FRE 3249, IFR 147, F59655, Villeneuve d'Ascq, France*

[2]*Pulmonary Center, Boston University School of Medicine, Boston, Massachusetts*

KEY WORDS
nerve cord repair; microglial cells; chemotaxis; invertebrate cytokine

ABSTRACT
In contrast to mammals, the medicinal leech *Hirudo medicinalis* can completely repair its central nervous system (CNS) after injury. This invertebrate model offers unique opportunities to study the molecular and cellular basis of the CNS repair processes. When the leech CNS is injured, microglial cells migrate and accumulate at the site of lesion, a phenomenon known to be essential for the usual sprouting of injured axons. In the present study, we demonstrate that a new molecule, designated *Hm*IL-16, having functional homologies with human interleukin-16 (IL-16), has chemotactic activity on leech microglial cells as observed using a gradient of human IL-16. Preincubation of microglial cells either with an antihuman IL-16 antibody or with anti-*Hm*IL-16 antibody significantly reduced microglia migration induced by leech-conditioned medium. Functional homology was demonstrated further by the ability of *Hm*IL-16 to promote human CD4+ T cell migration which was inhibited by antibody against human IL-16, an IL-16 antagonist peptide or soluble CD4. Immunohistochemistry of leech CNS indicates that *Hm*IL-16 protein present in the neurons is rapidly transported and stored along the axonal processes to promote the recruitment of microglial cells to the injured axons. To our knowledge, this is the first identification of a functional interleukin-16 homologue in invertebrate CNS. The ability of *Hm*IL-16 to recruit microglial cells to sites of CNS injury suggests a role for *Hm*IL-16 in the crosstalk between neurons and microglia in the leech CNS repair. ©2010 Wiley-Liss, Inc.

INTRODUCTION

In contrast to the mammalian CNS, which has a limited capacity for repair after damage, the medicinal leech can completely restore normal functions of its CNS after injury. In mammals, microglial cells are regulators of tissue homeostasis and are involved in pathological processes orchestrating tissue remodeling. In vertebrates, microglia are currently considered to also function as sensors in the brain (Kreutzberg, 1996). Under neuropathological conditions, microglia are activated and migrate to and within the lesions. Activated microglia are characterized by a morphological transition from a quiescent stellate form to a macrophage-like phenotype. Microglial cells were first designated "microglia" in the leech CNS (del Rio-Hortega, 1932). Indeed, leech microglia behave similarly to vertebrate microglia by migrating in response to tissue damage, by changing their morphology (Elliott and Muller, 1981; Masuda-Nakagawa et al., 1990) and by their potential phagocytic properties (Perry and Gordon, 1988). When the leech nerve cord is injured, microglia migrate toward the lesion and accumulate at the damage site (Chen et al., 2000; Kumar et al., 2001; Masuda-Nakagawa et al., 1990; von Bernhardi and Muller, 1995) This cell migration was shown to be an essential step for the axon sprouting required for an efficient regeneration (Ngu et al., 2007). Thus, to characterize soluble factors involved in microglia recruitment, we investigated the chemoattractant effect of culture medium generated by injured leech CNS.

Using this approach, we identified a chemoattractant factor that had significant homology with the mature form of human IL-16. This factor was designated *Hm*IL-16 (Genbank Accession EU629212). Human interleukin-16 is a proinflammatory chemoattractant cytokine originally termed lymphocyte chemoattractant factor (LCF; Center and Cruikshank, 1982; Cruikshank and Center, 1982). IL-16 is produced by numerous cell types including lymphocytes and microglia (Center et al., 2000). The mature (secreted) bioactive form of IL-16 corresponds to a C-terminal peptide which is generated following caspase-3 cleavage (Zhang et al., 2001). Mature human IL-16 is a ligand for CD4 and has been demonstrated to induce a migratory response in a variety of CD4+ cell

Joel Pestel and Christophe Lefèbvre contributed equally to this work.

Grant sponsor: NIH; Grant number: AI35680; Grant sponsors: Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (France), Hirudinae Genomic Consortium.

*Correspondence to: Christophe Lefèbvre, Université Lille 1, Cité Scientifique, SN3, 59655, Villeneuve d'Ascq cedex, France. E-mail: christophe.lefebvre@univ-lille1.fr

Received 5 March 2010; Accepted 17 May 2010

DOI 10.1002/glia.21036

Published online 00 Month 2010 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

©2010 Wiley-Liss, Inc.

types, such as T and B lymphocytes, monocyte/macrophages, dendritic cells, as well as to induce migration in mammalian CD4+ cells. In human brain, IL-16 is constitutively expressed by a microglia subpopulation and may attract CD4+ lymphocytes across the blood-brain barrier (BBB) under pathological conditions (Schluesener et al., 1996). A paracrine role of IL-16 was also demonstrated in inflammation following cerebral ischemia (Schwab et al., 2001a). IL-16 may be implicated in some neurodegenerative diseases such as multiple sclerosis (MS) lesions where enhancement of IL-16 production suggests a role in regulation of inflammation in axonal damages (Mittelbronn et al., 2001; Schwab et al., 2001a,b; Skundric et al., 2006).

In the present study, we demonstrate the chemotactic activity of *Hm*IL-16 contained in CNS-conditioned medium for leech microglia and further, provide evidence that the neuronal cells are the cell source. Interestingly, we showed that leech IL-16 (*Hm*IL-16) is functionally homologous to human IL-16 and is able to induce CD4+ T cells to migrate *in vitro*. Some data suggest that *Hm*IL-16 could bind to human CD4. To our knowledge, this is the first report of such a cytokine with an associated biological function in protostomes. Consequently, the present study highlights a new cytokine in invertebrates that is highly evolutionarily and functionally conserved in CNS and suggest a role for *Hm*IL-16 in the crosstalk between neurons and microglia in the leech CNS repair.

MATERIALS AND METHODS

Central Nervous System Preparation

Hirudo medicinalis adult leeches were obtained from Ricarimpex (Eysines, France). After anesthesia in 10% ethanol at 4°C for 15 min, animal CNS (nerve cords) were dissected out into a sterile Ringer solution (115 mM NaCl, 1.8 mM $CaCl_2$, 4 mM KCl, 10 mM Tris maleate, pH 7.4) under a laminar flow hood. After isolation, nerve cords were placed in three successive baths of antibiotics (100 UI mL^{-1} penicillin, 100 µg mL^{-1} streptomycin, and 100 µg mL^{-1} gentamycin) for 15 min and further incubated in Leibovitz L-15 medium (Gibco, Invitrogen, USA) complemented with 2 mM L-glutamin, 0.6% glucose and 10 mM Hepes (complete medium).

Study of Microglial Cell Morphology After Injury: Immunocytochemistry of CNS with Gliarin

The leech CNS consists of head and tail ganglia and 21 segmental ganglia. Each segmental ganglion contains about 400 neurons and is linked to its neighbors by thousands of axons that form the connectives. The entire central nervous system of the leech lies in a blood-filled sinus but no blood vessels penetrate the ganglia or connectives. Of interest, all experimental procedures were performed from sinus-free CNS, which excludes any possible involvement of blood cells. In the adult CNS, microglial cells are only resident circulating cells evenly distributed in leech ganglia and in the bundle of axons (ganglia) that connect to them. Of note, the CNS does contain neither astrocytes nor oligodendrocytes. To study the microglia morphology in normal conditions and after nerve crush directly in the connectives, an antibody against a glial-specific intermediate filament protein, gliarin, was used (a kind gift from Dr. Johansen, Iowa State University, USA) to whole mount preparations (Xu et al., 1999). Gliarin is an intermediate filament protein specifically expressed in glial cells of the leech nervous system. Nerve cords were dissected and fixed as described above. The connective capsules were opened with fine forceps for better antibody penetration. Fixed samples were washed in PBS, permeabilized by a 24-h incubation in PBS containing 1% Triton X100 at room temperature and preincubated in blocking solution [BS; 1% Triton, 3% Normal Donkey Serum (NDS) and 1% Ovalbumin in PBS] for 8 h at room temperature. Samples were then incubated with mouse monoclonal antigliarin antibody (1:2,500) diluted in the AB solution (PBS containing 1% BSA, 0.05% Triton, 1% NDS and 1% ovalbumin) overnight at 4°C. After three washes with PBS, goat anti-mouse IgG antibody (Invitrogen, USA) conjugated to Alexa Fluor 488 was added (1:5,000 in the AB solution). Negative controls consisted of samples incubated with the preimmune serum. Samples were observed with a Zeiss LSM 510 Laser Scanning Confocal Microscope.

Transmission and Scanning Electron Microscopy (TEM and SEM)

Nerve cords were fixed in glutaraldehyde 2.5% in 0.1M phosphate buffer, pH 7.4 for one night. For TEM, the sample nerve cords were postfixed in 1% osmium tetroxide in the same phosphate buffer. Nerve cords were dehydrated through an ascending series of ethanol exposure. For SEM, ganglia were then dried using hexamethyldisilazane using the protocol described by Bray et al. (1993) and metalized by gold sputtering using Balzers union SCD 040 before observation using a Jeol CX 100 electron microscope coupled to ASID-4D (Bray et al., 1993). For TEM, ganglia were embedded in Epon in the conventional manner (polymerization at 60°C for 48 h). Ultrathin sections with gold to silver interference colors (80–90 nm) were cut from the Epon blocks, placed on 200-mesh copper grids, routinely counterstained with uranyl acetate and lead citrate, and observed using a Jeol CX 100 electron microscope.

Microglial Cell Preparation

Nerve cords were placed in 35-mm Petri dishes with 200 µL of complete L-15 medium. Each ganglion was carefully decapsulated by removing the collagen layer surrounding the nerve cord with microscissors. Nerve cells, neurons (10–70 µm) and microglial cells (5 µm),

were mechanically resuspended by gentle scraping and filtered through a 7-μm nylon mesh. The microglial cell population was then specifically collected and centrifuged at 1,000*g* for 10 min at room temperature (RT). The cell pellet was resuspended in complete medium (100 μL per nerve cord) for migration assays.

Leech CNS-Conditioned Medium (CM) Preparation

Eight nerve cords which have been crushed or cut were cultured during a 24-h period as described above. The medium (500 μL) was then centrifuged 20 min at 1,000*g* to eliminate cells and tissues. The cell-free supernatant was then used as conditioned medium (CM) for western blot and chemotaxis experiments.

Molecular Characterization

Hirudo medicinalis nervous system EST databases were granted by Hirudinea Consortium (http://www.cns.fr/externe/English/Projets/Projet_PE/PE.html). Sequence analyses used the BLAST programs (Altschul et al., 1997; Karlin and Altschul, 1990).

Fluorescent *In Situ* Hybridization

Nerve cords were fixed for an hour at 4°C in buffered 4% paraformaldehyde, pH 7.4 directly after dissection or 24 h after incubation in complete L15 medium. The 5′ biotin-labeled specific antisense probe and sense probe (negative control) were generated from a linearized cDNA plasmid by *in vitro* transcription using Biotin RNA-labeling-Kit according to the manufacturer's instructions (Roche, Switzerland). The hybridization protocol was conducted as previously described (Nardelli-Haefliger and Shankland, 1992). Nerve cords were incubated in secondary antisheep antibody conjugated to Alexa Fluor 488 (Invitrogen, USA) diluted 1:5,000 in water, rinsed with PBS, and finally mounted with glycergel (Sigma Life Science, USA). Samples were kept at 4°C in the dark until observed with an inverted microscope (Leica DMIRE2).

Western Blotting

Ten nerve cords were dissected and both RNA and proteins were extracted using the TRIzol Reagent (Invitrogen, manufacturer's protocol). SDS-PAGE was conducted with a 12% acrylamide with Tris 150 g/HCL 0.6N running gel and a 4% acrylamide with Tris 150 g/HCL 0.8N stacking gel (Tastet et al., 2003). Migration was performed using a cathode buffer (0.6% Tris base, 2.5% Taurine, and 0.1% SDS) and an anode buffer (0.6% Tris base, 2.8% Glycine, and 0.1% SDS). Twenty microliters of the nervous system protein extract were added to the Laemmli buffer (Tris 120 g/HCl 0.8N, glycerol 50%, SDS 10% and DTT 7.7%). Gels ran at 70 V for 15 min and at 120 V for 45 min. Nerve cord extracts were loaded on SDS-PAGE gel prepared as previously described. Separated proteins were transferred to Hybond^{TM}-C Extra membrane (GE Healthcare Life Sciences, Amersham, USA) by electroblotting. The nitrocellulose membrane was preincubated in blocking solution, washed three times in PBS containing 0.05% Tween 20 and further incubated overnight at 4°C with the specific rabbit polyclonal anti-*Hm*IL-16 antibody (1:1,000). The anti-*Hm*IL-16 rabbit polyclonal antibody (Ab) was raised against a synthetic peptide corresponding to Ile^{48} - Ile^{63} amino acid sequence (Agro-Bio, France). After three washes in PBS containing 0.05% Tween20, a goat anti-rabbit IgG antibody conjugated with horseradish peroxidase (dilution 1:2,000) (Jackson Immunoresearch, USA) was added for 1 h at room temperature. After the final wash, bands were revealed using an ECL Kit (GE Healthcare Life Sciences, Amersham, USA) on Kodak® X-Omat LS film (Sigma-Aldrich, USA).

Immunohistochemistry

Nerve cords were dissected and fixed as described above. Fixed samples were washed in PBS, permeabilized by a 24-h incubation in PBS containing 1% Triton X100 at room temperature and then incubated in blocking solution [BS; 1% Triton, 3% Normal Donkey Serum (NDS) and 1% Ovalbumin in PBS] for 8 h at room temperature. Samples were then incubated with anti-*Hm*IL-16 rabbit antibody (1:2,500) diluted in the AB solution (PBS containing 1% BSA, 0.05% Triton, 1% NDS and 1% ovalbumin) overnight at 4°C. After three washes with PBS, donkey anti-rabbit IgG antibody (Invitrogen, USA) conjugated to Alexa Fluor 488 was added (1:5,000 in the AB solution). Secondary antibody incubation, sample mounting and confocal microscopy were performed. Negative controls consisted of samples incubated with the preimmune serum. In some experiments, the specificity of the anti-*Hm*IL-16 antibody was controlled by the addition of the synthetic peptide at 1.6 μg mL^{-1} to samples incubated with anti-*Hm*IL-16 rabbit antibody diluted in the AB solution. Samples were then observed with a Zeiss LSM 510 Laser Scanning Confocal Microscope.

Chemotaxis Assay for Leech Microglial Cells

Because of the nonadherence nature of the cells, chemotaxis assays were conducted using the double-P assay, as described by Köhidai, with minor modifications (Köhidai, 1995). Thirty-five millimeters Petri dishes were filled with 1 mL of a 0.5% agar and 1% gelatin solution. After drying, two 6-mm diameter wells were generated, each one presenting a parallel individual channel. One well was filled with 50 μL of L-15 containing purified microglial cells (10,000 cells) and the other well with different concentrations of the human IL-16 (0, 0.2, 1, and 50 μg mL^{-1}) or cell-free conditioned medium (1, 1:2, 1:4, 0). Another channel was generated that was

perpendicularly to others using a coverslip. One hour later, the number of cells present in the chemoattractant containing well was determined. To assess specificity for *Hm*IL-16 and to correlate bioactivity with that of human IL-16, neutralizing experiments were conducted by preincubating microglial cells for 30 min at room temperature with either mouse monoclonal antihuman recombinant IL-16 (1:1,000) or with specific rabbit anti-*Hm*IL-16 antibody (1:2,500) before using conditioned medium as chemoattractant. Rabbit preimmune serum (dilution 1:2,500) was used as a negative control. The number of migrating cells was counted on a hemocytometer (three different counts for each condition) with a Zeiss axioscope microscope. Experiments were performed in triplicate. In the negative control condition, 10,000 microglial cells were loaded and only 2% (~200 cells) were finally counted in the other side (L-15 medium-containing well), representing baseline, or control migration. To compare this L-15 control with stimulated migration, the results are expressed as 100% of control migration in all chemotaxis assays. Comparisons between means were made using Student's *t*-test. Statistical differences were considered to be significant if P was <0.01.

Human Lymphocyte Isolation

Following informed consent, human primary peripheral blood mononuclear cells were isolated from healthy volunteers. The blood was collected in accordance with the guidelines established by the Boston University School of Medicine Institutional Review Board. Briefly, blood was collected in the presence of 100 U of heparin-sodium (American Pharmaceutical Partners) per mL of blood. Peripheral blood mononuclear cells were isolated by Ficoll-Hypaque centrifugation and suspended in complete M199 medium (Mediatech), consisting of M199 supplemented with 0.4% bovine serum albumin (USB Corp.), 240 U of penicillin and 240 μg of streptomycin (Gibco), and 20 mM HEPES (Gibco). T cells were negatively enriched using nylon wool (Polysciences) adherence, resulting in nylon wool nonadherent T cells. Purity, as assessed by fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis, consistently demonstrated >93% $CD3^+$ cells, of which on average 64% were $CD4^+$ and 30% were $CD8^+$. The cells were routinely incubated overnight in complete M199 medium before use in the chemotaxis assay or subset generation. Purification of T cells into $CD4^+$ and $CD8^+$ subsets was accomplished using a magnetic bead negative isolation technique (Dynal/Invitrogen). Resulting purity was assessed using FACS analysis and was routinely demonstrated at >95% for both $CD4^+$ and $CD8^+$ subsets. Following subset generation the cells were again incubated overnight prior to the chemotaxis assay.

Chemotaxis Assay on Human T Cells

Cell migration was measured using a 48-well Boyden Chamber (Neuro Probe). For the migration assay, various concentrations of recombinant human (Fitzgerald, Concord, MA) or leech IL-16 were added to the bottom chamber at the designated concentrations. Fifty-five microliters of a suspension of 10^7 cells per mL was added to the top chamber and allowed to migrate through 8-μm-pore-size cellulose nitrate filters for 1 h. Filters were removed, fixed with ethanol, and stained with hematoxylin (Sigma). Migration was calculated as the number of cells that had migrated beyond 50 μm into the filter. For the neutralization studies, the IL-16 preparations were incubated with either monoclonal antihuman recombinant IL-16 (0, 0.5, 1, and 5 μg mL^{-1}) or polyclonal anti-*Hm*IL-16 (0, 1:1,000, 1:500, and 1:250 dilutions) for 30 min prior to adding the cells. To assess specificity for IL-16, either anti-IL-16 antibody (1 μg), an IL-16 antagonist peptide (5 μg) or soluble CD4 (5 μg) were added to the cells before addition of the leech conditioned medium. The peptide sequence was RRKSLQSKETTAAGDS corresponding to amino acids Arg ^{106} to Ser ^{121} and has been reported to block IL-16 bioactivity compared with a negative control which corresponds to a scrambled peptide containing the same residues in a randomly chosen sequence (Nicoll et al., 1999). An unrelated IgG2a was used as a supplementary negative control for neutralization. The cell counts from experimental conditions were compared with the migration from unstimulated (media alone, control) cell migration, which is expressed as 100%. In the typical migration assay for these studies, 10 to 15 cells per high-powered field are counted under control conditions. Ten high-powered fields are counted for each control and experimental condition, and the data are then expressed as a percentage of control cell migration.

Effect of Anti- HmIL-16 on the Accumulation of Microglia at a CNS Lesion

Segmental ganglia 2, 3, 4, and 5 were carefully dissected from the animal and pinned in separate plastic 35-mm Petri dishes (Falcon 3005 Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) coated with silicone rubber (Sylgard 184; Dow Corning Midland, USA) and placed in L-15 complete medium. Injections of either specific anti-*Hm*IL-16 rabbit polyclonal antibody (1:2,500), preimmune serum (1:2,500) or PBS were done in the connective between ganglia 3 and 4, which were tied up with a loop of fine nylon thread to confine the effect of the injected solutions to this region. For injections, patch pipettes were pulled from borosilicate glass capillaries (outer diameter 1.5 mm, Clark GC 150F-10) using a two-stage horizontal micropipette puller (model P-97, Sutter instrument, USA) (pipette resistance 3–5 MΩ). One of the connectives was immediately cut or crushed with fine forceps on both side of the injection site and the tissues were fixed 4 h after injection as described above. Microglial cell nuclei were stained with Hoechst 33342 fluorescent dye (1:1,000) for 10 min to observe accumulation of cells.

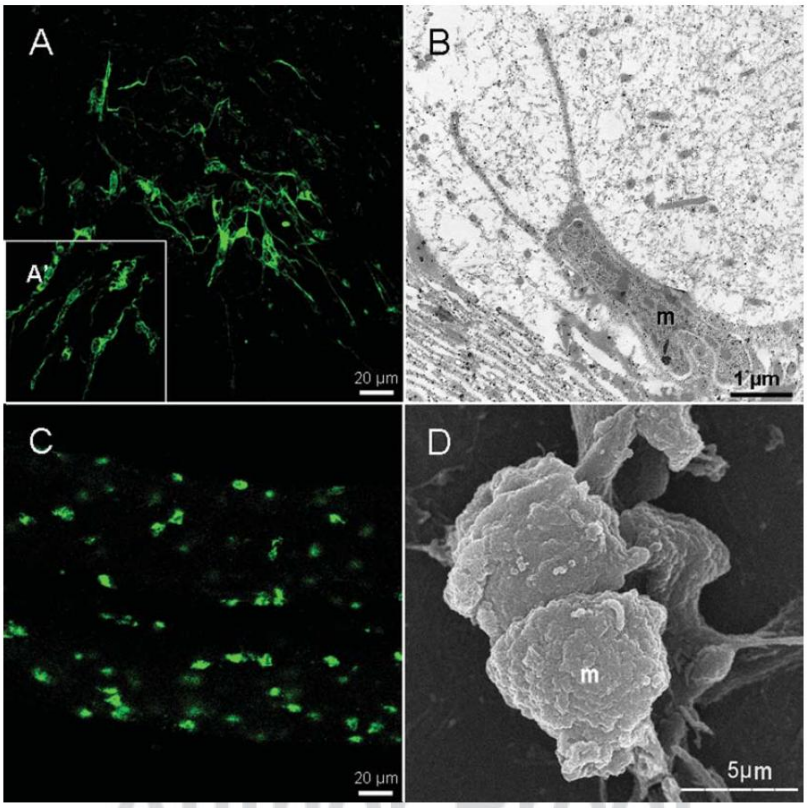


Fig. 1. Transformation of resting microglia (m) into activated cells after injury in a ganglion and in a connective. (**A**, **C**) Immunohistochemical staining using anti-gliarin antibody of quiescent stellate form of microglial cells in connectives (A) or in ganglia (**A′**) and activated microglial cells (C) with rounded shape after injury of a connective. (**B**) Transmission electron microscopy of an elongated microglial cell (m) with thin pseudopods in a ganglion. (**D**) Scanning electron microscopy of 24 h activated microglial cells (arrows) at the cut end of a connective. Typically, within hours after the lesion of a ganglion, some microglial cells have emerged from cut nerve roots and appeared as rounded cells.

Author Proof

RESULTS

Changes in Microglial Cells Morphology After Injury

Immunohistochemical and ultrastructural techniques were used to study the transformation of resting microglia into activated cells after injury in a connective. For immunohistochemical studies to whole mount nerve cords, we used the monoclonal antibody antigliarin. Gliarin is an intermediate filament protein specifically expressed in glial cells of leech nervous system (Xu et al., 1999). By confocal microscopy, microglial cells stained with the antigliarin antibody appeared in the connective (Fig. 1A), as well as in ganglia (Fig. 1A′) as ramified spindle-shaped cells. TEM of a noninjured ganglion showed an elongated microglial cell with thin pseudopods (Fig. 1B) located in a packet of neurons between processes of a glial cell. The microglial nucleus appeared elongated and large compared with the entire cell. Twenty-four hours after injury, changes in morphology occurred in the connective, as demonstrated by staining with antigliarin antibody, indicating retracted, rounded, activated microglial cells that had been recruited to the lesion within the connective (Fig. 1C). As shown in Fig. 1D, several microglial cells with a rounded shape can be observed by SEM at the cut end of a connective. These morphological changes underline the key-observation indicating that, when the leech central nervous system (CNS) is injured, microglial cells migrate to the site of the lesion (Morgese et al., 1983).

Molecular Characterization

Interestingly, leech CNS-conditioned medium induces a significant dose-dependent migratory response of

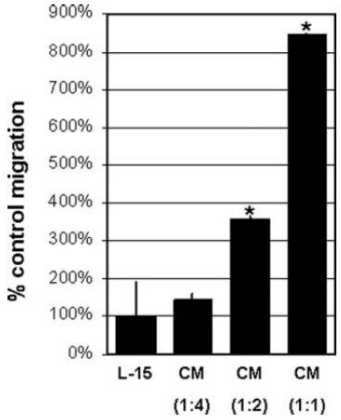


Fig. 2. Chemotactic effect of CNS-conditioned medium (CM) on leech microglia. CM obtained after the nerve cords incubation in L-15 medium for 24 h was used pure (1:1) or diluted (1:2, 1:4) and compared with the L-15 alone. Chemotaxis results were realized from three independent experiments and the cell counts from experimental conditions were compared with the migration from unstimulated (L-15, control) cell migration, which is expressed as 100%. Asterisks denote that CM-induced cell migration values were significantly different ($P < 0.01$) from the control sample.

microglial cells in defined chemotaxis assay (see Fig. 2). The observed chemoattractant activity suggests that nerve cells could release some chemotactic factors, which might trigger the microglia accumulation. To investigate which chemoattractant factors might be responsible for microglia migration, we first screened our leech CNS cDNA library for transcripts with homology to mRNA transcripts coding for known chemotactic factors. Using this approach a homologous transcript to vertebrate interleukin-16 (IL-16) was identified. The mRNA sequence extracted from the leech CNS databases is composed of 784 nucleotides coding for a 115 amino acid protein containing a PDZ domain at the C-terminus end (Fig. 3A). BLAST-P analyses demonstrated a significant homology of this partial amino acid sequence to the secreted form of vertebrate IL-16 (65% homologous with mouse and rainbow trout, 64% with pufferfish, 62% with human and 58% with chicken) as well as other putative invertebrate IL-16-related sequences (67% with purple urchin, 65% with mosquito, 64% with wasp, 60% with pea aphid and 58% with honey bee) (Fig. 3B). The Genbank accession numbers are detailed in Fig. 3B. To date, invertebrate sequences were annotated from automated computational analyses without any associated functions (Fig. 3B). Using the Multalin program (Corpet, 1988), sequence alignment with vertebrate IL-16 (mature form)

A

C

B

Protein ID	Common name (*scientific name*)	Homology	Studies
ref|XP_784502.2| similar to interleukin-16 precursor	Purple urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*)	67%	automated computational analysis (genome or EST)
ref|XP_317940.4| AGAP011384-PA	African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*)	65%	automated computational analysis (genome or EST)
emb|CAD70074.2| interleukin-16	Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)	65%	automated computational analysis (genome or EST)
gb|AAC04383.1| interleukin-16 precursor	House mouse (*Mus musculus*)	65%	functional analysis
ref|XP_001606112.1| similar to prIL-16	Jewel wasp (*Nasonia vitripennis*)	64%	automated computational analysis (genome or EST)
gb|AAX36076.3| interleukin 16	Pufferfish (*Tetraodon nigroviridis*)	64%	phylogenic analysis
gb|AAB36371.2| prIL-16	Human (*Homo sapiens*)	62%	functional analysis
XP_001951758 similar to IL-16, partial mRNA	Pea aphid (*Acyrthosiphon pisum*)	60%	automated computational analysis (genome or EST)
ref|XP_001121687.1| similar to interleukin 16 precursor	Honey bee (*Apis mellifera*)	58%	automated computational analysis (genome or EST)
gb|AAO18640.1| interleukin 16	Chicken (*Gallus gallus*)	58%	automated computational analysis (genome or EST)

Fig. 3. Molecular characterization of *Hm*IL-16 molecule in leech nerve cord. (**A**) *Hm*IL-16 partial sequence contains the C-terminal end of the protein (115 residues). The region highlighted in grey represents the C-terminal PDZ domain. The GVGF motif and W residue, essential for the particular conformation of known IL-16, are indicated in frames (**A**, **C**). (**B**) BLAST-P analyses showing homologies with sequences corresponding to putative sequence or characterized IL-16. The state of studies is detailed in the table according to the literature. (**C**) Dark and light grey residues, respectively, denote the high and medium rate of sequence identity between different IL-16 active forms. Arg^{107} residue in human IL-16 which is critical for chemoattractant activity is highlighted in black on the alignment.

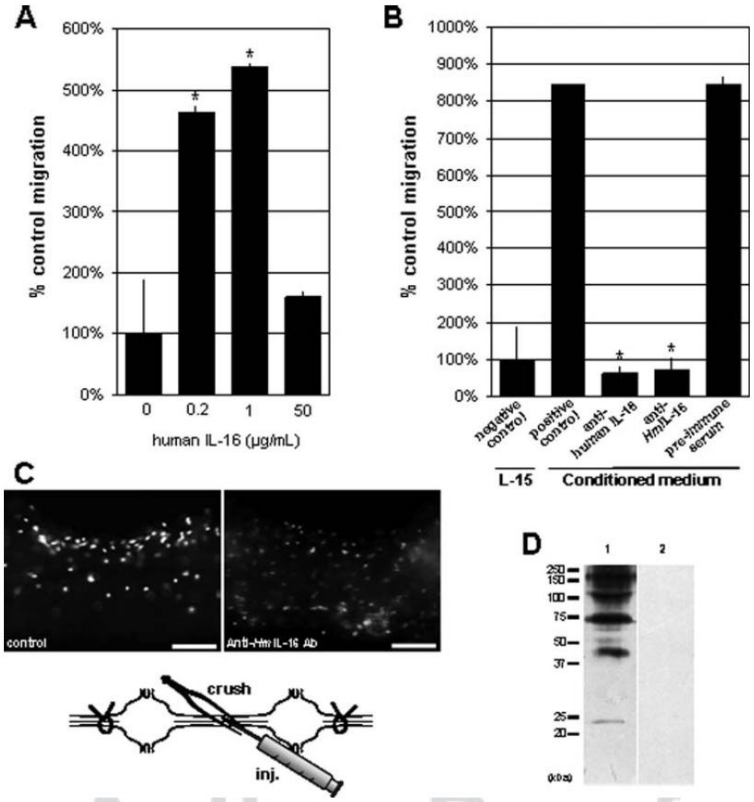


Fig. 4. Chemotactic effect of IL-16 on leech microglia. (**A**) Microglial cells were tested against human IL-16 gradient (0, 0.2, 1, and 50 µg mL^{-1}) to study the chemotactic property and determine the optimal concentration of human IL-16 in chemotaxis assays. (**B**) Conditioned medium from leech nerve cords was used as chemoattractant for leech microglia. A negative control was performed with L-15 medium. By using leech CNS conditioned medium, cells were pre-incubated with: L-15 medium alone (positive control); with mouse monoclonal anti-human IL-16 antibody; with rabbit polyclonal anti-*Hm*IL-16 antibodies and with its pre-immune serum as negative control. Chemotaxis results were realized from three independent experiments. Cell counts from experimental conditions were compared with the migration from unstimulated (L-15, control) cell migration, which is expressed as 100%. Asterisks denote that cell migration of the indicated sample was significantly different ($P < 0.01$) from the conditioned medium alone. (**C**) Visualization of Hœchst 33342-labeled microglia accumulation following experimental injury. As shown in the diagram, simultaneously to the lesion, connectives were injected with rabbit polyclonal anti-*Hm*IL-16 Ab or with pre-immune serum (control). The images show in the crush area the altered microglia accumulation with anti-*Hm*IL-16 perfusion compared with a normal migration with the control perfusion at the lesion site 4 h after experimental crush. Scale bars correspond to 100 µm. (**D**) Western blot analyses were performed from CNS protein extracts (Lanes 1 and 2) by using the rabbit polyclonal anti-*Hm*IL-16 Ab (Lane 1) and preimmune serum as negative control (Lane 2).

Author Proof

showed the conservation of essential residues in the PDZ (postsynaptic density/disc large/zona includens-1) domain contained within the C-terminus (Fig. 3C). Of interest, similar to fish IL-16, leech IL-16 contains a GVGF motif instead of the GLGF tetrapeptide identified in mammals (Wen et al., 2006). The tryptophan residue, which is represented in frame, is known to be essential to the specific conformation of active IL-16, which allows for the interaction with the tetrapeptide. Presence of the tryptophan in leech IL-16 therefore represents conformational homology with vertebrate IL-16. In addition, *Hm*IL-16 also contains a RRK sequence in the C-terminal end (Arg^{112}-Lys^{114}) consistent with human IL-16. This amino acid sequence has been shown to be critical for human IL-16 bioactivity (Nicoll et al., 1999) and suggests the potential for functional cross-reactivity.

Human IL-16 Exerts a Chemotactic Effect on Microglia

As *Hm*IL-16 presents homologies with human IL-16, the chemotactic activity of human IL-16 on leech microglial cells was assessed. Three dilutions (0.2, 1, 50 µg mL^{-1}) were used in the chemotaxis experiments (Fig. 4A). Microglial cell migration was stimulated in a dose-

dependant manner, which peaked at 1 μg mL^{-1} and demonstrated high dose inhibition (a characteristic of chemoattractant cytokines).

Anti-IL-16 Antibodies Neutralize Microglial Cell Migration

To determine the specificity of IL-16-mediated microglia migration and conditioned medium-induced chemotaxis of microglial cells, anti-IL-16 antibodies were used to inhibit induced cell migration. The preincubation of microglial cells either with mouse monoclonal anti-human- IL-16 Ab, directed to the RRK sequence, or with specific rabbit polyclonal anti-*Hm*IL-16 Ab showed a significant decrease in the chemotactic effect of the conditioned medium on microglia migration (Fig. 4B). Control experiments performed with rabbit preimmune serum at the same concentration had no effect on induced migration (Fig. 4B). Finally, when microglial cells were pretreated with specific rabbit anti-*Hm*IL-16 Ab, the chemotactic response to the optimal concentration of human IL-16 (1 μg mL^{-1}) was also significantly reduced. Taken all together, these data indicate that leech CNS-conditioned media contain IL-16 bioactivity that is structurally and functionally homologous to human IL-16.

*Anti-Hm*IL-16 Inhibits the Accumulation of Microglia at a CNS Lesion

The *in vitro* experiments suggest that IL-16 may play a role in the recruitment of microglial cells in the leech CNS. To confirm this concept, recruitment of microglial cells were assessed following a crushed nerve cord model. It has been revealed that leech microglia normally lie scattered among axons as an apparently homogeneous population of cells within the nerve cord. Microglia accumulate at the site of lesion within 24 h of nerve injury (Morgese et al., 1983; Ngu et al., 2007). As previously described, these cells can be identified unambiguously without special markers, because the only other nucleated cells among the thousands of axons that extend between segmental ganglia are two large glial cells, up to 5 mm in length, that sheathe the axons and are located midway between ganglia. Thus, microglia can be tracked in the living cord with the aid of nonspecific fluorescent nuclear dyes (McGlade-McCulloh et al., 1989). In the present experiment, nerve cords were crushed and then recruitment of microglial cells is determined using the flurorescent nuclear dye Hoechst 33342. Our results indicate that cords fixed 4 h after crushing showed an accumulation of microglia at lesions (data not shown). To determine the contribution of IL-16 to the overall recruitment of microglia, crushed connectives were injected with the specific anti-*Hm*IL-16 antibody prior to assessment 4 h later: the migratory process of microglial cells at the injured site was abolished (Fig. 4C). In control experiments, the perfusion of preimmune serum did not affect microglia accumulation (Fig. 4C).

IL-16 is Detected in Leech CNS by Western Blot

To determine if the biological activity found in the chemotaxis assays could correspond to the presence of a homologous of IL-16, conditioned medium was analyzed by Western blot assays using the specific anti-*Hm*IL-16 antibody. The results revealed in CNS protein extract a pattern of products ranging from 23 to 140 kDa (Fig. 4D, Lane 1). A similar pattern was observed from CNS-conditioned medium protein extract (data not shown). Preimmune serum was used as negative control (Fig. 4D, Lane 2). The pattern of detected products is in accordance with other previous studies which demonstrated in human the presence of numerous processed and auto-aggregated forms of IL-16 (Chupp et al., 1998).

Effect of Conditioned Medium on Human CD4+T Cell Chemotaxis

To study the functional analogy of *Hm*IL-16 with its human homolog, the chemotactic property of the leech molecule was assessed on human cells. Because human IL-16 was described as a chemotactic factor for CD4+ T cells through a CD4-dependent pathway and because a CD4-like molecule is not characterized in human microglia yet, the effect of leech conditioned medium (1:10) containing *Hm*IL-16 was evaluated using human T cell migration in comparison with recombinant human IL-16 (10^{-8}M). Human T lymphocytes were observed to migrate toward conditioned medium and cell migration percentages were comparable to those obtained toward human IL-16 (Fig. 5A). Incubation of T cells with different concentrations of either monoclonal anti-human IL-16 or polyclonal anti-*Hm*IL-16 antibodies induced a significant dose-dependent decrease in cell migration (Fig. 5A). Interestingly, mixed T cells were observed to migrate specifically toward leech conditioned medium containing *Hm*IL-16 in a dose-dependent manner with a maximal migration at a dilution 1:10 (Fig. 5B). Higher or lower concentration produced a diminished CD4+ T cell migration, consistent with typical chemoattractant responses. Similar results were obtained using CD4+ T cells alone. Specificity of the activity of *Hm*IL-16 on CD4+ T cell migration was demonstrated using specific neutralizing experiments with anti-IL-16 antibodies (Fig. 5C). Indeed the preincubation of CD4+ T cell with either anti-human IL-16 antibody (1 μg) or the IL-16 antagonist peptide (5 μg) strongly reduced cell migration. The addition of soluble CD4 (5 μg) to the cells prior to the chemotaxis assay was able to significantly reduce the human CD4+ T cells migration induced by leech conditioned medium. Controls realized either with an anti-IgG2a antibody or a scrambled peptide showed no effect on CD4+T cell migration induced by conditioned medium (Fig. 5C). Although a CD8+ T cell migration was observed at the highest concentration of conditioned medium (1:1), this response was not dependent on *Hm*IL-16 as incubation with the monoclonal anti-human IL-16 did not affect the induced migration.

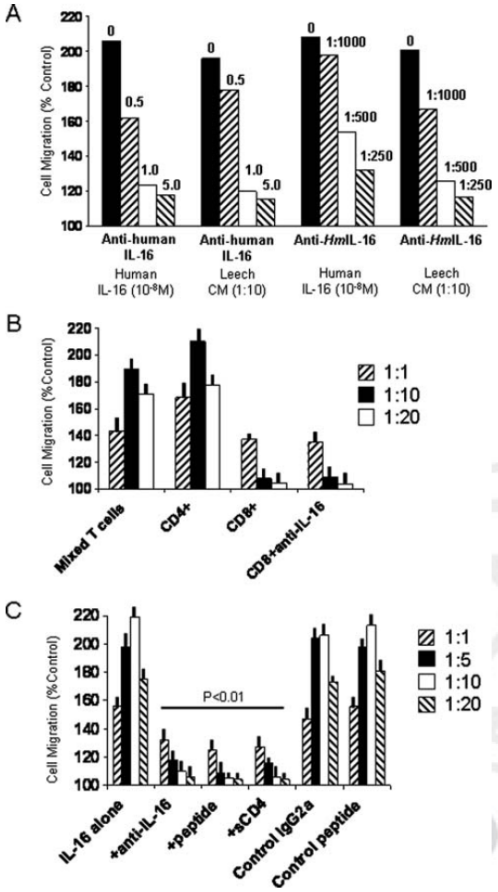


Fig. 5. Chemotactic effect of *Hm*IL-16 on human T cells. (**A**) Anti-sera inhibitory effect on human T cell migration induced by either human recombinant IL-16 (10^{-8}M) or leech CNS conditioned medium (CM, 1:10) containing *Hm*IL-16. The antibodies were used at 0.5, 1, and 5 μg mL^{-1} for monoclonal anti-human IL-16 and at 1:1,000, 1:500, and 1:250 for polyclonal anti-*Hm*IL-16 antibody. (**B**) CD4 specificity of *Hm*IL-16 for migratory effect on T cells. Either CD4+ T cells or CD8+ T cells were tested against a gradient of leech conditioned medium (1:1, 1:10, and 1:20) containing *Hm*IL-16 compared with mixed T cells. For CD8+ T cells, a preincubation with human anti-IL-16 antibody was performed as control before the addition of conditioned medium attesting a slight *Hm*IL-16-independent chemotaxis. (**C**) Inhibitory effect on *Hm*IL-16-mediated chemotaxis on human CD4+ T cells. CD4+ T cells were tested against leech conditioned medium (1:1, 1:5, 1:10, 1:20) containing *Hm*IL-16. Preincubation of CD4+ T cells with an anti-humanIL-16 mAb (1 μg), an IL-16 antagonist peptide (RRKSLQSKETTAAGNS) (5 μg) and soluble CD4 (5 μg) were performed previously to the addition of *Hm*IL-16. CD4+ T cells were preincubated with either IgG2A or a scrambled peptide using the same amino acids (5 μg) as controls for respectively mAb and antagonist peptide.

Distribution of IL-16 in the Nervous System Following Injury

Cells of origin for *Hm*IL-16 protein and mRNA were investigated by immunohistochemical staining and by *in situ* hybridization on nerve cord at different times after injury (see Fig. 6). Just after the crush, IL-16 was detected, using an anti-*Hm*IL-16 antibody, in neuron bodies (Fig. 6A). A similar sample, treated with rabbit pre-immune serum as a negative control did not show any signal (Fig. 6A′). Interestingly, 24 h after injury, a stronger *Hm*IL-16 signal appeared in neurons (Fig. 6B). The saturated control samples using the synthesis peptide did not show any signal (Fig. 6B′) further confirming specificity of the anti-*Hm*IL-16 antibody. *Hm*IL-16 appeared distributed within the cytoplasm in a scattered pattern (Fig. 6C). Immediately following the lesion, staining was observed at the cut end of a connective before accumulation of any microglial cell (Fig. 6D). Immunolocalization of the *Hm*IL-16 at the cut end of axons suggest production and a rapid release of the cytokine by the neurons. To get further information on the origin of *Hm*IL-16 observed at the lesion site, ligature experiments were performed. It appeared that by contrast with the external ligatures, external and internal ligatures of ganglia 3 and 4, which isolate the cell body of neurons from nerve fibers, blocked the accumulation of *Hm*IL-16 at the lesion site (Fig. 6E). Twenty-four hours following the injury, no *Hm*IL-16 positive microglial cells were detected at the lesion site (see frame, Fig. 6F′) whereas Hoechst staining of the same sample confirmed the accumulation of microglial cells (Fig. 6F). As described above, this nuclear dye is specifically used to follow the only circulating cells in the connective which are microglial cells (Chen et al., 2000; McGlade-McCulloh et al., 1989). Of interest, although these cells are negative for the protein, *in situ* hybridization analyses performed on crushed connective (Fig. 7A) demonstrated that migrating and accumulating Hoechst positive microglial cells (Fig. 7B) produce *Hm*IL-16 mRNA 24 h following lesion (Fig. 7C). The uncrushed connective on the other side of the same nerve cord was used as an internal reference. Interestingly, neither the accumulation of microglial cells (Fig. 7B) nor mRNA was detected in microglia of the uncrushed connective (Fig. 7C). Despite the accumulation of microglial cells at the crushed site, no specific signal was detected with sense probe (negative control) (Fig. 7D).

To determine whether *Hm*IL-16 protein was detectable later in microglial cells of the connectives, nerve cords were cultured for 72 h after injury and stained with anti-*Hm*IL-16 antibody. Three days after injury, *Hm*IL-16 immunoreactivity was detected in microglial cells accumulated at the cut end of the lateral roots of the ganglia (Fig. 7E). A similar sample, treated with rabbit preimmune serum as a negative control did not show any signal (data not shown).

DISCUSSION

Vertebrate microglial activation is generally characterized as a gradual transition from a quiescent stellate form to a macrophage-like morphology. When the brain is injured or affected by brain diseases (e.g., degenerative, infectious, or autoimmune diseases), the resident ramified microglia morphologically transform into cells

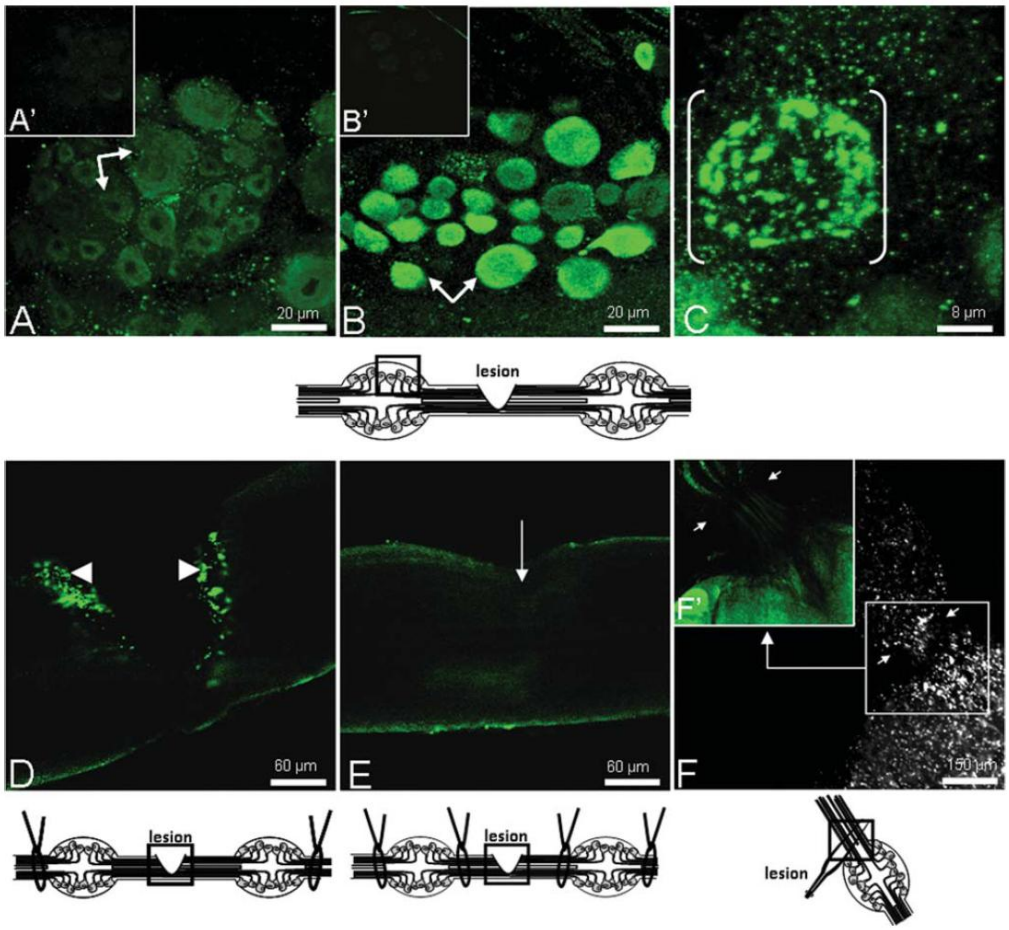


Fig. 6. Immunostaining of leech CNS using rabbit polyclonal anti-*Hm*IL-16 antibody. Ganglia were analyzed immediately (**A**, **A′**) or 24 h (**B**, **B′**, **C**) following injury. (A) The anti-*Hm*IL-16 immunostaining was detected at $t = 0$ inside a ganglion in some neurons of different size (see arrows as examples). (B) Twenty-four hours following injury, the immunostaining was stronger in neuron bodies (see arrows as examples) and sometimes concentrated in peripheral vesicles (C, one neuron in brackets). Connectives were analyzed immediately (**D**, **E**) or 24 h (**F**) following injury. Positive immunostaining at the injury site is observed close to the axonal cut ends when ganglia were ligatured outside (D, arrow heads). No signal was detected when additional internal ligature was performed (E, arrow). (F) Twenty-four hours following injury (arrows), once microglial cells were migrated to the crush site (F, Hœchst 33342 labeled cells) they were still negatives for *Hm*IL-16 immunostaining (**F′**). Negative controls were performed using rabbit pre-immune serum (A′) and anti-*Hm*IL-16 preincubated with the synthetic peptide used for polyclonal antibodies production (B′). The diagrams representing two consecutive ganglia of leech CNS indicate in frames the position of presented images.

with retracted processes and enlarged cell bodies, and increase in cell number at the affected site. Microglial cells with this particular form are generally referred as "activated microglia" or "reactive microglia." Of interest, the present study showed for the first time from whole injured leech CNS the same morphological changes of microglia by using a specific leech microglial marker.

In this report, a chemotactic molecule, designated as *Hm*IL-16, was demonstrated to be involved in the microglial cell migration following leech nerve injury. This cell accumulation was shown to be a primary event required for sprouting of severed axons in the leech CNS (Ngu et al., 2007). In contrast to vertebrates, invertebrates such as leeches can repair their nervous system following injury and therefore offer unique opportunities to study the molecular and cellular steps of this vital process (Blackshaw et al., 2004; von Bernhardi and Muller, 1995; Wang et al., 2005).

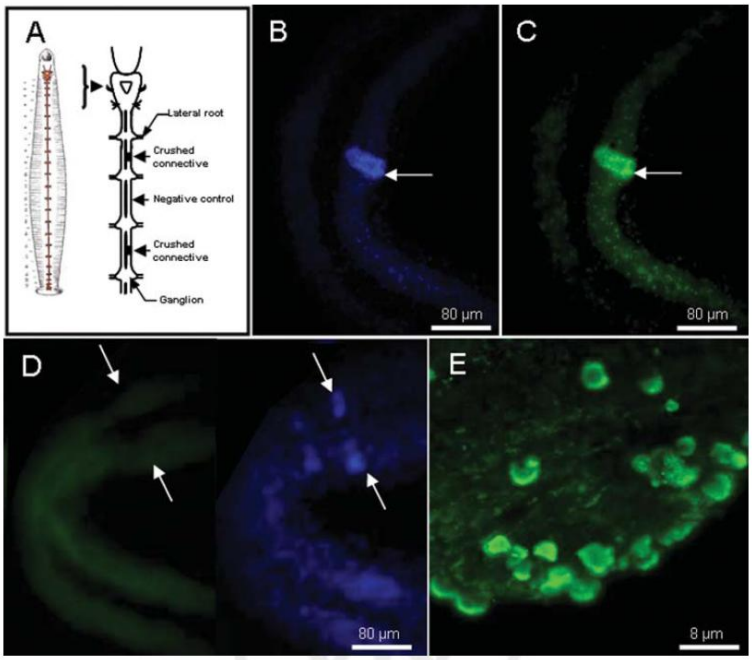


Fig. 7. Induction of *Hm*IL-16 in microglial cells following recruitment at the injury site. (**A**) Diagram of experimental procedure for CNS dissection and crushes on one of the two connectives. Tissues were analyzed 24 h (**B–D**) and 72 h (**E**) following injury. (B) Fluorescence microscopy image showing Hœchst 33342-labeled microglial cells accumulated at the lesion site (arrow). (C) *HmIL-16* mRNAs were located by fluorescence *in situ* hybridization on connectives joining two ganglia. Transcripts were specifically detected (antisense *HmIL-16* riboprobes) in recruited (arrows) and circulating microglial cells. (D) In the control sample (sense riboprobe), no signal was detected in microglial cells (arrows) accumulated at the lesion site of both connectives (left) and evidenced by Hœchst 33342 labeling (right). (E) *Hm*IL-16 protein was located by using fluorescent immunostaining (rabbit polyclonal anti-*Hm*IL-16 antibody) of microglial cells recruited at a damaged connective end, 72 h after injury.

Author Proof

By using leech CNS databases, a molecule having significant homologies with vertebrate interleukin-16 was identified. In its C-terminus end, the molecule contains a PDZ domain, specialized for binding of C-termini in partner proteins potentially involved in cellular signaling (Jelen et al., 2003). Bioactive IL-16 is the first known extracellular protein with a PDZ domain-like fold whose structural alterations avoid consensus peptide binding properties. Indeed, the GLGF cleft of IL-16 is much smaller than those of PDZ-domains and is blocked by a tryptophan side chain at its center (Muhlhahn et al., 1998). Interestingly, the leech molecule contains a GVGF motif similar to IL-16 in rainbow trout or pufferfish (Wen et al., 2006). Moreover, *Hm*IL-16 sequence showed significant similarities with putative IL-16 sequences from protostomes and nonchordate deuterostomes. However, although sequencing of several invertebrate genomes (i.e., insects and echinoderms) recently identified the presence of such molecules, their role was not elucidated by functional analyses. In that regard, we have now demonstrated that *Hm*IL-16 can induce chemotactic activity in leech microglia, as well as human T cells, and is able to cross-react with antibodies directed towards human IL-16. Indeed, the cross-reactivity between human and leech IL-16 activity likely resides in their sequence homology at the bioactive sites and in the PDZ domains. Reports suggest that IL-16+ human cells exert chemotaxis on microglia precursors during neurogenesis (Schwab et al., 2001a,b) but such activity of IL-16 for microglial cells has not been reported. The specificity of IL-16-mediated microglia migration was clearly demonstrated by using anti-IL-16 antibodies and by showing that the conditioned medium activity was dependent on a bioactive IL-16 form. The use of a peptide corresponding to the human IL-16 C-terminal end (Arg^{106} to Ser^{121}, RRKSLQSKETTAAGDS), known to specifically inhibit human IL-16 activity (Keane et al., 1998), will confirm this concept. Within the 16 C-terminal residues, the peptide RRK shown to be critical for vertebrate IL-16 function is present in the leech sequence. Point mutations in IL-16 protein revealed that Arg^{107} is critical for CD4+ T cell chemotaxis (Nicoll et al., 1999). Arg^{107} is conserved in the mouse IL-16 sequence as in six primate species (Bannert et al., 1998). In *Hm*IL-16, this critical arginine is also conserved (Fig. 3C). Using human CD4+ T cells as target

cells, the leech-conditioned medium exhibited similar activities as human IL-16. The fact that *Hm*IL-16 has no effect on CD8+ cell migration further indicates a similar relationship with CD4 as has been described for human IL-16. While a CD4-homologous protein has not been identified in leech, our data indicating conservation of function would suggest its presence. Experiments carried out with soluble CD4 indicate that *Hm*IL-16 might act via a CD4-like ligand expressed by leech microglial cells as reported for human microglia (Schluesener et al., 1996). A specific anti-human CD4 antibody can reduce the microglia migration induced with either human IL-16 or conditioned medium (data not shown). Additionally, the human anti-CD4 antibody allowed (i) detection of two products (55 and 75 kDa, consistent with human CD4) in the CNS protein extracts, and (ii) was capable of labeling 4.5% of microglial cells by FACS analyses (data not shown) indicating subset specificity. Thus, these experiments with human or leech IL-16 on either human T cells or leech microglia showed functional cross-reactivity and suggest a cross-species conservation of IL-16 receptor structures. The study of mammalian microglial recruitment will be undertaken consequently to these results. But, this information would be suitable following the molecular characterization of a CD4 related molecule in leech microglia which is under way. If so, leech data will be originally useful to highlight, through a further publication, the presence of CD4-like receptor in mammalian nerve cells, distinctly to the infiltrating blood cells.

We have also determined that leech microglial cells are capable of generating IL-16. Based on our analysis of the IL-16, it appears that the process for generation is similar to that described for human IL-16. Western blot analysis of leech CNS using the anti-*Hm*IL-16 antibody revealed a pattern of bands (from 23 to 140 kDa) indicative of multiple forms with a putative pro-IL-16 and auto-aggregated active form(s). In mammals, IL-16 is initially synthesized as a large precursor protein (pro-IL-16), identified in two related isoforms. The pro-IL-16 isoform 1 generated by hematopoietic cells (Pro-IL16) is a 68 kDa molecule (Bellini et al., 1993; Laberge et al., 1997; Lim et al., 1996; Rumsaeng et al., 1997; Sciaky et al., 2000; Sharma et al., 2000) but is also generated by microglia (Guo et al., 2004; Liebrich et al., 2007; Schluesener et al., 1996; Schwab et al., 2001b; Zhang et al., 2008; Zhao et al., 2004). The pro-IL-16 isoform 2 is a 141 kDa neuronal protein (NIL-Pro-IL-16) detected in neurons localized in the cerebellum and hippocampus. Both pro-IL-16 proteins are cleaved by caspase 3 at an aspartate site located before the last PDZ domain to produce an N-terminal sequence (Zhang et al., 1998) and a C-terminal peptide which can subsequently function as mature IL-16 by forming multimers (Zhang et al., 2001). Indeed, the homo-tetramerization of human IL-16 was reported as necessary for biological activity (Center et al., 1996). C-terminal regions of mammalian IL-16 and NIL-16 are completely homologous (Kurschner and Yuzaki, 1999). As the specific *Hm*IL-16 antibody binds to the C-terminal portion of *Hm*IL-16, the two isoforms could not be distinguished. Additional studies are needed to characterize the processing from proIL-16 to the bioactive IL-16 form(s) in the leech-conditioned medium. The *in vitro* biological activity of *Hm*IL-16 was confirmed by *ex-vivo* experiments using leech nerve cords. The injection of specific anti-*Hm*IL-16 antibodies in the living nerve cord following injury reduced the microglia migration at the injury site. Since such accumulation is essential following nerve cord lesion, *Hm*IL-16 might play a crucial role in leech CNS repair (Duan et al., 2005; Ngu et al., 2007). In mammals, treatments that neutralize IL-16, which is a proinflammatory cytokine, with anti-IL-16 antibodies successfully reversed paralysis and ameliorated relapsing of experimental autoimmune encephalomyelitis. In treated mice, diminished infiltration by CD4+ T cells, less demyelination and increased sparing of axons was observed (Skundric et al., 2005a,b). In leech, the microglia recruitment at lesions suggesting an inflammatory response is possible with the participation of *Hm*IL-16. Nevertheless, the regulation of inflammation leading to the nerve repair is still unclear.

Otherwise, the neuronal production of *Hm*IL-16 immediately after injury suggested a constitutive expression of its gene and the existence of a neuronal form as already suggested by the results of western blots. The IL-16 immunoreactivity is mainly localized at the periphery of the neuron cytoplasm and sometimes appeared vesicular suggesting an active transport outside of neurons and/or toward axons. Interestingly, when ganglia are ligatured to isolate cell body of neurons from nerve fibers leading to the cut connective, accumulation of *Hm*IL-16 at the lesion site is not detected. Thus, these observations strongly suggests that IL-16 protein present in the neurons is rapidly transported and stored along the axonal processes to promote the recruitment of microglial cells close to injured axons. Although numerous microglial cells were recruited following the lesion, no *Hm*IL-16 protein was detected in connective's microglia either immediately or 24 h after injury. Nevertheless, *Hm*IL-16 transcripts were observed 24 h after injury in activated microglial cells where *Hm*IL-16 protein was detected from 72-h postinjury. We hypothesize that microglial cells are first activated by neuronal IL-16 released from damaged neurons and then migrating microglial cells can release their own IL-16 to maintain cell accumulation at the lesion. In human brain, IL-16 is constitutively expressed by a subset of microglial cells (Mittelbronn et al., 2001). Numerous studies have reported the induction of IL-16 in pathological neurodegenerative situations (Glass et al., 2006; Guo et al., 2004; Liebrich et al., 2007; Mueller et al., 2006; Schwab et al., 2001a,b; Zhao et al., 2004 no. 306). The increased rate of IL-16 was correlated with lymphocyte infiltration but that recruitment was not directly dependent on neuronal and/or microglial IL-16 (Skundric et al., 2005a). Microglia in mammals are considered as sensors for micro-inflammatory processes (Hanisch and Kettenmann, 2007; Hanisch, 2002). Of interest, other cytokines from microglia/macrophage are also required for the

accumulation of T cells which mediate damages in the nervous system (Schwab et al., 2001a).

In summary, we have identified a protein in leech CNS (*Hm*IL-16) that has high functional homology to mammalian IL-16. Our studies also suggest that, similar to mammalian IL-16, *Hm*IL-16 can associate with CD4 further confirming a strong evolutionary association between IL-16 and CD4. Its implication in the microglia migration was clearly demonstrated as *Hm*IL-16 was identified as a key molecule involved in the crosstalk between neurons and microglia during the leech CNS repair. Further experiments will be undertaken to characterize subsets of leech responsive microglia and their sequential mobilization along the time course of nerve repair. Thus, our first purpose is to clarify the leech CNS processes thanks to its simplicity. Indeed, the respective implication of blood cells and microglia in mammalian nerve repair is difficult to specify because *in vivo* analyses in mammals cannot exclude the presence of blood cells in brain. The present report does not consider this "mammalian" question prior to better understand microglia implication in leech nerve repair. Finally, molecular mechanisms involved in only leech microglial activation might be potent tools to evaluate the implication of microglia in mammalian nerve repair.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Christian Slomianny and Pr Natalia Prevarskaya (Inserm, U800, Laboratoire de Physiologie Cellulaire, Université de Lille 1, France) for access to Zeiss LSM 510 Laser Scanning Confocal Microscope; Gilles Courtand (BiCFal, Université de Lille 1, France) and Annie Desmons for technical assistance.

REFERENCES

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res 25:3389–3402.

Bannert N, Adler HS, Werner A, Baier M, Kurth R. 1998. Molecular cloning and sequence analysis of interleukin 16 from nonhuman primates and from the mouse. Immunogenetics 47:390–397.

Bellini A, Yoshimura H, Vittori E, Marini M, Mattoli S. 1993. Bronchial epithelial cells of patients with asthma release chemoattractant factors for T lymphocytes. J Allergy Clin Immunol 92:412–424.

Blackshaw SE, Babington EJ, Emes RD, Malek J, Wang WZ. 2004. Identifying genes for neuron survival and axon outgrowth in *Hirudo medicinalis*. J Anat 204:13–24.

Bray DF, Bagu J, Koegler P. 1993. Comparison of hexamethyldisilazane (HMDS), Peldri II, critical-point drying methods for scanning electron microscopy of biological specimens. Microsc Res Tech 26:489–495.

Center DM, Cruikshank W. 1982. Modulation of lymphocyte migration by human lymphokines. I. Identification and characterization of chemoattractant activity for lymphocytes from mitogen-stimulated mononuclear cells. J Immunol 128:2563–2568.

Center DM, Kornfeld H, Cruikshank WW. 1996. Interleukin 16 and its function as a CD4 ligand. Immunol Today 17:476–481.

Center DM, Kornfeld H, Ryan TC, Cruikshank WW. 2000. Interleukin 16: Implications for CD4 functions and HIV-1 progression. Immunol Today 21:273–280.

Chen A, Kumar SM, Sahley CL, Muller KJ. 2000. Nitric oxide influences injury-induced microglial migration and accumulation in the leech CNS. J Neurosci 20:1036–1043.

Chupp GL, Wright EA, Wu D, Vallen-Mashikian M, Cruikshank WW, Center DM, Kornfeld H, Berman JS. 1998. Tissue and T cell distribution of precursor and mature IL-16. J Immunol 161:3114–3119.

Corpet F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. Nucleic Acids Res 16:10881–10890.

Cruikshank W, Center DM. 1982. Modulation of lymphocyte migration by human lymphokines. II. Purification of a lymphotactic factor (LCF). J Immunol 128:2569–2574.

del Rio-Hortega P. 1932. Cytology and cellular pathology of the nervous system. In: Penfield W, editor. Microglia. New York: P B Hoebaer. pp483–534.

Duan Y, Panoff J, Burrell BD, Sahley CL, Muller KJ. 2005. Repair and regeneration of functional synaptic connections: Cellular and molecular interactions in the leech. Cell Mol Neurobiol 25:441–450.

Elliott EJ, Muller KJ. 1981. Long-term survival of glial segments during nerve regeneration in the leech. Brain Res 218:99–113.

Glass WG, Sarisky RT, Vecchio AM. 2006. Not-so-sweet sixteen: The role of IL-16 in infectious and immune-mediated inflammatory diseases. J Interferon Cytokine Res 26:511–520.

Guo LH, Mittelbronn M, Brabeck C, Mueller CA, Schluesener HJ. 2004. Expression of interleukin-16 by microglial cells in inflammatory, autoimmune, and degenerative lesions of the rat brain. J Neuroimmunol 146:39–45.

Hanisch UK. 2002. Microglia as a source and target of cytokines. Glia 40:140–155.

Hanisch UK, Kettenmann H. 2007. Microglia: Active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. Nat Neurosci 10:1387–1394.

Jelen F, Oleksy A, Smietana K, Otlewski J. 2003. PDZ domains—Common players in the cell signaling. Acta Biochim Polym 50:985–1017.

Karlin S, Altschul SF. 1990. Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. Proc Natl Acad Sci USA 87:2264–2268.

Keane J, Nicoll J, Kim S, Wu DM, Cruikshank WW, Brazer W, Natke B, Zhang Y, Center DM, Kornfeld H. 1998. Conservation of structure and function between human and murine IL-16. J Immunol 160:5945–5954.

Köhidai L. 1995. Method for determination of chemoattraction in *Tetrahymena pyriformis*. Curr Microbiol 30:251–253.

Kreutzberg GW. 1996. Microglia: A sensor for pathological events in the CNS. Trends Neurosci 19:312–318.

Kumar SM, Porterfield DM, Muller KJ, Smith PJ, Sahley CL. 2001. Nerve injury induces a rapid efflux of nitric oxide (NO) detected with a novel NO microsensor. J Neurosci 21:215–220.

Kurschner C, Yuzaki M. 1999. Neuronal interleukin-16 (NIL-16): A dual function PDZ domain protein. J Neurosci 19:7770–7780.

Laberge S, Ernst P, Ghaffar O, Cruikshank WW, Kornfeld H, Center DM, Hamid Q. 1997. Increased expression of interleukin-16 in bronchial mucosa of subjects with atopic asthma. Am J Respir Cell Mol Biol 17:193–202.

Liebrich M, Guo LH, Schluesener HJ, Schwab JM, Dietz K, Will BE, Meyermann R. 2007. Expression of interleukin-16 by tumor-associated macrophages/activated microglia in high-grade astrocytic brain tumors. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 55:41–47.

Lim KG, Wan HC, Bozza PT, Resnick MB, Wong DT, Cruikshank WW, Kornfeld H, Center DM, Weller PF. 1996. Human eosinophils elaborate the lymphocyte chemoattractants. IL-16 (lymphocyte chemoattractant factor) and RANTES. J Immunol 156:2566–2570.

Masuda-Nakagawa LM, Muller KJ, Nicholls JG. 1990. Accumulation of laminin and microglial cells at sites of injury and regeneration in the central nervous system of the leech. Proc Biol Sci 241:201–206.

McGlade-McCulloh E, Morrissey AM, Norona F, Muller KJ. 1989. Individual microglia move rapidly and directly to nerve lesions in the leech central nervous system. Proc Natl Acad Sci USA 86:1093–1097.

Mittelbronn M, Dietz K, Schluesener HJ, Meyermann R. 2001. Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude. Acta Neuropathol 101:249–255.

Morgese VJ, Elliott EJ, Muller KJ. 1983. Microglial movement to sites of nerve lesion in the leech CNS. Brain Res 272:166–170.

Mueller CA, Schluesener HJ, Conrad S, Pietsch T, Schwab JM. 2006. Spinal cord injury-induced expression of the immune-regulatory chemokine interleukin-16 caused by activated microglia/macrophages and CD8+ cells. J Neurosurg Spine 4:233–240.

Muhlhahn P, Zweckstetter M, Georgescu J, Ciosto C, Renner C, Lanzendorfer M, Lang K, Ambrosius D, Baier M, Kurth R, et al. 1998. Structure of interleukin 16 resembles a PDZ domain with an occluded peptide binding site. Nat Struct Biol 5:682–686.

Nardelli-Haefliger D, Shankland M. 1992. Lox2, a putative leech segment identity gene, is expressed in the same segmental domain in different stem cell lineages. Development 116:697–710.

Ngu EM, Sahley CL, Muller KJ. 2007. Reduced axon sprouting after treatment that diminishes microglia accumulation at lesions in the leech CNS. J Comp Neurol 503:101–109.

Nicoll J, Cruikshank WW, Brazer W, Liu Y, Center DM, Kornfeld H. 1999. Identification of domains in IL-16 critical for biological activity. J Immunol 163:1827–1832.

Perry VH, Gordon S. 1988. Macrophages and microglia in the nervous system. Trends Neurosci 11:273–277.

Rumsaeng V, Cruikshank WW, Foster B, Prussin C, Kirshenbaum AS, Davis TA, Kornfeld H, Center DM, Metcalfe DD. 1997. Human mast cells produce the CD4+ T lymphocyte chemoattractant factor, IL-16 J Immunol 159:2904–2910.

Schluesener HJ, Seid K, Kretzschmar J, Meyermann R. 1996. Leukocyte chemotactic factor, a natural ligand to CD4, is expressed by lymphocytes and microglial cells of the MS plaque. J Neurosci Res 44:606–611.

Schwab JM, Nguyen TD, Meyermann R, Schluesener HJ. 2001a. Human focal cerebral infarctions induce differential lesional interleukin-16 (IL-16) expression confined to infiltrating granulocytes, CD8+ T-lymphocytes and activated microglia/macrophages J Neuroimmunol 114:232–241.

Schwab JM, Schluesener HJ, Seid K, Meyermann R. 2001b. IL-16 is differentially expressed in the developing human fetal brain by microglial cells in zones of neuropoesis. Int J Dev Neurosci 19:93–100.

Sciaky D, Brazer W, Center DM, Cruikshank WW, Smith TJ. 2000. Cultured human fibroblasts express constitutive IL-16 mRNA: Cytokine induction of active IL-16 protein synthesis through a caspase-3-dependent mechanism. J Immunol 164:3806–3814.

Sharma V, Sparks JL, Vail JD. 2000. Human B-cell lines constitutively express and secrete interleukin-16. Immunology 99:266–271.

Skundric DS, Cai J, Cruikshank WW, Gveric D. 2006. Production of IL-16 correlates with CD4+ Th1 inflammation and phosphorylation of axonal cytoskeleton in multiple sclerosis lesions. J Neuroinflammation 3:13.

Skundric DS, Dai R, Zakarian VL, Bessert D, Skoff RP, Cruikshank WW, Kurjakovic Z. 2005a. Anti-IL-16 therapy reduces CD4+ T-cell infiltration and improves paralysis and histopathology of relapsing EAE. J Neurosci Res 79:680–693.

Skundric DS, Zhou W, Cruikshank WW, Dai R. 2005b. Increased levels of bioactive IL-16 correlate with disease activity during relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). J Autoimmun 25:206–214.

Tastet C, Lescuyer P, Diemer H, Luche S, van Dorsselaer A, Rabilloud T. 2003. A versatile electrophoresis system for the analysis of high- and low-molecular-weight proteins. Electrophoresis 24:1787–1794.

von Bernhardi R, Muller KJ. 1995. Repair of the central nervous system: Lessons from lesions in leeches. J Neurobiol 27:353–366.

Wang WZ, Emes RD, Christoffers K, Verrall J, Blackshaw SE. 2005. *Hirudo medicinalis*: A platform for investigating genes in neural repair. Cell Mol Neurobiol 25:427–440.

Wen Y, Shao JZ, Xiang LX, Fang W. 2006. Cloning, characterization and expression analysis of two Tetraodon nigroviridis interleukin-16 isoform genes. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 144:159–166.

Xu Y, Bolton B, Zipser B, Jellies J, Johansen KM, Johansen J. 1999. Gliarin and macrolin, two novel intermediate filament proteins specifically expressed in sets and subsets of glial cells in leech central nervous system. J Neurobiol 40:244–253.

Zhang Y, Center DM, Wu DM, Cruikshank WW, Yuan J, Andrews DW, Kornfeld H. 1998. Processing and activation of pro-interleukin-16 by caspase-3. J Biol Chem 273:1144–1149.

Zhang Y, Kornfeld H, Cruikshank WW, Kim S, Reardon CC, Center DM. 2001. Nuclear translocation of the N-terminal prodomain of interleukin-16. J Biol Chem 276:1299–1303.

Zhang ZY, Zhang Z, Fauser U, Schluesener HJ. 2008. Expression of Interleukin-16 in sciatic nerves, spinal roots and spinal cords of experimental autoimmune neuritis rats. Brain Pathol.

Zhao ML, Si Q, Lee SC. 2004. IL-16 expression in lymphocytes and microglia in HIV-1 encephalitis. Neuropathol Appl Neurobiol 30:233–242.

Bibliographie

© 2011 Tous droits réservés.
http://doc.univ-lille1.fr

Aarum J, Sandberg K, Haeberlein SL, Persson MA. 2003. Migration and differentiation of neural precursor cells can be directed by microglia. Proc Natl Acad Sci U S A 100(26):15983-8.

Adoutte A, Balavoine G, Lartillot N, Lespinet O, Prud'homme B, de Rosa R. 2000. The new animal phylogeny: reliability and implications. Proc Natl Acad Sci U S A 97(9):4453-6.

Aguirre K, Miller S. 2002. MHC class II-positive perivascular microglial cells mediate resistance to Cryptococcus neoformans brain infection. Glia 39(2):184-8.

Alarcon R, Fuenzalida C, Santibanez M, von Bernhardi R. 2005. Expression of scavenger receptors in glial cells. Comparing the adhesion of astrocytes and microglia from neonatal rats to surface-bound beta-amyloid. J Biol Chem 280(34):30406-15.

Alexander JJ, Anderson AJ, Barnum SR, Stevens B, Tenner AJ. 2008. The complement cascade: Yin-Yang in neuroinflammation--neuro-protection and -degeneration. J Neurochem 107(5):1169-87.

Ali H. 2010. Regulation of human mast cell and basophil function by anaphylatoxins C3a and C5a. Immunol Lett 128(1):36-45.

Aloisi F. 2001. Immune function of microglia. Glia 36(2):165-79.

Aloisi F, De Simone R, Columba-Cabezas S, Penna G, Adorini L. 2000. Functional maturation of adult mouse resting microglia into an APC is promoted by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interaction with Th1 cells. J Immunol 164(4):1705-12.

Alzheimer A. 1904. Histologische Studien zur Diferenzialdiagnose der progressiven Paralyse. Nissl's histologische und histopathologische Arbeiten. 1:18-314.

Ariki S, Takahara S, Shibata T, Fukuoka T, Ozaki A, Endo Y, Fujita T, Koshiba T, Kawabata S. 2008. Factor C acts as a lipopolysaccharide-responsive C3 convertase in horseshoe crab complement activation. J Immunol 181(11):7994-8001.

Aschner M, Levin ED, Sunol C, Olopade JO, Helmcke KJ, Avila DS, Sledge D, Ali RH, Upchurch L, Donerly S and others. 2010. Gene-environment interactions: Neurodegeneration in non-mammals and mammals. Neurotoxicology.

Azumi K, De Santis R, De Tomaso A, Rigoutsos I, Yoshizaki F, Pinto MR, Marino R, Shida K, Ikeda M, Ikeda M and others. 2003. Genomic analysis of immunity in a Urochordate and the emergence of the vertebrate immune system: "waiting for Godot". Immunogenetics 55(8):570-81.

Babington EJ, Vatanparast J, Verrall J, Blackshaw SE. 2005. Three-dimensional culture of leech and snail ganglia for studies of neural repair. Invert Neurosci 5(3-4):173-82.

Banks WA, Kastin AJ, Gutierrez EG. 1993. Interleukin-1 alpha in blood has direct access to cortical brain cells. Neurosci Lett 163(1):41-4.

Bao D, Pang Z, Morgan JI. 2005. The structure and proteolytic processing of Cbln1 complexes. J Neurochem 95(3):618-29.

Baringer JR. 1975a. Herpes simplex virus in human sensory ganglia. IARC Sci Publ(11 Pt 2):73-7.

Baringer JR. 1975b. Herpes simplex virus infection of nervous tissue in animals and man. Prog Med Virol 20:1-26.

Batchelor PE, Liberatore GT, Wong JY, Porritt MJ, Frerichs F, Donnan GA, Howells DW. 1999. Activated macrophages and microglia induce dopaminergic sprouting in the injured striatum and express brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor. J Neurosci 19(5):1708-16.

Baylor DA, Nicholls JG. 1971. Patterns of regeneration between individual nerve cells in the central nervous system of the leech. Nature 232(5308):268-70.

© 2011 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

Becher B, Prat A, Antel JP. 2000. Brain-immune connection: immuno-regulatory properties of CNS-resident cells. Glia 29(4):293-304.

Bechmann I, Priller J, Kovac A, Bontert M, Wehner T, Klett FF, Bohsung J, Stuschke M, Dirnagl U, Nitsch R. 2001. Immune surveillance of mouse brain perivascular spaces by blood-borne macrophages. Eur J Neurosci 14(10):1651-8.

Berg AH, Combs TP, Scherer PE. 2002. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. Trends Endocrinol Metab 13(2):84-9.

Bergamaschini L, Donarini C, Gobbo G, Parnetti L, Gallai V. 2001. Activation of complement and contact system in Alzheimer's disease. Mech Ageing Dev 122(16):1971-83.

Bergman P, Termen S, Johansson L, Nystrom L, Arenas E, Jonsson AB, Hokfelt T, Gudmundsson GH, Agerberth B. 2005. The antimicrobial peptide rCRAMP is present in the central nervous system of the rat. J Neurochem 93(5):1132-40.

Bogin O, Kvansakul M, Rom E, Singer J, Yayon A, Hohenester E. 2002. Insight into Schmid metaphyseal chondrodysplasia from the crystal structure of the collagen X NC1 domain trimer. Structure 10(2):165-73.

Bohlson SS, Fraser DA, Tenner AJ. 2007. Complement proteins C1q and MBL are pattern recognition molecules that signal immediate and long-term protective immune functions. Mol Immunol 44(1-3):33-43.

Bonura A, Vizzini A, Salerno G, Parrinello N, Longo V, Colombo P. 2009. Isolation and expression of a novel MBL-like collectin cDNA enhanced by LPS injection in the body wall of the ascidian Ciona intestinalis. Mol Immunol 46(11-12):2389-94.

Bos IG, de Bruin EC, Karuntu YA, Modderman PW, Eldering E, Hack CE. 2003. Recombinant human C1-inhibitor produced in Pichia pastoris has the same inhibitory capacity as plasma C1-inhibitor. Biochim Biophys Acta 1648(1-2):75-83.

Botto M. 1998. C1q knock-out mice for the study of complement deficiency in autoimmune disease. Exp Clin Immunogenet 15(4):231-4.

Botto M. 2001. Links between complement deficiency and apoptosis. Arthritis Res 3(4):207-10.

Botto M, Walport MJ. 2002. C1q, autoimmunity and apoptosis. Immunobiology 205(4-5):395-406.

Brabeck C, Michetti F, Geloso MC, Corvino V, Goezalan F, Meyermann R, Schluesener HJ. 2002. Expression of EMAP-II by activated monocytes/microglial cells in different regions of the rat hippocampus after trimethyltin-induced brain damage. Exp Neurol 177(1):341-6.

Brahic M, Stowring L, Ventura P, Haase AT. 1981. Gene expression in visna virus infection in sheep. Nature 292(5820):240-2.

Castillo MG, Goodson MS, McFall-Ngai M. 2009. Identification and molecular characterization of a complement C3 molecule in a lophotrochozoan, the Hawaiian bobtail squid Euprymna scolopes. Dev Comp Immunol 33(1):69-76.

Center DM, Kornfeld H, Ryan TC, Cruikshank WW. 2000. Interleukin 16: implications for CD4 functions and HIV-1 progression. Immunol Today 21(6):273-80.

Chen A, Kumar SM, Sahley CL, Muller KJ. 2000. Nitric oxide influences injury-induced microglial migration and accumulation in the leech CNS. J Neurosci 20(3):1036-43.

Christian S, Ahorn H, Novatchkova M, Garin-Chesa P, Park JE, Weber G, Eisenhaber F, Rettig WJ, Lenter MC. 2001. Molecular cloning and characterization of EndoGlyx-1, an EMILIN-like multisubunit glycoprotein of vascular endothelium. J Biol Chem 276(51):48588-95.

Coggeshall RE, Fawcett DW. 1964. The Fine Structure of the Central Nervous System of the Leech, Hirudo Medicinalis. J Neurophysiol 27:229-89.

© 2011 Tous droits réservés.
http://doc.univ-lille1.fr

Conrad ML, Pardy RL, Wainwright N, Child A, Armstrong PB. 2006. Response of the blood clotting system of the American horseshoe crab, Limulus polyphemus, to a novel form of lipopolysaccharide from a green alga. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 144(4):423-8.

Coulon P, Derbin C, Kucera P, Lafay F, Prehaud C, Flamand A. 1989. Invasion of the peripheral nervous systems of adult mice by the CVS strain of rabies virus and its avirulent derivative AvO1. J Virol 63(8):3550-4.

Cregg JM, Cereghino JL, Shi J, Higgins DR. 2000. Recombinant protein expression in Pichia pastoris. Mol Biotechnol 16(1):23-52.

Croq F. 2010. A homologous form of human interleukin 16 is implicated in microglia recruitment following nervous system injury in leech Hirudo medicinalis. Glia

Cruikshank W, Center DM. 1982. Modulation of lymphocyte migration by human lymphokines. II. Purification of a lymphotactic factor (LCF). J Immunol 128(6):2569-74.

Dalpke AH, Schafer MK, Frey M, Zimmermann S, Tebbe J, Weihe E, Heeg K. 2002. Immunostimulatory CpG-DNA activates murine microglia. J Immunol 168(10):4854-63.

Davis JG, Burns FR, Navaratnam D, Lee AM, Ichimiya S, Oberholtzer JC, Greene MI. 1997. Identification of a structural constituent and one possible site of postembryonic formation of a teleost otolithic membrane. Proc Natl Acad Sci U S A 94(2):707-12.

Davis JG, Oberholtzer JC, Burns FR, Greene MI. 1995. Molecular cloning and characterization of an inner ear-specific structural protein. Science 267(5200):1031-4.

Deitmer JW, Rose CR, Munsch T, Schmidt J, Nett W, Schneider HP, Lohr C. 1999. Leech giant glial cell: functional role in a simple nervous system. Glia 28(3):175-82.

de Vries HE, Blom-Roosemalen MC, van Oosten M, de Boer AG, van Berkel TJ, Breimer DD, Kuiper J. 1996. The influence of cytokines on the integrity of the blood-brain barrier in vitro. J Neuroimmunol 64(1):37-43.

Deininger MH, Fimmen BA, Thal DR, Schluesener HJ, Meyermann R. 2002. Aberrant neuronal and paracellular deposition of endostatin in brains of patients with Alzheimer's disease. J Neurosci 22(24):10621-6.

del Rio-Hortega P. 1932. Cytology and cellular pathology of the nervous system. Microglia in W Penfield (ed), P B Hoebaer, New York, NY:483-534.

Deli MA, Descamps L, Dehouck MP, Cecchelli R, Joo F, Abraham CS, Torpier G. 1995. Exposure of tumor necrosis factor-alpha to luminal membrane of bovine brain capillary endothelial cells cocultured with astrocytes induces a delayed increase of permeability and cytoplasmic stress fiber formation of actin. J Neurosci Res 41(6):717-26.

Dishaw LJ, Smith SL, Bigger CH. 2005. Characterization of a C3-like cDNA in a coral: phylogenetic implications. Immunogenetics 57(7):535-48.

Dobrenis K, Chang HY, Pina-Benabou MH, Woodroffe A, Lee SC, Rozental R, Spray DC, Scemes E. 2005. Human and mouse microglia express connexin36, and functional gap junctions are formed between rodent microglia and neurons. J Neurosci Res 82(3):306-15.

Doliana R, Bot S, Mungiguerra G, Canton A, Cilli SP, Colombatti A. 2001. Isolation and characterization of EMILIN-2, a new component of the growing EMILINs family and a member of the EMI domain-containing superfamily. J Biol Chem 276(15):12003-11.

Doliana R, Mongiat M, Bucciotti F, Giacomello E, Deutzmann R, Volpin D, Bressan GM, Colombatti A. 1999. EMILIN, a component of the elastic fiber and a new member of the C1q/tumor necrosis factor superfamily of proteins. J Biol Chem 274(24):16773-81.

© 2011 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

Duan Y, Haugabook SJ, Sahley CL, Muller KJ. 2003. Methylene blue blocks cGMP production and disrupts directed migration of microglia to nerve lesions in the leech CNS. J Neurobiol 57(2):183-92.

Duan Y, Panoff J, Burrell BD, Sahley CL, Muller KJ. 2005. Repair and regeneration of functional synaptic connections: cellular and molecular interactions in the leech. Cell Mol Neurobiol 25(2):441-50.

Dublet B, Vernet T, van der Rest M. 1999. Schmid's metaphyseal chondrodysplasia mutations interfere with folding of the C-terminal domain of human collagen X expressed in Escherichia coli. J Biol Chem 274(27):18909-15.

Ehlers MR. 2000. CR3: a general purpose adhesion-recognition receptor essential for innate immunity. Microbes Infect 2(3):289-94.

Ehrlich P. 1885. Das sauerstufbudurfnis des organismus, in Eine Farbenanalytiache studie. Hirschwald, Berlin.

Elkabes S, DiCicco-Bloom EM, Black IB. 1996. Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. J Neurosci 16(8):2508-21.

Elliot EJ, Muller KJ. 1981. Long-term survival of glial segments during nerve regeneration in the leech. Brain Res 218(1-2):99-113.

Elliott EJ, Muller KJ. 1983. Sprouting and regeneration of sensory axons after destruction of ensheathing glial cells in the leech central nervous system. J Neurosci 3(10):1994-2006.

Falsig J, Porzgen P, Lund S, Schrattenholz A, Leist M. 2006. The inflammatory transcriptome of reactive murine astrocytes and implications for their innate immune function. J Neurochem 96(3):893-907.

Farber K, Cheung G, Mitchell D, Wallis R, Weihe E, Schwaeble W, Kettenmann H. 2009. C1q, the recognition subcomponent of the classical pathway of complement, drives microglial activation. J Neurosci Res 87(3):644-52.

Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, Tansey KE, Doan NB, Sofroniew MV. 2004. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. J Neurosci 24(9):2143-55.

Ferreira VP, Cortes C, Pangburn MK. 2010. Native polymeric forms of properdin selectively bind to targets and promote activation of the alternative pathway of complement. Immunobiology.

Fischer HG, Nitzgen B, Germann T, Degitz K, Daubener W, Hadding U. 1993. Differentiation driven by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor endows microglia with interferon-gamma-independent antigen presentation function. J Neuroimmunol 42(1):87-95.

Fishelson Z, Attali G, Mevorach D. 2001. Complement and apoptosis. Mol Immunol 38(2-3):207-19.

Flierman R, Daha MR. 2007. Pathogenic role of anti-C1q autoantibodies in the development of lupus nephritis--a hypothesis. Mol Immunol 44(1-3):133-8.

Ford AL, Goodsall AL, Hickey WF, Sedgwick JD. 1995. Normal adult ramified microglia separated from other central nervous system macrophages by flow cytometric sorting. Phenotypic differences defined and direct ex vivo antigen presentation to myelin basic protein-reactive CD4+ T cells compared. J Immunol 154(9):4309-21.

Francis K, van Beek J, Canova C, Neal JW, Gasque P. 2003. Innate immunity and brain inflammation: the key role of complement. Expert Rev Mol Med 5(15):1-19.

Fujita T. 2002. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. Nat Rev Immunol 2(5):346-53.

© 2011 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

Fujita T, Endo Y, Nonaka M. 2004. Primitive complement system--recognition and activation. Mol Immunol 41(2-3):103-11.

Gasque P. 2004. Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. Mol Immunol 41(11):1089-98.

Gasque P, Dean YD, McGreal EP, VanBeek J, Morgan BP. 2000. Complement components of the innate immune system in health and disease in the CNS. Immunopharmacology 49(1-2):171-86.

Gestal C, Pallavicini A, Venier P, Novoa B, Figueras A. 2010. MgC1q, a novel C1q-domain-containing protein involved in the immune response of Mytilus galloprovincialis. Dev Comp Immunol.Epub.

Gloor SM, Weber A, Adachi N, Frei K. 1997. Interleukin-1 modulates protein tyrosine phosphatase activity and permeability of brain endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 239(3):804-9.

Granucci F, Petralia F, Urbano M, Citterio S, Di Tota F, Santambrogio L, Ricciardi-Castagnoli P. 2003. The scavenger receptor MARCO mediates cytoskeleton rearrangements in dendritic cells and microglia. Blood 102(8):2940-7.

Greenhill NS, Ruger BM, Hasan Q, Davis PF. 2000. The alpha1(VIII) and alpha2(VIII) collagen chains form two distinct homotrimeric proteins in vivo. Matrix Biol 19(1):19-28.

Griffin JW. 1990. Basic pathologic processes in the nervous system. Toxicol Pathol 18(1 Pt 2):83-8.

Gutzmer R, Kother B, Zwirner J, Dijkstra D, Purwar R, Wittmann M, Werfel T. 2006. Human plasmacytoid dendritic cells express receptors for anaphylatoxins C3a and C5a and are chemoattracted to C3a and C5a. J Invest Dermatol 126(11):2422-9.

Hanisch UK. 2002. Microglia as a source and target of cytokines. Glia 40(2):140-55.

Hanisch UK, Kettenmann H. 2007. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. Nat Neurosci 10(11):1387-94.

Hao HN, Zhao J, Lotoczky G, Grever WE, Lyman WD. 2001. Induction of human beta-defensin-2 expression in human astrocytes by lipopolysaccharide and cytokines. J Neurochem 77(4):1027-35.

Harris JD, Scott JV, Traynor B, Brahic M, Stowring L, Ventura P, Haase AT, Peluso R. 1981. Visna virus DNA: discovery of a novel gapped structure. Virology 113(2):573-83.

Hayward C, Shu X, Cideciyan AV, Lennon A, Barran P, Zareparsi S, Sawyer L, Hendry G, Dhillon B, Milam AH and others. 2003. Mutation in a short-chain collagen gene, CTRP5, results in extracellular deposit formation in late-onset retinal degeneration: a genetic model for age-related macular degeneration. Hum Mol Genet 12(20):2657-67.

Hayward CP, Hassell JA, Denomme GA, Rachubinski RA, Brown C, Kelton JG. 1995. The cDNA sequence of human endothelial cell multimerin. A unique protein with RGDS, coiled-coil, and epidermal growth factor-like domains and a carboxyl terminus similar to the globular domain of complement C1q and collagens type VIII and X. J Biol Chem 270(31):18246-51.

Heese K, Hock C, Otten U. 1998. Inflammatory signals induce neurotrophin expression in human microglial cells. J Neurochem 70(2):699-707.

Hibino T, Loza-Coll M, Messier C, Majeske AJ, Cohen AH, Terwilliger DP, Buckley KM, Brockton V, Nair SV, Berney K and others. 2006. The immune gene repertoire encoded in the purple sea urchin genome. Dev Biol 300(1):349-65.

Holland LZ, Albalat R, Azumi K, Benito-Gutierrez E, Blow MJ, Bronner-Fraser M, Brunet F, Butts T, Candiani S, Dishaw LJ and others. 2008. The amphioxus genome illuminates vertebrate origins and cephalochordate biology. Genome Res 18(7):1100-11.

© 2011 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

Huang S, Yuan S, Guo L, Yu Y, Li J, Wu T, Liu T, Yang M, Wu K, Liu H and others. 2008. Genomic analysis of the immune gene repertoire of amphioxus reveals extraordinary innate complexity and diversity. Genome Res 18(7):1112-26.

Husemann J, Loike JD, Anankov R, Febbraio M, Silverstein SC. 2002. Scavenger receptors in neurobiology and neuropathology: their role on microglia and other cells of the nervous system. Glia 40(2):195-205.

Huynh HK, Dorovini-Zis K. 1993. Effects of interferon-gamma on primary cultures of human brain microvessel endothelial cells. Am J Pathol 142(4):1265-78.

Jack CS, Arbour N, Manusow J, Montgrain V, Blain M, McCrea E, Shapiro A, Antel JP. 2005. TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. J Immunol 175(7):4320-30.

Jansen JK, Nicholls JG. 1972. Regeneration and changes in synaptic connections between individual nerve cells in the central nervous system of the leech. Proc Natl Acad Sci U S A 69(3):636-9.

Jauneau AC, Ischenko A, Chan P, Fontaine M. 2003. Complement component anaphylatoxins upregulate chemokine expression by human astrocytes. FEBS Lett 537(1-3):17-22.

Jensenius H, Klein DC, van Hecke M, Oosterkamp TH, Schmidt T, Jensenius JC. 2009. Mannan-binding lectin: structure, oligomerization, and flexibility studied by atomic force microscopy. J Mol Biol 391(1):246-59.

Jha BK, Salunke DM, Datta K. 2002. Disulfide bond formation through Cys186 facilitates functionally relevant dimerization of trimeric hyaluronan-binding protein 1 (HABP1)/p32/gC1qR. Eur J Biochem 269(1):298-306.

Jung DY, Lee H, Jung BY, Ock J, Lee MS, Lee WH, Suk K. 2005. TLR4, but not TLR2, signals autoregulatory apoptosis of cultured microglia: a critical role of IFN-beta as a decision maker. J Immunol 174(10):6467-76.

Kielian T. 2004. Microglia and chemokines in infectious diseases of the nervous system: views and reviews. Front Biosci 9:732-50.

Kimura A, Sakaguchi E, Nonaka M. 2009. Multi-component complement system of Cnidaria: C3, Bf, and MASP genes expressed in the endodermal tissues of a sea anemone, Nematostella vectensis. Immunobiology 214(3):165-78.

Kishore U, Gaboriaud C, Waters P, Shrive AK, Greenhough TJ, Reid KB, Sim RB, Arlaud GJ. 2004. C1q and tumor necrosis factor superfamily: modularity and versatility. Trends Immunol 25(10):551-61.

Kishore U, Reid KB. 2000. C1q: structure, function, and receptors. Immunopharmacology 49(1-2):159-70.

Kitamura Y, Takata K, Inden M, Tsuchiya D, Yanagisawa D, Nakata J, Taniguchi T. 2004. Intracerebroventricular injection of microglia protects against focal brain ischemia. J Pharmacol Sci 94(2):203-6.

Klos A, Tenner AJ, Johswich KO, Ager RR, Reis ES, Kohl J. 2009. The role of the anaphylatoxins in health and disease. Mol Immunol 46(14):2753-66.

Köhidai L. 1995. Method for determination of chemoattraction in Tetrahymena pyriformis. Curr Microbiol 30(4):251-3.

Kondo N, Kondo J. 1992. Identification of novel blood proteins specific for mammalian hibernation. J Biol Chem 267(1):473-8.

Kreutzberg GW. 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. Trends Neurosci 19(8):312-8.

Kumar SM, Porterfield DM, Muller KJ, Smith PJ, Sahley CL. 2001. Nerve injury induces a rapid efflux of nitric oxide (NO) detected with a novel NO microsensor. J Neurosci 21(1):215-20.

© 2011 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

Kurtz J, Franz K. 2003. Innate defence: evidence for memory in invertebrate immunity. Nature 425(6953):37-8.

Kuwahara T, Koyama A, Gengyo-Ando K, Masuda M, Kowa H, Tsunoda M, Mitani S, Iwatsubo T. 2006. Familial Parkinson mutant alpha-synuclein causes dopamine neuron dysfunction in transgenic Caenorhabditis elegans. J Biol Chem 281(1):334-40.

Ladeby R, Wirenfeldt M, Garcia-Ovejero D, Fenger C, Dissing-Olesen L, Dalmau I, Finsen B. 2005. Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. Brain Res Brain Res Rev 48(2):196-206.

Lagueux M, Perrodou E, Levashina EA, Capovilla M, Hoffmann JA. 2000. Constitutive expression of a complement-like protein in toll and JAK gain-of-function mutants of Drosophila. Proc Natl Acad Sci U S A 97(21):11427-32.

Larsen PH, Holm TH, Owens T. 2007. Toll-like receptors in brain development and homeostasis. Sci STKE 2007(402):pe47.

Lasser G, Guchhait P, Ellsworth JL, Sheppard P, Lewis K, Bishop P, Cruz MA, Lopez JA, Fruebis J. 2006. C1qTNF-related protein-1 (CTRP-1): a vascular wall protein that inhibits collagen-induced platelet aggregation by blocking VWF binding to collagen. Blood 107(2):423-30.

Lawson LJ, Perry VH, Gordon S. 1992. Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. Neuroscience 48(2):405-15.

Lazzaro BP. 2008. Natural selection on the Drosophila antimicrobial immune system. Curr Opin Microbiol 11(3):284-9.

Lee W, Kim MJ, Park EJ, Choi YJ, Park SY. 2010. C1qTNF-related protein-6 mediates fatty acid oxidation via the activation of the AMP-activated protein kinase. FEBS Lett 584(5):968-72.

Leigh LE, Ghebrehiwet B, Perera TP, Bird IN, Strong P, Kishore U, Reid KB, Eggleton P. 1998. C1q-mediated chemotaxis by human neutrophils: involvement of gClqR and G-protein signalling mechanisms. Biochem J 330 (Pt 1):247-54.

Levashina EA, Moita LF, Blandin S, Vriend G, Lagueux M, Kafatos FC. 2001. Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, Anopheles gambiae. Cell 104(5):709-18.

Levi-Strauss M, Mallat M. 1987. Primary cultures of murine astrocytes produce C3 and factor B, two components of the alternative pathway of complement activation. J Immunol 139(7):2361-6.

Levin ME, Jin JG, Ji RR, Tong J, Pomonis JD, Lavery DJ, Miller SW, Chiang LW. 2008. Complement activation in the peripheral nervous system following the spinal nerve ligation model of neuropathic pain. Pain 137(1):182-201.

Levine S. 1987. Choroid plexus: target for systemic disease and pathway to the brain. Lab Invest 56(3):231-3.

Li M, Peake PW, Charlesworth JA, Tracey DJ, Moalem-Taylor G. 2007. Complement activation contributes to leukocyte recruitment and neuropathic pain following peripheral nerve injury in rats. Eur J Neurosci 26(12):3486-500.

Liang Y, Zhang S, Wang Z. 2009. Alternative complement activity in the egg cytosol of amphioxus Branchiostoma belcheri: evidence for the defense role of maternal complement components. PLoS One 4(1):e4234.

Lim BL, Reid KB, Ghebrehiwet B, Peerschke EI, Leigh LA, Preissner KT. 1996. The binding protein for globular heads of complement C1q, gC1qR. Functional expression and characterization as a novel vitronectin binding factor. J Biol Chem 271(43):26739-44.

Ling EA, Kaur LC, Yick TY, Wong WC. 1990. Immunocytochemical localization of CR3 complement receptors with OX-42 in amoeboid microglia in postnatal rats. Anat Embryol (Berl) 182(5):481-6.

© 2011 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

Little TJ, O'Connor B, Colegrave N, Watt K, Read AF. 2003. Maternal transfer of strain-specific immunity in an invertebrate. Curr Biol 13(6):489-92.

Loeffler DA, Camp DM, Bennett DA. 2008. Plaque complement activation and cognitive loss in Alzheimer's disease. J Neuroinflammation 5:9.

Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM. 2006. The role of inflammation in CNS injury and disease. Br J Pharmacol 147 Suppl 1:S232-40.

Maeda T, Abe M, Kurisu K, Jikko A, Furukawa S. 2001. Molecular cloning and characterization of a novel gene, CORS26, encoding a putative secretory protein and its possible involvement in skeletal development. J Biol Chem 276(5):3628-34.

Masuda-Nakagawa LM, Muller KJ, Nicholls JG. 1990. Accumulation of laminin and microglial cells at sites of injury and regeneration in the central nervous system of the leech. Proc Biol Sci 241(1302):201-6.

Matsushita M, Fujita T. 1996. The lectin pathway. Res Immunol 147(2):115-8.

McGlade-McCulloh E, Morrissey AM, Norona F, Muller KJ. 1989. Individual microglia move rapidly and directly to nerve lesions in the leech central nervous system. Proc Natl Acad Sci U S A 86(3):1093-7.

Minagar A, Carpenter A, Alexander JS. 2007. The destructive alliance: interactions of leukocytes, cerebral endothelial cells, and the immune cascade in pathogenesis of multiple sclerosis. Int Rev Neurobiol 79:1-11.

Mittelbronn M, Dietz K, Schluesener HJ, Meyermann R. 2001. Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude. Acta Neuropathol 101(3):249-55.

Morgese VJ, Elliott EJ, Muller KJ. 1983. Microglial movement to sites of nerve lesion in the leech CNS. Brain Res 272(1):166-70.

Mueller CA, Schluesener HJ, Conrad S, Meyermann R, Schwab JM. 2003. Lesional expression of a proinflammatory and antiangiogenic cytokine EMAP II confined to endothelium and microglia/macrophages during secondary damage following experimental traumatic brain injury. J Neuroimmunol 135(1-2):1-9.

Mukhopadhyay S, Gordon S. 2004. The role of scavenger receptors in pathogen recognition and innate immunity. Immunobiology 209(1-2):39-49.

Muller KJ, Scott SA. 1981. Transmission at a 'direct' electrical connexion mediated by an interneurone in the leech. J Physiol 311:565-83.

Murphy FA. 1977. Rabies pathogenesis. Arch Virol 54(4):279-97.

Myer DJ, Gurkoff GG, Lee SM, Hovda DA, Sofroniew MV. 2006. Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury. Brain 129(Pt 10):2761-72.

Nakajima K, Honda S, Tohyama Y, Imai Y, Kohsaka S, Kurihara T. 2001. Neurotrophin secretion from cultured microglia. J Neurosci Res 65(4):322-31.

Nakamura Y. 2002. Regulating factors for microglial activation. Biol Pharm Bull 25(8):945-53.

Nakamura Y, Si QS, Kataoka K. 1999. Lipopolysaccharide-induced microglial activation in culture: temporal profiles of morphological change and release of cytokines and nitric oxide. Neurosci Res 35(2):95-100.

Nauta AJ, Trouw LA, Daha MR, Tijsma O, Nieuwland R, Schwaeble WJ, Gingras AR, Mantovani A, Hack EC, Roos A. 2002. Direct binding of C1q to apoptotic cells and cell blebs induces complement activation. Eur J Immunol 32(6):1726-36.

Ngu EM, Sahley CL, Muller KJ. 2007. Reduced axon sprouting after treatment that diminishes microglia accumulation at lesions in the leech CNS. J Comp Neurol 503(1):101-109.

Nicholls JG, Baylor DA. 1968. Specific modalities and receptive fields of sensory neurons in CNS of the leech. J Neurophysiol 31(5):740-56.

© 2011 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. Science 308(5726):1314-8.

Nissl F. 1899. Uber einige Beziehungen zwischen Nervenzellenerkrankungen und gliosen Erscheinungen bei verschiedenen Psychosen. . Arch Psychiatr Nervenkr 32:656-76.

Nonaka M, Kimura A. 2006. Genomic view of the evolution of the complement system. Immunogenetics 58(9):701-13.

Nonaka M, Yoshizaki F. 2004. Primitive complement system of invertebrates. Immunol Rev 198:203-15.

Olson JK, Miller SD. 2004. Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. J Immunol 173(6):3916-24.

Pachter JS, de Vries HE, Fabry Z. 2003. The blood-brain barrier and its role in immune privilege in the central nervous system. J Neuropathol Exp Neurol 62(6):593-604.

Pahler S, Krasko A, Schutze J, Muller IM, Muller WE. 1998. Isolation and characterization of a cDNA encoding a potential morphogen from the marine sponge Geodia cydonium that is conserved in higher metazoans. Proc Biol Sci 265(1394):421-5.

Paidassi H, Tacnet-Delorme P, Garlatti V, Darnault C, Ghebrehiwet B, Gaboriaud C, Arlaud GJ, Frachet P. 2008. C1q binds phosphatidylserine and likely acts as a multiligand-bridging molecule in apoptotic cell recognition. J Immunol 180(4):2329-38.

Pang Z, Zuo J, Morgan JI. 2000. Cbln3, a novel member of the precerebellin family that binds specifically to Cbln1. J Neurosci 20(17):6333-9.

Peiser L, Mukhopadhyay S, Gordon S. 2002. Scavenger receptors in innate immunity. Curr Opin Immunol 14(1):123-8.

Pekny M, Wilhelmsson U, Bogestal YR, Pekna M. 2007. The role of astrocytes and complement system in neural plasticity. Int Rev Neurobiol 82:95-111.

Pennell NA, Streit WJ. 1997. Colonization of neural allografts by host microglial cells: relationship to graft neovascularization. Cell Transplant 6(3):221-30.

Perry VH, Nicoll JA, Holmes C. 2010. Microglia in neurodegenerative disease. Nat Rev Neurol 6(4):193-201.

Piehl F, Lidman O. 2001. Neuroinflammation in the rat--CNS cells and their role in the regulation of immune reactions. Immunol Rev 184:212-25.

Poirier J. 1976. La barriere hémato-encéphalique. Données morpho- fonctionnelles. publication hoechst Inc:51 p.

Polazzi E, Contestabile A. 2002. Reciprocal interactions between microglia and neurons: from survival to neuropathology. Rev Neurosci 13(3):221-42.

Polfliet MM, van de Veerdonk F, Dopp EA, van Kesteren-Hendrikx EM, van Rooijen N, Dijkstra CD, van den Berg TK. 2002. The role of perivascular and meningeal macrophages in experimental allergic encephalomyelitis. J Neuroimmunol 122(1-2):1-8.

Polfliet MM, Zwijnenburg PJ, van Furth AM, van der Poll T, Dopp EA, Renardel de Lavalette C, van Kesteren-Hendrikx EM, van Rooijen N, Dijkstra CD, van den Berg TK. 2001. Meningeal and perivascular macrophages of the central nervous system play a protective role during bacterial meningitis. J Immunol 167(8):4644-50.

Ponomarev ED, Novikova M, Maresz K, Shriver LP, Dittel BN. 2005. Development of a culture system that supports adult microglial cell proliferation and maintenance in the resting state. J Immunol Methods 300(1-2):32-46.

Ponomarev ED, Shriver LP, Dittel BN. 2006. CD40 expression by microglial cells is required for their completion of a two-step activation process during central nervous system autoimmune inflammation. J Immunol 176(3):1402-10.

© 2011 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

Prado-Alvarez M, Rotllant J, Gestal C, Novoa B, Figueras A. 2009. Characterization of a C3 and a factor B-like in the carpet-shell clam, Ruditapes decussatus. Fish Shellfish Immunol 26(2):305-15.

Qin B, Cartier L, Dubois-Dauphin M, Li B, Serrander L, Krause KH. 2006. A key role for the microglial NADPH oxidase in APP-dependent killing of neurons. Neurobiol Aging 27(11):1577-87.

Rabchevsky AG, Streit WJ. 1997. Grafting of cultured microglial cells into the lesioned spinal cord of adult rats enhances neurite outgrowth. J Neurosci Res 47(1):34-48.

Raich WB, Moorman C, Lacefield CO, Lehrer J, Bartsch D, Plasterk RH, Kandel ER, Hobert O. 2003. Characterization of Caenorhabditis elegans homologs of the Down syndrome candidate gene DYRK1A. Genetics 163(2):571-80.

Ramaglia V, Daha MR, Baas F. 2008. The complement system in the peripheral nerve: friend or foe? Mol Immunol 45(15):3865-77.

Rambach G, Wurzner R, Speth C. 2008. Complement: an efficient sword of innate immunity. Contrib Microbiol 15:78-100.

Re F, Belyanskaya SL, Riese RJ, Cipriani B, Fischer FR, Granucci F, Ricciardi-Castagnoli P, Brosnan C, Stern LJ, Strominger JL and others. 2002. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces an expression program in neonatal microglia that primes them for antigen presentation. J Immunol 169(5):2264-73.

Reichert F, Rotshenker S. 2003. Complement-receptor-3 and scavenger-receptor-AI/II mediated myelin phagocytosis in microglia and macrophages. Neurobiol Dis 12(1):65-72.

Rezaie P, Male D. 1997. Expression of adhesion molecules on human foetal cerebral vessels: relationship to colonisation by microglial precursors. Biochem Soc Trans 25(2):170S.

Ring A, Weiser JN, Tuomanen EI. 1998. Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. Molecular analysis of a novel bidirectional pathway. J Clin Invest 102(2):347-60.

Robertson W. 1900. A microscopic demonstration of the normal and pathological histology of mesoglia cells. J Ment Sci 46:733-52.

Rock RB, Peterson PK. 2006. Microglia as a pharmacological target in infectious and inflammatory diseases of the brain. J Neuroimmune Pharmacol 1(2):117-26.

Rogers J, Strohmeyer R, Kovelowski CJ, Li R. 2002. Microglia and inflammatory mechanisms in the clearance of amyloid beta peptide. Glia 40(2):260-9.

Rotshenker S. 2003. Microglia and macrophage activation and the regulation of complement-receptor-3 (CR3/MAC-1)-mediated myelin phagocytosis in injury and disease. J Mol Neurosci 21(1):65-72.

Rupprecht TA, Angele B, Klein M, Heesemann J, Pfister HW, Botto M, Koedel U. 2007. Complement C1q and C3 are critical for the innate immune response to Streptococcus pneumoniae in the central nervous system. J Immunol 178(3):1861-9.

Rus H, Cudrici C, Niculescu F, Shin ML. 2006. Complement activation in autoimmune demyelination: dual role in neuroinflammation and neuroprotection. J Neuroimmunol 180(1-2):9-16.

Sarchielli P, Orlacchio A, Vicinanza F, Pelliccioli GP, Tognoloni M, Saccardi C, Gallai V. 1997. Cytokine secretion and nitric oxide production by mononuclear cells of patients with multiple sclerosis. J Neuroimmunol 80(1-2):76-86.

Sawyer RT. 2000. Johann Friedrich Dieffenbach: successful use of leeches in plastic surgery in the 1820s. Br J Plast Surg 53(3):245-7.

Schaffler A, Ehling A, Neumann E, Herfarth H, Tarner I, Gay S, Scholmerich J, Muller-Ladner U. 2003. Genomic organization, chromosomal localization and adipocytic

© 2011 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

expression of the murine gene for CORS-26 (collagenous repeat-containing sequence of 26 kDa protein). Biochim Biophys Acta 1628(1):64-70.
Schaffler A, Scholmerich J, Salzberger B. 2007. Adipose tissue as an immunological organ: Toll-like receptors, C1q/TNFs and CTRPs. Trends Immunol 28(9):393-9.
Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. 1995. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. J Biol Chem 270(45):26746-9.
Schikorski D, Cuvillier-Hot V, Boidin-Wichlacz C, Slomianny C, Salzet M, Tasiemski A. 2009. Deciphering the immune function and regulation by a TLR of the cytokine EMAPII in the lesioned central nervous system using a leech model. J Immunol 183(11):7119-28.
Schilling M, Besselmann M, Leonhard C, Mueller M, Ringelstein EB, Kiefer R. 2003. Microglial activation precedes and predominates over macrophage infiltration in transient focal cerebral ischemia: a study in green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. Exp Neurol 183(1):25-33.
Schlitt M. 1991. Pathogenesis and pathophysiology of viral infections of the central nervous system.
Schluesener HJ, Seid K, Kretzschmar J, Meyermann R. 1996. Leukocyte chemotactic factor, a natural ligand to CD4, is expressed by lymphocytes and microglial cells of the MS plaque. J Neurosci Res 44(6):606-11.
Schulenburg H, Boehnisch C, Michiels NK. 2007. How do invertebrates generate a highly specific innate immune response? Mol Immunol 44(13):3338-44.
Seytter T, Lottspeich F, Neupert W, Schwarz E. 1998. Mam33p, an oligomeric, acidic protein in the mitochondrial matrix of Saccharomyces cerevisiae is related to the human complement receptor gC1q-R. Yeast 14(4):303-10.
Shafer OT, Chen A, Kumar SM, Muller KJ, Sahley CL. 1998. Injury-induced expression of endothelial nitric oxide synthase by glial and microglial cells in the leech central nervous system within minutes after injury. Proc Biol Sci 265(1411):2171-5.
Shu X, Tulloch B, Lennon A, Vlachantoni D, Zhou X, Hayward C, Wright AF. 2006. Disease mechanisms in late-onset retinal macular degeneration associated with mutation in C1QTNF5. Hum Mol Genet 15(10):1680-9.
Silva GC, Nagib PR, Chiari E, van Rooijen N, Machado CR, Camargos ER. 2004. Peripheral macrophage depletion reduces central nervous system parasitism and damage in Trypanosoma cruzi-infected suckling rats. J Neuroimmunol 149(1-2):50-8.
Skundric DS, Cai J, Cruikshank WW, Gveric D. 2006. Production of IL-16 correlates with CD4+ Th1 inflammation and phosphorylation of axonal cytoskeleton in multiple sclerosis lesions. J Neuroinflammation 3:13.
Skundric DS, Dai R, Zakarian VL, Bessert D, Skoff RP, Cruikshank WW, Kurjakovic Z. 2005a. Anti-IL-16 therapy reduces CD4+ T-cell infiltration and improves paralysis and histopathology of relapsing EAE. J Neurosci Res 79(5):680-93.
Skundric DS, Zhou W, Cruikshank WW, Dai R. 2005b. Increased levels of bioactive IL-16 correlate with disease activity during relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). J Autoimmun 25(3):206-14.
Smith ME. 2001. Phagocytic properties of microglia in vitro: implications for a role in multiple sclerosis and EAE. Microsc Res Tech 54(2):81-94.
Soilu-Hanninen M, Eralinna JP, Hukkanen V, Roytta M, Salmi AA, Salonen R. 1994. Semliki Forest virus infects mouse brain endothelial cells and causes blood-brain barrier damage. J Virol 68(10):6291-8.
Sonetti D, Ottaviani E, Bianchi F, Rodriguez M, Stefano ML, Scharrer B, Stefano GB. 1994. Microglia in invertebrate ganglia. Proc Natl Acad Sci U S A 91(19):9180-4.

© 2011 Tous droits réservés.
http://doc.univ-lille1.fr

Speth C, Dierich MP, Gasque P. 2002. Neuroinvasion by pathogens: a key role of the complement system. Mol Immunol 38(9):669-79.

Stern M, Bicker G. 2008. Nitric oxide regulates axonal regeneration in an insect embryonic CNS. Dev Neurobiol 68(3):295-308.

Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, Nouri N, Micheva KD, Mehalow AK, Huberman AD, Stafford B and others. 2007. The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. Cell 131(6):1164-78.

Stins MF, Badger J, Sik Kim K. 2001. Bacterial invasion and transcytosis in transfected human brain microvascular endothelial cells. Microb Pathog 30(1):19-28.

Streit WJ. 2006. Microglial senescence: does the brain's immune system have an expiration date? Trends Neurosci 29(9):506-10.

Streit WJ, Kreutzberg GW. 1987. Lectin binding by resting and reactive microglia. J Neurocytol 16(2):249-60.

Streit WJ, Walter SA, Pennell NA. 1999. Reactive microgliosis. Prog Neurobiol 57(6):563-81.

Suzuki MM, Satoh N, Nonaka M. 2002. C6-like and C3-like molecules from the cephalochordate, amphioxus, suggest a cytolytic complement system in invertebrates. J Mol Evol 54(5):671-9.

Tacnet-Delorme P, Chevallier S, Arlaud GJ. 2001. Beta-amyloid fibrils activate the C1 complex of complement under physiological conditions: evidence for a binding site for A beta on the C1q globular regions. J Immunol 167(11):6374-81.

Tahtouh M, Croq F, Lefebvre C, Pestel J. 2009a. Is complement good, bad, or both? New functions of the complement factors associated with inflammation mechanisms in the central nervous system. Eur Cytokine Netw 20(3):95-100.

Tahtouh M, Croq F, Vizioli J, Sautiere PE, Van Camp C, Salzet M, Daha MR, Pestel J, Lefebvre C. 2009b. Evidence for a novel chemotactic C1q domain-containing factor in the leech nerve cord. Mol Immunol 46(4):523-31.

Takabayashi T, Shimizu S, Clark BD, Beinborn M, Burke JF, Gelfand JA. 2004. Interleukin-1 upregulates anaphylatoxin receptors on mononuclear cells. Surgery 135(5):544-54.

Takamatsu N, Ohba K, Kondo J, Kondo N, Shiba T. 1993. Hibernation-associated gene regulation of plasma proteins with a collagen-like domain in mammalian hibernators. Mol Cell Biol 13(3):1516-21.

Takasugi N, Takahashi Y, Morohashi Y, Tomita T, Iwatsubo T. 2002. The mechanism of gamma-secretase activities through high molecular weight complex formation of presenilins is conserved in Drosophila melanogaster and mammals. J Biol Chem 277(51):50198-205.

Thomas WE. 1999. Brain macrophages: on the role of pericytes and perivascular cells. Brain Res Brain Res Rev 31(1):42-57.

Trendelenburg M. 2005. Antibodies against C1q in patients with systemic lupus erythematosus. Springer Semin Immunopathol 27(3):276-85.

Trouw LA, Blom AM, Gasque P. 2008. Role of complement and complement regulators in the removal of apoptotic cells. Mol Immunol 45(5):1199-207.

Urade Y, Oberdick J, Molinar-Rode R, Morgan JI. 1991. Precerebellin is a cerebellum-specific protein with similarity to the globular domain of complement C1q B chain. Proc Natl Acad Sci U S A 88(3):1069-73.

van Beek J, Elward K, Gasque P. 2003. Activation of complement in the central nervous system: roles in neurodegeneration and neuroprotection. Ann N Y Acad Sci 992:56-71.

Veerhuis R, Janssen I, De Groot CJ, Van Muiswinkel FL, Hack CE, Eikelenboom P. 1999. Cytokines associated with amyloid plaques in Alzheimer's disease brain stimulate

© 2011 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

human glial and neuronal cell cultures to secrete early complement proteins, but not C1-inhibitor. Exp Neurol 160(1):289-99.

Veerhuis R, Van Breemen MJ, Hoozemans JM, Morbin M, Ouladhadj J, Tagliavini F, Eikelenboom P. 2003. Amyloid beta plaque-associated proteins C1q and SAP enhance the Abeta1-42 peptide-induced cytokine secretion by adult human microglia in vitro. Acta Neuropathol 105(2):135-44.

Vegh Z, Kew RR, Gruber BL, Ghebrehiwet B. 2006. Chemotaxis of human monocyte-derived dendritic cells to complement component C1q is mediated by the receptors gC1qR and cC1qR. Mol Immunol 43(9):1402-7.

Vergote D, Macagno ER, Salzet M, Sautiere PE. 2006. Proteome modifications of the medicinal leech nervous system under bacterial challenge. Proteomics 6(17):4817-25.

von Bernhardi R, Muller KJ. 1995. Repair of the central nervous system: lessons from lesions in leeches. J Neurobiol 27(3):353-66.

Walker PR, Calzascia T, Schnuriger V, Scamuffa N, Saas P, de Tribolet N, Dietrich PY. 2000. The brain parenchyma is permissive for full antitumor CTL effector function, even in the absence of CD4 T cells. J Immunol 165(6):3128-35.

Walters ET, Moroz LL. 2009. Molluscan memory of injury: evolutionary insights into chronic pain and neurological disorders. Brain Behav Evol 74(3):206-18.

Webster SD, Galvan MD, Ferran E, Garzon-Rodriguez W, Glabe CG, Tenner AJ. 2001. Antibody-mediated phagocytosis of the amyloid beta-peptide in microglia is differentially modulated by C1q. J Immunol 166(12):7496-503.

Webster SD, Yang AJ, Margol L, Garzon-Rodriguez W, Glabe CG, Tenner AJ. 2000. Complement component C1q modulates the phagocytosis of Abeta by microglia. Exp Neurol 161(1):127-38.

Xu Y, Bolton B, Zipser B, Jellies J, Johansen KM, Johansen J. 1999. Gliarin and macrolin, two novel intermediate filament proteins specifically expressed in sets and subsets of glial cells in leech central nervous system. J Neurobiol 40(2):244-53.

Zipfel PF, Skerka C. 2009. Complement regulators and inhibitory proteins. Nat Rev Immunol 9(10):729-40.

Yamaguchi N, Benya PD, van der Rest M, Ninomiya Y. 1989. The cloning and sequencing of alpha 1(VIII) collagen cDNAs demonstrate that type VIII collagen is a short chain collagen and contains triple-helical and carboxyl-terminal non-triple-helical domains similar to those of type X collagen. J Biol Chem 264(27):16022-9.

Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N and others. 2001. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. Nat Med 7(8):941-6.

Yokota T, Oritani K, Takahashi I, Ishikawa J, Matsuyama A, Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Tenner AJ, Tomiyama Y and others. 2000. Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. Blood 96(5):1723-32.

Yu Y, Huang H, Wang Y, Yu Y, Yuan S, Huang S, Pan M, Feng K, Xu A. 2008. A novel C1q family member of amphioxus was revealed to have a partial function of vertebrate C1q molecule. J Immunol 181(10):7024-32.

Yuzaki M. 2008. Cbln and C1q family proteins - New transneuronal cytokines. Cell Mol Life Sci.

Zhang Y, Chen Q. 1999. The noncollagenous domain 1 of type X collagen. A novel motif for trimer and higher order multimer formation without a triple helix. J Biol Chem 274(32):22409-13.

© 2011 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

Zhang Y, Kornfeld H, Cruikshank WW, Kim S, Reardon CC, Center DM. 2001. Nuclear translocation of the N-terminal prodomain of interleukin-16. J Biol Chem 276(2):1299-303.

Zhu Y, Thangamani S, Ho B, Ding JL. 2005. The ancient origin of the complement system. Embo J 24(2):382-94.

Zietlow R, Dunnett SB, Fawcett JW. 1999. The effect of microglia on embryonic dopaminergic neuronal survival in vitro: diffusible signals from neurons and glia change microglia from neurotoxic to neuroprotective. Eur J Neurosci 11(5):1657-67.

Zipfel PF, Skerka C. 2009. Complement regulators and inhibitory proteins. Nat Rev Immunol 9(10):729-40.

Zugasti O, Ewbank JJ. 2009. Neuroimmune regulation of antimicrobial peptide expression by a noncanonical TGF-beta signaling pathway in Caenorhabditis elegans epidermis. Nat Immunol 10(3):249-56.

© 2011 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

© 2011 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr

Résumé

Le système nerveux des invertébrés présente des caractéristiques fonctionnelles différentes de celles des vertébrés. Chez la sangsue la *Hirudo medicinalis*, modèle d'étude privilégié en neurobiologie, une réparation efficace de la chaîne nerveuse est possible après lésion. Ce processus physiologique nécessite la mobilisation des cellules microgliales présentes au sein au système nerveux de la sangsue et rappelle certaines phases d'une réaction inflammatoire.

Une recherche des effecteurs moléculaires impliqués dans ce recrutement cellulaire a été entreprise. Une protéine homologue au facteur du complément humain C1q, nommée *Hm*C1q, a été caractérisée et a été montrée comme impliquée dans le phénomène d'accumulation précoce de la microglie. En effet, constitutivement exprimée au sein des neurones, *Hm*C1q s'accumule directement au niveau de la lésion du connectif et a été démontrée capable d'augmenter le recrutement d'une sous-population de cellules microgliales en réponse à la lésion. *Hm*C1q se comporte ainsi comme une cytokine à activité chimioattractante. La production d'une forme recombinante en levure de type *Pichia pastoris* a permis ensuite de préciser les modalités d'action de ce nouveau facteur chimiotactique, fortement actif au sein du système nerveux de la sangsue. Les expériences de cytométrie en flux, d'immunopréciptation et de chimiotactisme réalisées avec un anticorps anti-gC1qR plaident pour l'existence d'une structure réceptrice homologue au gC1qR des vertébrés sur la sous-population réactive à *Hm*C1q.

Par ce travail, il a été mis en évidence, pour la première fois dans le SNC d'un invertébré, l'existence d'une « nouvelle cytokine » *Hm*C1q, ayant une homologie avec la protéine C1q des vertébrés, mais également faisant partie de la vaste famille des cytokines C1q-TNF. Les résultats originaux obtenus suggèrent que *Hm*C1q puisse avoir un rôle-clé dans le dialogue neurone-glie nécessaire au maintien de l'intégrité du système nerveux.

Summary

The nervous system of invertebrates has functional characteristics different from those of vertebrates. In the leech *Hirudo medicinalis*, a well recognized model in neurobiology, the nerve cord repair might be effective after injury. This physiological process requires the mobilization of microglial cells present in the leech nervous system and seems to mimic some key-phases of an inflammatory reaction.

A search of the molecular effectors involved in this cell recruitment was undertaken. A protein homologous to human complement factor C1q, named *Hm*C1q, was characterized and was shown to be involved in the early accumulation of microglia. Indeed, constitutively expressed in neurons, *Hm*C1q is directly expressed on the cut end of the connective and, in response to the injury, has been shown to increase the recruitment of a subpopulation of microglial cells. Thus *Hm*C1q behaves as a chemoattractant cytokine. The production of its recombinant form in the yeast *Pichia pastoris* enabled us to specify the molecular mechanisms by which this new chemoattractant might be highly active in the leech nervous system. The experiments carried out by flow cytometry, immunopreciptation and in chemotaxis analysis that were performed with an anti-gC1qR argue for the existence of a leech molecule homologous to human gC1qR at the surface microglial cell subpopulation reactive to *Hm*C1q.

By this work, it was shown, for the first time in the CNS of an invertebrate, the existence of a « new cytokine » *Hm*C1q, homologous to the vertebrate protein C1q, but also belonging to great C1q-TNF cytokine family. Finally the present original results suggest that *Hm*C1q may have a key role in neuron-glia dialogue that is essential to maintain the integrity of the nervous system.

© 2011 Tous droits réservés.

http://doc.univ-lille1.fr