UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTÉ

THÈSE DE DOCTORAT

Présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences de l'Université de Lille des Sciences et Technologies

par

ANNELISE BOCQUET-GARÇON

Modalités de recrutement des cellules microgliales dans le système nerveux central lésé chez la sangsue *Hirudo medicinalis*

Co-dirigée par M. Pierre-Éric SAUTIÈRE et M. Christophe LEFEBVRE

Soutenue le 14 Décembre 2012

Membres du jury

Rapporteurs: Michel VERVOORT, Professeur

David COMMUNI, Chercheur FNRS (Belgique)

Examinateurs: Dasa CIZKOVA, Professeur

Michel SALZET, Professeur

Christophe LEFEBVRE, Maître de conférences (Co-encadrant de Thèse)

Pierre-Eric SAUTIÈRE, Maître de conférences (Directeur de thèse)

À mon mari, mon pilier, ma bulle, mon oxygène.... À Mamina, Papounet et mon Frérot... Merci d'éclairer ma vie au quotidien!

À trois chers amis:

Grand Loup (alias Lionel Genetelli), merci de croire en moi!

À Kiki (alias Christelle Van Camp) et Ninouflette (alias Annie Desmons)... Merci les filles de m'avoir supportée tout au long de cette thèse...

Remerciements

Je tiens à remercier en tout premier lieu le Docteur Pierre-Éric Sautière et le Docteur Christophe Lefebvre. Je ne vous remercierai jamais assez de m'avoir guidée, encadrée, écoutée et endurée également, tout au long de ces trois années de thèse.

Je remercie chaleureusement le Professeur Michel Salzet, directeur du laboratoire EA4550, de m'avoir accueillie au sein de l'unité et de m'avoir ouvert certains horizons professionnels.

Je remercie Messieurs Vervoort et Communi de m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse. Merci également aux autres membres du jury qui se sont intéressés à mon travail.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Madame Françoise Croq, à Monsieur Jacopo Vizioli et à Monsieur Franck Rodet. Merci pour tous nos échanges scientifiques, pour nos débats souvent intenses.

Je tiens tout particulièrement à remercier Madame Fournier Isabelle et Messieurs Maxence Wisztorski et Julien Franck pour leurs conseils et le temps qu'ils m'ont accordé.

Je tiens à remercier tout particulièrement Madame Christelle Van Camp et Madame Annie Desmons pour leur soutien tant technique que moral. Merci de m'avoir supportée pendant trois longues années. Je remercie tous les étudiants avec lesquels j'ai travaillé et qui, je l'espère, se reconnaîtront. Je remercie également toutes les personnes extérieures au laboratoire qui m'ont apporté leur aide ou leurs conseils. Lucie, Elodie, Véronique, Lucie, Céline, Alain, Matthieu, Francisco et bien d'autre encore... Je vous remercie tous.

Modalités de recrutement des cellules microgliales dans le système nerveux central lésé chez la sangsue *Hirudo medicinalis*.

La sangsue médicinale possède la capacité à régénérer efficacement son système nerveux central (SNC) à la suite d'une lesion. L'un des premiers phénomènes, considéré aujourd'hui comme essentiel à la réparation du système nerveux de la sangsue, est le recrutement et l'accumulation des cellules microgliales au niveau du site endommagé. Aussi, les premières expériences de chimiotactisme menées au sein du laboratoire ont montré que le milieu conditionné (MC), milieu ayant incubé des chaînes nerveuses lésées pendant 24 heures, recrute les cellules microgliales. L'analyse de ce milieu a permis de détecter deux facteurs chimiotatractants, *Hm*IL-16 et *Hm*C1q, deux molécules analogues à l'IL-16 et au C1q humains.

Suite à la caractérisation de la pro-*Hm*IL-16, nous avons démontré que l'extrémité C-terminale de ce précurseur possède de fortes homologies avec la forme active de l'IL-16 humaine, une cytokine de 12 kDa. Chez l'Homme, l'IL-16, également appelée LCF, recrute les lymphocytes T CD4+ et les macrophages. Par ailleurs, synthétisée dans un premier temps sous forme de deux précurseurs, la cytokine humaine est libérée dans le milieu extracellulaire suite à une maturation par clivage enzymatique, puis se multimérise afin d'exercer une activité chimioattractant optimale sur ces cellules cibles en se liant à son récepteur, le CD4.

Les premiers tests *in vitro* ont montré (i) que la cytokine humaine recrute les cellules microgliales de sangsue et (ii) que les cellules CD4+ humaines migrent en réponse à un gradient d'*Hm*IL-16. Aussi, la pré-incubation de la microglie de sangsue soit avec l'anticorps anti-IL-16 humaine soit avec l'anticorps anti-*Hm*IL-16 réduit significativement le nombre de cellules recrutées par le MC. L'ensemble de ces résultats, obtenus suite à des expériences *in vitro*, suggère fortement la conservation d'une interaction fonctionnelle IL-16/CD4 dans le SNC de la sangsue. Afin de confirmer cette hypothèse, une stratégie de purification par affinité du récepteur d'*Hm*IL-16 a été entreprise, suivie d'une caractérisation par spectrométrie de masse.

Dans un second temps, *Hm*C1q, molécule de sangsue homologue au C1q humain, a été identifiée dans le SNC de la sangsue. La protéine recombinante, r*Hm*C1q, a été produite chez la levure *Pichia pastoris* afin d'étudier les propriétés d'*Hm*C1q et de chercher ses récepteurs potentiels à la surface des cellules microgliales de sangsue. Ainsi, l'activité chimioattractante dose-dépendante de *rHm*C1q, sur la microglie de sangsue, a été mise en évidence dans des expériences *in vitro* et *ex vivo*. D'ailleurs, le recrutement médié par le recombinant est significativement inhibé quand les cellules microgliales sont préincubées avec soit l'anticorps anti-*Hm*C1q, soit les anticorps anti-gC1qR ou anti-cC1qR humains. Or, chez l'Homme, le gC1qR (également nommé C1qBP) interagit avec le domaine globulaire du C1q et le cC1qR (ou calréticuline) se lie au domaine collagène de ce facteur. De manière intéressante, des protéines analogues aux g- et c-C1qR humains, *Hm*C1qBP et *Hm*cC1qR, ont été caractérisées suite à l'analyse des banques normalisées EST, construites à partir d'ARN totaux de systèmes nerveux de sangsues adultes. Afin de démontrer l'implication de ces récepteurs dans le recrutement microglial induit par *Hm*C1q, des expériences d'hybridation *in situ*, d'immunohistochimie et de chimiotactisme ont été réalisées. Enfin, une stratégie de purification par affinité, en utilisant le C1q humain, a permis de montrer son interaction avec les deux récepteurs.

Le travail de thèse consiste à étudier les interactions moléculaires impliquées dans les processus de recrutement des cellules microgliales, intervenant à la suite d'une lésion du système nerveux de la sangsue. Les données acquises permettent de saisir les premiers mécanismes de la réponse microgliale, essentielle dans la réparation du SNC chez la sangsue *H. medicinalis*.

The recruitment properties of the microglial cells in injured central nervous system of the leech *Hirudo medicinalis*.

The leech, *Hirudo medicinalis*, has the capacity to regenerate its nervous system following injury. Thus, this model offers opportunities to study the molecular and cellular basis of the CNS repair mechanisms. After damage, the microglial cells migrate and accumulate at the lesion site, and this phenomenon is essential for the CNS repair. The first experiments carried out in our laboratory showed that the leech CNS conditioned medium (leech CM), medium in which crushed nerve cords dissected out were incubated during 24 hours, has a chemoattractant activity on the microglial cells *in vitro*. Leech conditioned medium analysis revealed the presence of chemoattractant factors, *Hm*IL-16 and *Hm*C1q, two molecules which are homologous of mammalian IL-16 and C1q.

The pro-*Hm*IL-16 characterization showed that its C-terminal side possesses significant homology of its amino acid sequence to the human IL-16 active form, a 12kDa cytokine. The human cytokine, also called LCF, can recruit CD4+ T cells and macrophages. The CD4 receptor is the natural ligand of the cytokine which is initially produced as large precursor proteins having two known major isoforms. The functional activity of mature IL-16 on CD4+ T cells is better by forming multimers and optimal by homo-tetramerization.

The results demonstrated that (i) human IL-16 active form recruits leech microglial cells (ii) *Hm*IL-16 can exert a chemotactic activity on human CD4+ T cells. Pre-incubation of leech microglia either with an anti-human IL-16 or with anti-*Hm*IL-16 antibodies highly reduced the leech CM-mediated microglia migration. Taken together, the *in vitro* assays suggest the conservation of functional IL-16/CD4 interaction in leech. To confirm this hypothesis, the affinity purification using *Hm*IL-16 demonstrated the interaction with a CD4-related protein in leech CNS.

In a second part, *Hm*C1q, a human C1q homologous, was identified in the leech CNS. The recombinant protein (r*Hm*C1q) was produced in the yeast *Pichia Pastoris* in order to investigate its functional properties and to characterize a potential specific receptor on leech microglial cells. Thus, the microglial cells migration showed a dose-dependent activity of r*Hm*C1q. This migration was significantly inhibited by using anti-*Hm*C1q antibody. The globular C1q-binding protein (gC1qR, also called C1qBP) which interacts with the globular heads of human C1q has been characterized and showed to participate in *Hm*C1q-mediated chemotaxis in leech microglial cells. Moreover, in mammals, the collagen tail of C1q appeared to mediate chemotaxis via a receptor called cC1qR. A cC1qR"related sequence was found in leech CNS. The *in vitro* chemotactic assays demonstrated the interaction between *Hm*C1q and *Hm*C1qR.

The presented work specifies the molecular processes which are involved in the microglial recruitment following lesions in the leech CNS. The data could help to understand the early phase of this response leading to a complete and functional CNS repair in the leech.

SOMMAIRE

A١	/Al	NT-PR	OPOS	16
IN	TR	ODUC	TION	21
I.	<u>L'</u> du ve	impact c u Systè ertébrés	<u>le la réponse inflammatoire sur l'intégrité me Nerveux Central (SNC) chez les</u>	22
	А.	La struc	ture du SNC des mammifères	22
		1.	Description et composition du SNC	22
		2.	Description de la barrière hémato-encéphalique	23
		3.	Les cellules microgliales chez les vertébrés	26
			a. L'origine des cellules microgliales	26
			b. Les cellules microgliales ramifiées	29
			c. Les sous-populations de cellules microgliales	29
			d. Les cellules microgliales activées	31
			e. Les cellules microgliales sénescentes	31
	B.	Influenc	e des cellules immunitaires dans les	
		patholo	gies neuro-dégénératives	33
		1.	Perturbations de la BHE	33
		2.	Les rôles des cellules microgliales activées et des cellules immunitaires infiltrées dans le SNC	35
			a. La phagocytose	35
			b. La production de monoxyde d'azote (NO)	37
			c. Le rôle immuno-modulateur des cellules microglial	es38
	C.	Activatio	on des cellules microgliales	40
		1.	En cas de dysfonctionnement ou de lésions	
			neuronales	41
			a. Les récepteurs aux neurotransmetteurs	41

		b. Les interactions CD200-CD200R et CX3CL1-	CX3CR143
	2.	En cas d'infections ou en présence d'agents potentiellement toxiques	44
		a. Les récepteurs d'épuration	44
		b. Les récepteurs de la famille Toll	45
		c. Les molécules du complément	46
	3.	Activation microgliale via les cytokines	47
		a. Les chemokines	48
		b. Le TNF-α et l'IFN-γ	49
		c. Les interleukines	50
II. <u>Le</u>	es phéno	omènes de réparation nerveuse chez l	<u>a</u>
<u>Sä</u>	angsue, <i>F</i>	lirudo medicinalis	54
А.	Le systè	me nerveux de la sangsue	55
В.	La capa sangsue	acité de réparation nerveuse chez la e médicinale	57
C.	Le recru	tement des cellules microgliales	59
III. <u>Le</u>	<u>es objecti</u>	<u>fs du travail de thèse</u>	64
А.	Etude d	e HmIL-16 et de son implication dans le	
	recruten	nent des cellules microgliales	64
	1.	L'interleukine-16 (IL-16) chez les mammifères	64
	2.	Une molécule analogue à l'IL-16 mammalienne	67
	3.	Cellules microgliales de sangsue et IL-16 humaine	69
	4.	Production et action de <i>Hm</i> IL-16 au sein du système nerveux central de la sangsue	70
	5.	Le récepteur de <i>Hm</i> IL-16 : sur la piste d'un potentiel <i>Hm</i> CD4	74
B.	Implicati	on de HmC1g dans le recrutement des	
	cellules	microgliales de sangsue	76
	1.	Description du C1q et son rôle dans le SNC des vertébrés	76

	a.	Les fonctions du C1q dans le système périphérique.	76
	b.	La place du C1q dans les pathologies du SNC	77
	С.	Les récepteurs du C1q	79
	d.	Implications des récepteurs gC1qR et cC1qR dans fonctions biologiques du C1q	; <i>les</i> 81
	2. <i>Hr</i> r au	C1q, une molécule homologue et analogue C1q humain	82
	a.	Des homologies structurales	82
	b.	Localisation et production d'HmC1q	84
	С.	Effets chimioattractants d'HmC1q et du C1q humain les cellules microgliales de sangsue	sur 85
MATÉ	ÉRIEL ET	MÉTHODES	90
I. <u>Ma</u>	tériel biolog	<u>jique</u>	91
А.	Dissection a	le la chaîne nerveuse	91
B.	Préparation 72H	des milieux conditionnés 6H, 24H et	91
C.	Préparation	des chaînes nerveuses	91
D.	Préparation	des cellules microgliales	92
E.	Extraction sangsue ou microgliales 1. Pro	des protéines totales de SNC de J des protéines totales des cellules dissociées otéines totales de SNC de sangsue (PT0h)	92
	2. Pro sar	ntéines totales de cellules microgliales de ngsue (PTCMD)	92
F.	Extraction d	les ARN totaux de SNC de sangsue	93
G.	Synthèse de	es ADN complémentaires	93
H.	Production of 1. Con	<i>de la recombinante rHmC1q</i>	94 94 10

	2. Transformation des clones <i>P. pastoris</i>	95
Ι.	Production des anticorps polyclonaux anti-HmIL- 16 et anti-HmC1g	
	1. Production des anticorps polyclonaux anti- <i>Hm</i> IL-16	
	2. Production de l'anticorps polyclonal anti- <i>Hm</i> C1q	96
II. <u>M</u>	éthodes de fractionnement et de purification	96
А.	Chromatographie liquide haute performance (HPLC)	96
B.	Electrophorèse - SDS PAGE et transfert sur	
		97
	1. L'electrophorese – SDS PAGE	
	2. Le transfert sur membrane	97
С.	Immuno-empreinte (Western Blot)	98
D.	Méthodes de purification par affinité	
	1. Purification du récepteur de HmlL-16 par co-	
	immunoprécipitation en employant les billes	
	agarose A/G+	99
	 Purification du récepteur de HmlL-16 par affinité en employant les billes magnétiques A+ 	99
	 Purification des récepteurs de HmC1q par une méthode de biotinylation du C1q 	100
III. <u>Re</u>	ecrutement des cellules microgliales	
А.	Expériences de chimiotactisme	
	1. Évaluation de l'activité chimioattractante de	
	HmIL-16 et implication de son récepteur	102
	2. Effets de <i>Hm</i> C1q et de ses récepteurs	103
В.	Les expériences ex vivo	
IV. <u>E</u> >	périences d'hybridation in situ	

А.	Préparation des ribosondes105			
В.	Préparation et hybridation des tissus10			
С.	Immunomarquage des ribosondes107			
V. <u>E</u> >	a périences d'immunohistochimie 108			
А.	 Préparation des échantillons et anticorps utilisés			
B.	L'immunodétection			
VI. <u>Le</u>	VI. Les analyses par cytométrie en flux			
А.	Localisation du récepteur de HmlL-16110			
B.	Localisation de HmC1qBP110			
VII. <u>St</u>	ratégies de caractérisation des protéines par			
<u>sp</u>	ectrométrie de masse			
А.	L'analyse par spectrométrie de masse			
	2. Matrices utilisées112			
	3. Calibrants112			
	4. L'analyse des spectres de masse112			
B.	La stratégie « Bottom Up »112			

RÉS	ULTATS	115
ιÉ	tude de Hmll -16 et de son récenteur : sur la niste	
י. <u>ב</u> <u>d</u>	<u>'un analogue potentiel du CD4 humain</u>	116
А.	Caractérisation de la pro-HmIL-16	116
B.	Étude du recrutement des cellules microgliales de	
	sangsue par HmIL-16 et l'IL-16 humaine	122
C.	Sur la piste d'un récepteur analogue au CD4	
	humain à la surface des cellules microgliales de	
	sangsue	124
	 Détection d'une protéine dans le SNC de la sangsue 	
	2. Le recrutement microglial médié par <i>Hm</i> IL-16 et	
	l'IL-16 humaine semble associé à la molécule	
	apparentée au CD4	128
	 Mise en évidence de l'interaction HmlL- 16/récepteur. 	
D.	Caractérisation du récepteur d'HmIL-16	134
	1. Co-immunoprécipitation et stratégie « Bottom	
	Up »	134
	2. Billes magnétiques et stratégie « Top Down »	134
II. <u>É</u>	<u>tude d'<i>Hm</i>C1q et de ses récepteurs <i>Hm</i>C1qBP et</u>	
<u>H</u>	<u>mcC1qR</u>	136
А.	Effet chimioattractant de la forme recombinante	
	rHmC1a	136
	1. Production de la forme recombinante r <i>Hm</i> C1g	
	chez <i>Pichia pastoris</i>	
	2. Activité chimioattractante de r <i>Hm</i> C1q	137
В.	Mise en évidence des récepteurs : HmC1qBP et	
	HmcC1qR	140
	1. Impact des anticorps polyclonaux anti-gC1qR et	
	anti-cC1qR humains sur le recrutement des	4.40
	cellules microgliales de sangsue	140

		2.	Caractérisation de molécules analogues au	144
			a Identification de HmC1aBP	144
			b Caractérisation d'HmcC1gB	146
		3	Localisation d' <i>Hm</i> C1gBP et d' <i>Hm</i> cC1gR	150
		0.	a Production et localisation d'HmC1aBP	150
			b Production et localisation d'HmcC1gR	155
	С.	Mise e	n évidence des interactions C1q et	
		HmC1q	BP ou HmcC1qR	157
יוח	SC	110010)N	160
		000/0	// •	100
	Ca	aractóries	ation et étude de la pro- <i>Hm</i> ll -16	162
••				102
	А.	Analyse	de la pro-HmIL-16 et de HmIL-16	165
	_			
	В.	Activité	chimioattractante de HmIL-16 sur les	407
		cenules		
II.	Et	ude du	récepteur de <i>Hm</i> IL-16 : un potentiel	
	an	alogue d	lu CD4 humain	169
	_			
	А.	Une mo	lécule localisée à la surface des cellules	400
		microgili	ales de sangsue	
	В.	Implicati	on du récepteur de HmIL-16 dans le	
		recruten	nent de la microglie	170
	_			
	С.	Mise en	évidence de l'interaction entre HmlL-16 et	
		ses part	enaires	
		1.	analogue au CD4 humain	170
		2.	Interaction de <i>Hm</i> IL-16 avec ses partenaires	172
		3.	Etude de l'activation des cellules microgliales	
			par <i>Hm</i> lL-16	173

D. En conclusion	174
III. Activité chimioattractante de HmC1q : mise en	
évidence de ses récepteurs HmC1qBP et HmcC1qR	175
A. L'activité chimioattractante de rHmC1q sur les cellules microgliales de sangsue	177
 B. Caractérisation et localisation des récepteurs analogues au C1qBP et cC1qR à la surface de cellules microgliales 1. HmC1qBP 2. HmcC1qR 	178 178 179
C. Implication des récepteurs HmC1qBP et HmcC1qR dans le recrutement des cellules microgliales	181
D. Existe-t-il des analogues au C1q dans le système nerveux d'autres modèles ?	183
IV. Des mécanismes de l'activation microgliale	184
CONCLUSION	185
BIBLIOGRAPHIE	185

AVANT-PROPOS

Avant-propos

Le terme « pathologies neuro-dégénératives » regroupe l'ensemble des maladies qui affectent le cerveau ou l'ensemble du système nerveux, de façon plus ou moins progressive. Les maladies d'Alzheimer, de Parkinson, de Huntington, la sclérose en plaque, les accidents vasculaires cérébraux (AVC) ... sont autant de troubles touchant le tissu nerveux. Généralement, ces maladies résultent d'une détérioration du fonctionnement ou d'une destruction des cellules nerveuses. L'un des processus, pouvant aboutir à une perte des neurones, est l'inflammation.

De nombreuses études ont prouvé l'implication des cellules microgliales, également appelées microglie, dans la genèse ou l'amplification de la réponse neuro-inflammatoire [17-19]. En effet, ces cellules jouent un rôle crucial dans le maintien de l'intégrité et de l'homéostasie du système nerveux central (SNC). En conditions physiologiques, le SNC est protégé par la barrière hémato-encéphalique (BHE) [12, 20], ce qui en fait un site immuno-privilégié. Les cellules microgliales sont alors dans un état de veille et surveillent leur environnement [9, 15, 16, 21, 22]. Partageant des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles communes avec les macrophages [23], la microglie s'active à la moindre perturbation ou menace détectée. En effet, les cellules microgliales représentent la voie effectrice de l'immunité innée au sein du parenchyme cérébral [10, 15, 22, 24, 25]. La présence d'agents pathogènes ou de corps apoptotiques active également la microglie qui, en réponse à ce genre de stimulus, phagocyte les éléments nocifs. Toute stimulation des cellules microgliales induit leur prolifération, leur migration vers le site de l'inflammation et la production microgliale de médiateurs proinflammatoires chimioattractants. Ces molécules peuvent modifier le fonctionnement de la BHE [26] et permettre le recrutement et l'infiltration de cellules immunitaires périphériques dans le cerveau. La production de monoxyde d'azote (NO), de radicaux libres et d'autres molécules proinflammatoires peut s'avérer neurotoxique [9, 27, 28]. En résumé, bien que certains travaux montrent l'effet neuro-protecteur de la microglie [29, 30], l'activation microgliale amplifie généralement la réponse immunitaire au sein du système nerveux, contribuant ainsi au développement des maladies neurodégénératives. Cependant, il est difficile de déterminer avec exactitude la place et l'importance de cette « activation microgliale » dans l'initiation et le développement de ces pathologies. En effet, il est impossible de différencier les cellules microgliales activées des cellules immunitaires infiltrées. En outre, le système nerveux des mammifères est caractérisé par une certaine complexité cellulaire, ce qui constitue un obstacle non négligeable pour évaluer l'impact réel de cette « activation microgliale » dans les processus dégénératifs. Le système nerveux central (SNC) mammalien est, en effet, constitué de neurones, de cellules microgliales, d'astrocytes et d'oligodendrocytes. Tous ces types cellulaires, y compris les cellules constituant la barrière hémato-encéphalique, peuvent potentiellement jouer un rôle dans la réponse inflammatoire. Pour finir, chez les vertébrés, la réparation du système nerveux est limité. Aucune étude n'a déterminé quelles interactions cellulaires interviennent dans les mécanismes neuro-régénérateurs, ni mis en évidence une repousse axonale complète avec une restauration structurale et fonctionnelle des synapses.

Les premiers travaux, faisant état d'une réparation complète d'un système nerveux central (SNC) lésé, ont été menés sur un modèle invertébré : la sangsue médicinale, Hirudo medicinalis [31, 32]. Depuis la seconde moitié du XXème siècle, plusieurs scientifiques se sont penchés sur l'étude du système nerveux de la sangsue et de sa régénérescence. Plusieurs caractéristiques de la sangsue ont suscité leur attention. Premièrement, l'intérêt des chercheurs découle d'une observation simple : après une section expérimentale de sa chaîne nerveuse, la sangsue nage de façon incohérente. Cependant, environ un mois plus tard, sa natation redevient normale. De manière plus générale, cet animal recouvre l'ensemble de ses capacités motrices et sensitives quatre à cinq semaines après une lésion de son SNC [33-37]. Deuxièmement, du fait de sa position anatomique, le système nerveux de la sangsue est facilement accessible, ce qui rend son étude aisée. D'ailleurs, une cartographie détaillée des neurones a pu être établie [31, 38]. En troisième point, comparé aux SNC mammaliens, le tissu nerveux cet animal est relativement simple, possédant une diversité cellulaire moindre [39]. Par conséquent, la recherche des phénomènes cellulaires ou moléculaires de la réparation neuronale semble être possible chez la sangsue, Hirudo medicinalis.

Des expériences prouvant la repousse des axones lésés et la reconnexion synaptique ont pu être menées en isolant des parties précises du système nerveux de la sangsue et en les mettant en culture [35, 40, 41]. De plus, de nombreux

rapports mettent en évidence l'importance de la microglie dans les mécanismes de réparation nerveuse chez la sangsue [8, 42-47]. En effet, suite à une lésion expérimentale, les cellules microgliales migrent vers le site lésé et s'y accumulent [8, 42, 43, 46, 47], ce qui aboutit à une reconstruction puis une restauration fonctionnelle des neurones endommagés [31, 44, 47]. Lorsque ce recrutement microglial est inhibé, le rétablissement du système nerveux est potentiellement retardé [47]. De ce fait, les cellules microgliales sont considérées comme un élément essentiel à la régénérescence du SNC de la sangsue. Cependant, de nombreuses questions biologiques sont à élucider. En effet, quels sont les mécanismes moléculaires permettant d'attirer les cellules microgliales vers le ou les site(s) de lésion ? Ces cellules microgliales sont-elles activées et, si oui, quels facteurs produisent-elles ? La simplicité structurale [39] et l'infiltration limitée, voire inexistante, de cellules sanguines dans son SNC [48], ont permis à l'équipe d'étudier les mécanismes de protection qui surviennent lors d'une lésion du système nerveux de la sangsue. Une attention particulière a été portée aux processus mis en jeu pour assurer le recrutement des cellules microgliales, dont l'implication est actuellement considérée comme essentielle dans l'initiation à la réparation neuronale [47]. Ainsi, afin de mieux comprendre l'élaboration d'une réponse précoce au niveau du système nerveux lésé, l'équipe s'est concentrée sur l'étude de certains facteurs dont l'importance découlait de faits expérimentaux antérieurs, mais également de l'acquisition de données plus récentes au laboratoire. En effet, les analyses menées depuis 2004 au sein de l'unité ont permis de mettre en évidence, en plus de mécanismes de défense périphérique [49-51], l'existence de réponses immunitaires au sein du système nerveux [1, 52-54]. Ces expériences fondées sur des lésions expérimentales de la chaîne nerveuse de sangsue ont abouti à la conclusion que des molécules de l'immunité innée sont mises en jeu lors des processus de protection du système nerveux, lequel peut ensuite récupérer ses fonctions premières au cours du temps. En effet, à la suite d'une blessure de la chaîne nerveuse, le premier phénomène observable est l'accumulation de cellules microgliales au site de lésion. Dans un premier temps, notre recherche s'est donc porté sur les modalités de recrutement de cellules microgliales ainsi que leurs rôles au cours de la réparation du système nerveux. Nos premières analyses utilisant des tests de chimiotactisme sur les cellules microgliales ont mis en évidence les propriétés chimioattractantes du milieu ayant incubé pendant 24 heures les systèmes nerveux lésés (milieu conditionné ou MC). Afin d'appréhender les mécanismes intervenant dans le dialogue neurones-cellules microgliales au sein du système nerveux de la sangsue, nous avons souhaité isoler les facteurs responsables du recrutement des cellules microgliales. La constitution puis l'analyse d'une banque normalisée d'EST construite à partir d'ARN totaux de système nerveux de sangsues adultes ont permis de détecter plusieurs facteurs chimioattractants présentant des homologies avec les protéines mammaliennes correspondantes [1, 5, 55, 56]. Ces molécules de sangsue exercent potentiellement des effets chimioattractants différents sur les cellules microgliales, ce qui laisse supposer l'existence de sous-populations microgliales réactives. Afin de mettre en évidence ces différentes populations, le ou les récepteurs de ces molécules chimioattractantes seront caractérisés. Ensuite, la production d'anticorps spécifiques, dirigés contre ces protéines membranaires, permettra de distinguer les diverses populations microgliales existantes dans le SNC de la sangsue. De plus, employés dans des expériences in vivo ou in vitro, ces anticorps nous permettront de déterminer l'importance de chacune de ces protéines dans l'activation microgliale et la réparation du SNC de la sangsue, Hirudo medicinalis.

I. <u>L'impact de la réponse inflammatoire sur l'intégrité du</u> <u>Système Nerveux Central (SNC) chez les vertébrés</u>

A. La structure du SNC des mammifères

1. Description et composition du SNC

Chez les vertébrés, le système nerveux est formé de deux parties (figure 1): - le système nerveux central (SNC) est constitué de l'encéphale (cerveau, tronc cérébral et cervelet) localisé dans la boîte crânienne, et de la moelle épinière localisée dans le canal rachidien. Globalement, le rôle du SNC est de recevoir, d'interpréter, de mémoriser des signaux émis par l'environnement de l'individu, et d'organiser la réponse nerveuse appropriée.

- le système nerveux périphérique (SNP), composé des nerfs crâniens et des nerfs spinaux, est rattaché au système nerveux central. Il conduit, jusqu'au cerveau, les informations captées par l'individu via des récepteurs sensoriels et transmet les réponses motrices du cerveau au reste du corps, sous forme d'influx nerveux.



Figure 1 : Schéma du système nerveux chez l'Homme (Tiré de Spence et Mason aux éditions ERPI)

L'encéphale est constitué de trois parties décrites ci-dessous :

• Le cerveau est formé de deux hémisphères (droit et gauche), séparés l'un de l'autre par une profonde scissure sagittale inter-hémisphérique, la scissure médiane.

De plus, les deux hémisphères sont composés du cortex (substance grise) et d'une substance blanche. La substance grise contient les corps cellulaires des neurones alors que la substance blanche correspond aux axones des neurones (fibres nerveuses). La couleur blanche est due au contenu lipidique de la gaine de myéline.

• Le tronc cérébral comporte trois parties qui sont de haut en bas : les pédoncules cérébraux (droit et gauche), la protubérance annulaire, et le bulbe rachidien. Du tronc cérébral émergent tous les nerfs crâniens sauf le nerf optique et le nerf olfactif.

• Le cervelet est formé de deux hémisphères droit et gauche, réunis par le vermis. Ils sont reliés au tronc cérébral à droite comme à gauche par les pédoncules cérébelleux supérieur, moyen, et inférieur.

La moelle épinière prolonge le tronc cérébral et le bulbe rachidien. Elle commence immédiatement en dessous du trou occipital. Elle est située dans le canal rachidien. De la moelle et à chaque espace intervertébral sortent les nerfs spinaux constitués d'une racine antérieure, motrice, et d'une racine postérieure sensitive.

Le système nerveux central est essentiellement composé par deux types de cellules, les neurones et les cellules gliales. Cette dernière catégorie comporte les astrocytes, les oligodendrocytes et les cellules microgliales, également appelées « microglie ». Bien qu'il soit protégé par la barrière hémato-encéphalique en conditions physiologiques, les mécanismes menant à une activation des cellules microgliales sont nombreux.

2. Description de la barrière hémato-encéphalique (BHE)

La barrière hémato-encéphalique est une barrière physique et physiologique isolant le SNC de la circulation sanguine. Elle protège le système nerveux des agents pathogènes circulant dans le sang et elle permet de réguler son homéostasie. La BHE représente un filtre sélectif au travers duquel les nutriments sont acheminés et les déchets éliminés [12]. Ce processus d'alimentation et d'élimination est produit par toute une série de mécanismes contrôlant les échanges entre le sang, le liquide céphalo-rachidien (LCF) et le tissu cérébral [20]. En effet, la plupart des nutriments sont transportés activement vers le SNC via des récepteurs membranaires [12].

La BHE est constituée de trois types cellulaires (figure 2) : les cellules endothéliales, les péricytes et les astrocytes.

Comme les vaisseaux sanguins, les cellules endothéliales constituent les capillaires de la BHE [57, 58]. Cependant, la présence de jonctions serrées entre les cellules endothéliales rend ce tissu, l'endothélium, particulièrement imperméable [59]. L'endothélium de la BHE entoure la quasi-totalité du SNC : au niveau de certaines régions du cerveau, ce tissu est fenestré [60]. Dans ces zones, l'endothélium est entouré de cellules épithéliales qui produisent le LCF [12].

• Les péricytes sont de petites cellules en contact étroit avec les cellules endothéliales et les astrocytes. Il semble qu'elles possèdent plusieurs fonctions [61]. En effet, ces cellules peuvent potentiellement moduler la section des capillaires en fonction des besoins. Aussi, les péricytes contrôlent la division et la différenciation des cellules endothéliales et, par conséquent, elles jouent un rôle important lors de la formation de la BHE [58].

• Les astrocytes sont des cellules de forme étoilée, largement plus grandes que les péricytes. Directement en interactions avec les cellules endothéliales, les astrocytes modulent leur perméabilité afin de maintenir l'homéostasie et d'assurer la physiologie au sein du SNC. Les astrocytes sont également capables de sécréter un grand nombre de facteurs de croissance, comme la TGF- β (transforming growth factor- β), la GDNF (glial-derived neurotrophic factor), la bFGF (basic fibroblast growth factor) et l'angiopoétine 1, qui induisent la formation de l'endothélium de la BHE et son phénotype particulier [12].

24



Figure 2 : Aperçu schématique de la barrière hémato-encéphalique (BHE) [11] [15]. Les cellules endothéliales sont reliées entre elles par des jonctions serrées et reposent sur une lame basale. Elles forment un endothélium complètement étanche. Les péricytes sont en contact étroit avec les cellules endothéliales et les astrocytes. Des astrocytes entourent l'endothélium et le pied de ces cellules sont en contact étroit avec les cellules endothéliales.

Le terme de « barrière » suppose que la BHE est une structure inamovible. Cependant, dans plusieurs conditions, le phénotype de la barrière hématoencéphalique est susceptible d'être modifié [62, 63]. Par exemple, en cas de carences nutritionnelles et d'hypoxie, le transporteur GLUT1, responsable du passage du glucose au travers de la BHE, est surexprimé [62]. D'ailleurs, sous l'influence de certains facteurs proinflammatoires circulant dans le sang ou produits localement [61, 64-66], l'endothélium de la barrière devient plus perméable [12, 26, Comme cela sera décrit ultérieurement, ces 67]. perturbations dans le fonctionnement de la BHE peuvent être mis en relation avec la genèse ou le développement de pathologies neuro-dégénératives [12, 19, 68, 69]. L'ouverture de l'endothélium permet non seulement l'infiltration des cellules immunitaires périphériques dans le parenchyme cérébral [19] mais aussi le passage d'anticorps [12] et d'éléments pathogènes [68]. De tels phénomènes perturbent l'homéostasie du SNC. Par conséquent, ils déclenchent l'activation des cellules microgliales, l'initiation ou l'expansion de la réponse inflammatoire potentiellement neurotoxique.

3. <u>Les cellules microgliales chez les vertébrés</u>

Dans un système nerveux adulte, les cellules microgliales représentent 5 à 12% de la population totale des cellules gliales [27]. Assimilées à la famille des macrophages [23], les cellules microgliales représentent la principale population phagocytaire mononucléaire résidente du SNC [70, 71] et elles assurent une fonction d'immuno-surveillance du parenchyme nerveux. Elles sont rapidement activées à la moindre perturbation du SNC et initient la réponse inflammatoire [9]. Plus précisément, elles participent à la réaction immunitaire innée au sein du SNC [9, 25, 28].

Les cellules microgliales ont été décrites par plusieurs auteurs incluant Nissl [72], Robertson [73] et Alzheimer [74] ; cependant, Pio del Rio-Hortega fut le premier à introduire le concept de « microglie » comme élément cellulaire du SNC en 1932 [28]. En conditions physiologiques normales, les cellules microgliales sont dites « quiescentes », dans un état de veille [9]. Elles présentent une morphologie ramifiée et un cytosol peu développé. Suite à une lésion, une infection bactérienne ou virale, une dégénérescence neuronale ou une autre stimulation, les cellules microgliales subissent une transformation morphologique et fonctionnelle. D'un point de vue phénotypique, elles perdent leurs ramifications cytoplasmiques et présentent une hypertrophie de leur corps cellulaire. D'un point de vue fonctionnel, elles deviennent mobiles, migrent vers le ou les sites inflammatoires, elles prolifèrent et développent une activité de phagocytose [9, 27, 28]. De fait, les cellules microgliales présentent différentes morphologies selon leur état fonctionnel et/ou leur phase de développement.

a. L'origine des cellules microgliales

L'origine des cellules microgliales est, encore aujourd'hui, sujette à controverse et trois hypothèses majeures ont été émises : une origine mésodermale, une origine neuroectodermale et une origine hématopoïétique [75].

Dans la première hypothèse, formulée initialement par Del Rio-Hortega (1932), les cellules microgliales proviennent de cellules précurseurs, dites cellules progénitrices, qui envahissent le cerveau au cours de la neurogenèse [27, 75, 76]. Dans un premier temps, les cellules progénitrices se différencient en cellules

« amiboïdes ». Ces cellules ont une morphologie aplatie, elles possèdent quelques pseudopodes et sont mobiles. Ce phénotype est transitoire. En effet, il n'est observable que du stade prénatal jusqu'au début du stade post-natal. Au cours du développement du système nerveux, les cellules microgliales participent à la prolifération et à la différenciation des neurones, notamment en sécrétant des facteurs neurotrophiques [9], et permettent l'élimination des neurones apoptotiques. L'activité de phagocytose des cellules microgliales amiboïdes est supérieure à celle des cellules microgliales ramifiées. En effet, suite à leur différenciation en cellules microgliales ramifiées, la synthèse des récepteurs spécifiques de la phagocytose, comme le CR3 ou le CD64, est réduite [77, 78]. Par ailleurs, à des stades de développement plus avancés, les cellules microgliales amiboïdes semblent être impliquées dans la prolifération des astrocytes et des oligodendrocytes [79, 80] ainsi que dans la différenciation de ces derniers, en produisant des cytokines comme le bFGF (basic fibroblast growth factor) et l'IL-1β [7]. Durant la gliogenèse, il s'avère que l'IL-1ß ne possède pas de lien avec l'inflammation ou la formation d'un tissu cicatriciel astrocytaire. Il est à noter que les facteurs neurotrophiques, synthétisés par les cellules microgliales amiboïdes, ont potentiellement des rôles à jouer dans la croissance des neurites, la croissance et la guidance des axones ainsi que dans la genèse des synapses [7].

L'ensemble de ces données montre l'implication des cellules microgliales amiboïdes dans la prolifération et la différenciation des cellules, la formation des synapses, et l'élimination des corps apoptotiques [7] (figure 3).



Figure 3 : La microglie durant la neurogenèse [7].

La seconde hypothèse, selon laquelle la microglie aurait une origine neuroectodermale, repose sur la différenciation des microglioblastes en cellules microgliales [81]. Par conséquent, les cellules microgliales auraient la même origine que les autres cellules gliales. Cette théorie est confortée par les travaux de certains auteurs qui ont mis en évidence des marqueurs d'oligodendrocytes [82] ou d'astrocytes [83] sur les cellules microgliales.

Enfin, la troisième hypothèse, relativement récente, avance l'origine hématopoïétique des cellules microgliales. Cette théorie, proposée initialement par Ting et collaborateurs (1983), a été démontrée grâce aux avancées technologiques permettant la réalisation des greffes de moelle osseuse. En effet, des travaux similaires, utilisant la greffe de moelle osseuse d'animaux transgéniques exprimant constitutivement le marqueur fluorescent GFP (Green Fluorescent Protein), ont montré que les cellules microgliales parenchymateuses étaient renouvelées de façon non négligeable suite à la greffe et que leur nombre était considérablement augmenté après une lésion du parenchyme cérébral [84-86]. Bien que cette hypothèse soit peu probable lors de la neurogenèse puisque les précurseurs microgliaux ont été détectés au huitième jour de vie embryonnaire [87], bien avant la différentiation des monocytes ou du système vasculaire [88], des monocytes de rat ou de donneur sain, cultivés en présence de milieu conditionné d'astrocytes,

acquièrent la morphologie, le phénotype et les caractéristiques électrophysiologiques des cellules microgliales [89, 90]. D'ailleurs, plusieurs études montrent le renouvellement partiel des cellules microgliales au stade adulte, ce qui est probablement du à l'infiltration de cellules immunitaires, et notamment des monocytes, dans le SNC au niveau des régions naturellement fenestrées de la BHE [12, 84-86, 91].

Ainsi, l'ensemble de ces données suggère que le système nerveux central des vertébrés dispose de sous-populations de cellules microgliales résidentes, ayant, fort probablement, des origines différentes. Cette notion sera détaillée un peu plus loin dans ce paragraphe.

b. Les cellules microgliales ramifiées

Sous l'effet de facteurs neurotrophiques et de certains autres facteurs, dont le M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor) potentiellement produits par les astrocytes [92] ou le GM-CSF (Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor) [93], les cellules microgliales amiboïdes subissent toute une série de changements phénotypiques et se transforment en cellules microgliales ramifiées, avant une forme d'étoile. Ces cellules stellaires semblent immobiles et quasi-quiescentes [9]. Cependant, via une technique d'imagerie en temps réel, de récents travaux ont démontré que, contrairement à leur corps cellulaire plus ou moins statique, les prolongements cytoplasmiques sont en perpétuel mouvement et sondent en permanence leur environnement [21]. Bien que ces cellules microgliales ramifiées, dans un état dit de « surveillance », synthétisent faiblement les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMHII), du CD11b et du CD45, un marqueur lymphocytaire [9, 24], différents récepteurs sont constitutivement exprimés permettant d'activer les cellules microgliales très rapidement en cas de perturbations du SNC. C'est pourquoi les cellules microgliales sont considérées comme de véritables « censeurs » du cerveau [94] (figure 4).

c. Les sous-populations de cellules microgliales

Comme cela a déjà été évoqué, l'existence de sous-populations microgliales est probable du fait de leurs origines différentes. Selon l'hypothèse d'une origine hématopoïétique des cellules microgliales, les monocytes ont été envisagés comme source possible des cellules microgliales. Or, bien qu'ayant une origine commune [75, 76, 95, 96], les monocytes circulants et les macrophages tissulaires résidents, dont font partie les cellules microgliales, contiennent de nombreuses souspopulations. En effet, deux populations de macrophages ont été récemment mises en évidence : les macrophages de type M1, ayant un rôle proinflammatoire, et les macrophages de type M2 intervenant dans la régulation de la réponse inflammatoire. Les profils d'expression des gènes sont caractéristiques pour chaque souspopulation. De ce fait, celles-ci possèdent différentes fonctions [97, 98]. Les macrophages M1 produisent certains médiateurs pro-inflammatoires comme le TNF- α ou le NO (monoxyde d'azote), et possèdent une activité protéolytique importante. Les macrophages M2 modulent la réponse inflammatoire, notamment en synthétisant de l'IL-10, de l'IL-4 ou de l'IL-13, cytokines anti-inflammatoires [99]. La sous-population M2 semble également jouer un rôle important dans les phénomènes de réparation des tissus endommagés. Pareillement, deux populations distinctes ont été identifiées pour les monocytes et ceci, sur la base de la présence ou de l'absence des récepteurs membranaires CCR2 et CX3CR1 [98]. De manière intéressante, les monocytes exposant CCR2 interviennent dans la production de cytokines inflammatoires. Les autres cellules exposant le récepteur CX₃CR₁ à leur surface interviennent dans le dialogue neurone-glie et dans le maintien des cellules microgliales en conditions physiologiques en se liant avec la fractalkine neuronale [9, 28]. Quoique les mécanismes de différenciation des monocytes en macrophages restent encore incertains, les monocytes exprimant le récepteur CCR2 semblent se différencier en macrophages de type M1 et les monocytes possédant le récepteur CX₃CR₁ en macrophages de type M2. Ainsi, malgré un manque de preuves, l'existence de sous-populations de cellules microgliales dans le parenchyme cérébral est possible [97, 98].

De plus, certaines études montrent l'existence de différentes populations de cellules microgliales au travers et dans les régions du SNC. En effet, la microglie du parenchyme cérébral semble distincte de celle localisée autour de la BHE ou dans les méninges. La structure du SNC, la proximité de la BHE ou d'un réseau vasculaire peuvent imposer une différentiation particulière des cellules microgliales. Aussi, les facteurs sécrétés par les neurones peuvent induire une spécialisation des cellules microgliales. Sans être morphologiquement différentes les unes des autres, ces populations peuvent exercer des activités différentes. Par exemple, les taux d'ARNm

du TNF-α, du CD4 et du FcγRII sont plus importants dans les cellules microgliales localisées dans l'hippocampe que dans celles situées dans le diencéphale, le térébellum, le cérébellum et le cortex cérébral. La microglie du cortex cérébral, de la medulla et du globus pallidus expriment spécifiquement la neurotrophine-3 (NT-3). Deux types de cellules microgliales furent mis en évidence dans des cultures de cellules gliales de rat. Ces deux catégories furent identifiées selon des critères morphologiques et leur capacité ou incapacité à répondre à un stimulus, le LPS (lipopolysaccharide bactérien). Cependant, peu de travaux font état de cette hétérogénéité constitutive ou induite de la microglie [9, 28].

d. Les cellules microgliales activées

Une fois activée, les cellules microgliales se caractérisent par une perte des prolongements cytoplasmiques et une hypertrophie de leur corps cellulaire. Elles peuvent sécréter un large éventail de facteurs pro- ou anti-inflammatoires, cytotoxiques ou neurotrophiques [7, 9, 24]. Aussi, les molécules CD11b, CD45 et du CMHII sont exprimées plus fortement. De manière très intéressante, l'activation des cellules microgliales peut être transitoire ou inhibée [9, 27]. Quand le stimulus cesse, les cellules microgliales activées peuvent retourner à leur état quiescent initial ou à un état quiescent légèrement modifié, pouvant servir de mémoire immunitaire (figure 4).

e. Les cellules microgliales sénescentes

A un stade ultime de sur-activation, les cellules microgliales présentent une morphologie hypertrophiée avec de rares prolongements cytoplasmiques épais. Elles conservent les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles du stade précédent mais ont généralement une activité phagocytaire importante. Cependant, elles seront éliminées par un mécanisme d'apoptose induit par leur sur-activation [100].

La microglie évolue également avec l'âge de l'individu et peut, par conséquent, présenter un phénotype et une morphologie altérée [101]. Bien que les répercussions de la sénescence microgliale ne soient pas encore connues, elle peut être à l'origine de maladies neuro-dégénératives liées à l'âge.



Figure 4 : Etats d'activation des cellules microgliales [9]. Ce schéma montre les différents phénotypes de la microglia, en partant d'un état « quiescent » ou plutôt, un état dit de surveillance (Surveying-« resting »-microglia), au stade apoptotique (Decline). Equipées de récepteurs pour une multitude de signaux, les cellules microgliales s'activent à la moindre perturbation du SNC. Ces états d'activation, nommés « Reactive phenotype », sont plus ou moins prononcés en fonction de la nature et de l'intensité des stimuli. Par ailleurs, une réponse inadaptée de la microglie peut conduire à une dégénérescence des neurones et des cellules gliales importante. Après l'épisode inflammatoire, quand les stimuli cessent, les cellules microgliales activées peuvent revenir à leur état quiescent d'origine ou à un état quiescent modifié, pouvant servir de « mémoire » de l'immunité.

Quelque soit l'anomalie touchant le système nerveux, les cellules microgliales s'activent, passant d'un phénotype ramifié à une morphologie activée amiboïde. De manière générale, les cellules microgliales activées sont mobiles, prolifèrent et synthétisent un grand nombre de facteurs pro- ou anti-inflammatoires. Cependant, l'existence probable de sous-populations microgliales compliquent la compréhension des processus d'activation des cellules microgliales. Si cette théorie est corroborée, alors, il est possible d'envisager que certaines sous-populations microgliales sont sensibles à un stimulus particulier ou que d'autres sous-groupes microgliaux développent une réponse qui leurs est propre. D'ailleurs, plusieurs molécules et situations, représentant une menace pour l'intégrité structurale ou fonctionnelle du SNC, peuvent provoquer l'activation de la microglie. En conditions physiologiques, la BHE et les cellules microgliales coopèrent étroitement et veillent ainsi au maintien de l'intégrité et de l'homéostasie du SNC. Tout dysfonctionnement de la barrière hémato-encéphalique entraîne une activation microgliale et, inversement, l'activation

des cellules microgliales, et notamment la production microgliale de certains facteurs proinflammatoires, modifie le fonctionnement de la BHE.

B. <u>Influence des cellules immunitaires dans les pathologies</u> <u>neuro-dégénératives</u>

1. <u>Perturbations de la BHE</u>

L'intégrité ou le fonctionnement de la barrière hémato-encéphalique peuvent être altérés dans un grand nombre de pathologies neuro-dégénératives [11, 12]. Par exemple, dans la maladie d'Alzheimer, les plaques amyloïdes s'accumulent autour des vaisseaux sanguins de la BHE, la rendant plus perméable et la fragilisant [69, 102, 103]. De façon plus générale, lors d'un épisode inflammatoire, le phénotype de l'endothélium de la BHE peut être modifié [12, 26, 67] : des facteurs proinflammatoires, comme l'IL-1, l'IL-6, le TNF-α, l'INF-γ ou la bradykinine, inhibent la production endothéliale des protéines constituant les jonctions serrées et stimulent la synthèse des molécules d'adhésion à la surface de l'endothélium [12, 104]. Par conséquent, la BHE semble devenir plus perméable sous l'effet de certains médiateurs inflammatoires, recensés dans le tableau 1 [12, 26, 64-66]. Cette perméabilité peut être à l'origine d'une infiltration de cellules immunitaires périphériques dans le SNC [12, 16, 26, 104, 105]. Or, ces molécules proinflammatoires sont potentiellement produites par les cellules microgliales activées à la suite d'une lésion ou par la présence d'éléments nocifs au sein du système nerveux [7, 9, 10, 25]. Aussi, il semble que l'IL-1, l'IL-6 et le TNF-α [10, 19, 28], présentes dans le plasma sanguin en cas de troubles infectieux dans le corps, diffusent dans le SNC soit au niveau des régions cérébrales où l'endothélium de la barrière hémato-encéphalique est naturellement fenestré soit directement au travers de la BHE [12, 13, 19, 60]. Ces cytokines peuvent augmenter la perméabilité de la BHE [12, 64-66] et déclencher la réponse inflammatoire dans le SNC [10]. En effet, en se liant à leurs récepteurs exprimés constitutivement à la surface des cellules microgliales [24, 28], elles activent la microglie gui, en réponse, synthétise ces cytokines ou d'autres facteurs proinflammatoires [10, 24]. Ainsi, quelque soit le stimulus, la production de médiateurs proinflammatoires par les cellules microgliales peut initier ou maintenir la perméabilité de la BHE et recruter ou accroître le recrutement de cellules immunitaires périphériques, tels que les monocytes, les macrophages, les lymphocytes T (etc.), du plasma sanguin vers le système nerveux [13, 18, 19, 105, 106]. Outre l'infiltration de cellules immunitaires, la perméabilité induite de la BHE augmente les risques d'infection du SNC en favorisant le passage d'éléments pathogènes [68], et donc, la genèse d'une inflammation et de pathologies dégénératives.

Agents augmentant la perméabilité et perturbant les fonctions de la BHE

- Bradykinine, Histamine, Sérotonine (5-HT), Glutamate
- ATP, ADP, AMP
- Adénosine, Platelet-activating factor (PAF ou facteur d'activation des plaquettes)
- Phospholipase A2, Acide arachidonique, Prostaglandines, Leucotriènes
- Interleukines : IL1-α, IL-1β, IL-6
- TNF- α (Tumor Necrosis Factor $-\alpha$), MIP-1 et MIP-2 (Macrophage-Inhibitory Proteins)
- Polypeptide de l'activation de la voie du complément anaphylatoxines (C3a)
- Monoxyde d'azote (NO) et les radicaux libres (ROS)

Agents renforçant les fonctions de la BHE

- Les stéroïdes
- De fortes concentrations intracellulaires d'AMPc (AMP cyclique)
- Adrénomédulline et les agents noradrénergiques

Tableau 1 : Agents chimiques connus pour moduler les fonctions de la BHE et son étanchéité.

 [12]

Pour conclure, le phénotype de la BHE semble être modifié par des facteurs proinflammatoires qui, soit circulent dans le sang, soit sont produits par les cellules microgliales activées. Ces molécules proinflammatoires peuvent également recruter des cellules immunitaires périphériques au sein du SNC et cette infiltration semble être facilitée par les troubles fonctionnels de la barrière hémato-encéphalique induits par ces médiateurs inflammatoires. Par conséquent, l'activation microgliale, et notamment sa production de protéines pro-inflammatoires, peut être à l'origine du dysfonctionnement de la BHE et du recrutement de cellules immunitaires périphériques. Cependant, il est nécessaire d'expliquer le rôle joué par ces cellules immunitaires périphériques dans les pathologies du SNC, afin de comprendre les conséquences éventuelles de l'activation des cellules microgliales.

2. <u>Les rôles des cellules microgliales activées et des cellules</u> <u>immunitaires infiltrées dans le SNC</u>

a. La phagocytose

En conditions physiologiques, le SNC est un site immuno-privilégié ne présentant que peu, voire aucune, infiltration de cellules immunitaires périphériques [13, 16, 19]. Cependant, il peut être le siège d'une réaction inflammatoire à la suite d'une infection, d'une lésion, d'une production ou d'une présence de protéines anormales, comme, par exemple, les protéines du prion ou les peptides Aß [7, 16, 104, 105]. De telles situations entraînent une activation des cellules microgliales et une production de cytokines proinflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-6, le TNF- α et l'IFN-y [7, 10, 13, 16, 24, 28, 107, 108]. Ces cytokines agissent non seulement sur la BHE [12, 13, 105, 106] mais elles participent également au recrutement des cellules immunitaires périphériques dans le SNC [9, 10, 16, 105]. D'ailleurs, les taux d'IFN-y peuvent être directement corrélés à l'invasion du parenchyme cérébral par les cellules immunitaires périphériques [10]. Parmi l'ensemble des cellules constituant l'immunité, deux catégories ont été plus particulièrement étudiées : il s'agit des macrophages et des lymphocytes T (ou cellules T) [13, 16, 105, 106]. Stimulées par des médiateurs proinflammatoires comme le TNF-a, l'IFN-y, l'IL-18 ou les facteurs du complément [9, 10, 16, 108-112], la microglie activée et les macrophages jouent un rôle fondamental dans la réponse immunitaire en phagocytant les éléments nocifs. En effet, généralement, la phagocytose est l'un des mécanismes immunitaires permettant de limiter la prolifération d'éléments pathogènes, voire de les éliminer, en déclenchant notamment les réactions immunitaires de type Th1 [16, 98]. Dans la maladie d'Alzheimer, les cellules microgliales migrent vers les plaques amyloïdes, s'activent et déclenchent la phagocytose des peptides A^β. Suite à leur activation, les facteurs proinflammatoires microgliaux sécrétés permettent le recrutement de cellules immunitaires d'origine myéloïde. Une fois présentes dans le SNC, ces cellules infiltrées se transforment en cellules microgliales activées, formant ainsi une sous-population microgliale particulière nommées cellules BMDM (Bone-Marrow Derivated Microglia). Il est d'ailleurs possible de relier cette notion de cellules BMDM à l'hypothèse précédemment émise, à savoir l'existence de différentes souspopulations microgliales ayant un rôle précis dans la réponse inflammatoire. Dans la maladie d'Alzheimer, ces cellules BMDM participent à l'élimination des dépôts Aß et,

par conséquent, permettent d'endiguer l'évolution de la pathologie. De nouvelles stratégies thérapeutiques, basées sur la stimulation des cellules immunitaires, ont d'ailleurs été récemment proposées pour lutter contre le développement de cette pathologie neuro-dégénérative [98]. En outre, certaines études semblent démontrer l'importance de la phagocytose, médiée par les macrophages/cellules microgliales activées, dans la clairance des débris et de la myéline au voisinage d'une lésion, ainsi que la fonction de ces cellules dans la prolifération des astrocytes. L'ensemble de ces phénomènes semblent permettre une sorte de cicatrisation du tissu nerveux endommagé [29, 30, 113]. Par conséquent, l'activité phagocytaire des cellules microgliales activées et des cellules immunitaires infiltrés est fondamentalement bénéfique.

Par ailleurs, la phagocytose permet aux macrophages et aux cellules microgliales d'endosser un autre rôle, celui de CPAs (APC) ou cellules présentatrices d'antigènes. Les cellules phagocytaires expriment plus fortement le complexe majeur histocompatibilité II (CMHII), ce qui permet la présentation de l'antigène, issu de la dégradation des pathogènes dans les phagolysosomes, aux lymphocytes T infiltrés dans le cerveau ou présents au niveau de la barrière hémato-encéphalique [16]. L'interaction du complexe CMHII/peptide antigénique avec le TCR (T cell receptor) va d'ailleurs entraîner la production autocrine du TNF- α et de l'IL-12 par les phagocytes et, donc, induire la différenciation des lymphocytes T en Th1. Or, la sous-population de lymphocytes T, nommée Th1, est responsable de nombreuses fonctions à médiation cellulaire comme l'hypersensibilité retardée et l'activation des cellules cytotoxiques (cellules Tc). Elle promeut également l'opsonisation en stimulant la production d'anticorps IgG par les cellules B. Les cellules Th1 sont également associées au déclenchement d'une inflammation excessive ainsi qu'à des lésions tissulaires (Kuby). De plus, l'activité immunitaire peut devenir néfaste en s'attaquant à la myéline et déclencher une situation pathologique comme observée dans la sclérose en plaque. En effet, ce phénomène peut notamment aboutir à sa présentation antigénique auprès des lymphocytes T qui vont détruire cette molécule, particulièrement abondante dans le système nerveux et qui joue un rôle fondamental dans le transport de l'influx nerveux [13, 16, 105, 106, 109]. Ponomarev et ses collaborateurs ont démontré que, dans les souris EAE (encéphalite auto-immune expérimentale), modèle de sclérose multiple, l'activation des cellules microgliales est
corrélée avec l'infiltration de lymphocytes T et avec l'apparition des signes pathologiques cliniques, bien avant l'arrivée des macrophages périphériques [114]. De même, une destruction des cellules microgliales, réalisée en utilisant une souris chimère avec la microglie sous l'influence d'un gène suicide, a pour conséquence une inhibition de la maladie [115], suggérant ainsi que les cellules microgliales, résidentes et infiltrantes, ont un rôle prépondérant dans la présentation de l'antigène de la myéline aux lymphocytes T. Par ailleurs, les macrophages et les lymphocytes peuvent également produire de nombreux médiateurs proinflammatoires dont le TNF- α et l'IFN- γ . Si le TNF- α est intrinsèquement nocif pour les neurones et la myéline [10], l'IFN- γ stimule la production de divers facteurs proinflammatoires dont le TNF- α , l'IL-1, l'IL-6 et les protéines du complément, ce qui amplifie le recrutement des cellules immunitaires et la phagocytose. Ces médiateurs provoquent également la synthèse de monoxyde d'azote (NO) et de radicaux libres par les cellules immunitaires ou par les cellules microgliales activées, ce qui est particulièrement neurotoxique [9, 10, 111].

b. La production de monoxyde d'azote (NO)

Dans le système nerveux des vertébrés, le monoxyde d'azote (NO) possède plusieurs fonctions biologiques. Il peut, en effet, agir en tant que neurotransmetteur ou en tant que médiateur de l'immunité et de l'inflammation [116]. Une dérégulation de sa production peut être à l'origine ou contribuer au développement de pathologies neuro-inflammatoires dégénératives [117]. Le NO est généré par l'oxydation de la Larginine en L-citrulline par une enzyme, la NO synthase (NOS). Trois enzymes différentes ont été identifiées : la NOS neuronale (nNOS), la NOS endothéliale (eNOS) et la NOS inductible (iNOS). Or, en réponse à des cytokines proinflammatoires telles que l'IFN-y, le TNF- α ou l'IL-12, les cellules microgliales et les astrocytes surexpriment le gène codant l'iNOS [118-120]. L'activation excessive des cellules microgliales entraîne la production de radicaux libres et de NO par ces cellules. Ce monoxyde d'azote peut s'avérer particulièrement délétère pour les neurones. En effet, le NO peut agir directement ou indirectement sur les neurones, notamment en se liant avec des radicaux libres pour former le radical peroxynitrite [10, 121]. Le stress oxydatif des neurones, lié au NO, est d'ailleurs une caractéristique commune à de nombreuses pathologies neuro-dégénératives comme la maladie d'Alzheimer, de Parkinson ou de Huntington [122, 123]. Le NO, produit en grande quantité par les cellules microgliales activées, peut certes entraîner la mort des cellules neuronales et des oligodendrocytes [124]. Mais là encore, les effets observés du NO sont variables et semblent dépendre de l'état d'oxydation de cette molécule, le radical libre NO étant toxique et l'ion nitrosonium NO+ étant plutôt neuro-protecteur [125].

c. <u>Le rôle immuno-modulateur des cellules microgliales</u>

Si les cellules microgliales activées peuvent produire un grand nombre de cytokines pro-inflammatoires, toutes potentiellement toxiques par leurs effets sur les cellules immunitaires et les cellules nerveuses [9, 10, 28, 111], elles sont également capables dans certains cas de produire et de sécréter un grand nombre de facteurs ayant une activité anti-inflammatoire ou neurotrophique. Par exemple, en cas d'ischémie, d'infection par le VIH ou après stimulation par du TNF-α ou de l'IL-1, les cellules microgliales sécrètent l'isoforme 1 du « transforming growth factor β » (TGFβ) [126-129]. Le TGFβ est un immunosuppresseur. Ces effets sont nombreux et variés mais contribuent généralement à inhiber les réponses inflammatoires [130]. Par exemple, il stimule la synthèse de composants de la matrice extracellulaire par les astrocytes favorisant ainsi la formation des cicatrices [131] ou inhibe l'expression d'ICAM-1 à la surface de ces mêmes cellules, bloquant les interactions avec les lymphocytes T infiltrants [132]. Le TGFß agit également sur les cellules microgliales, notamment en inhibant les fonctions immunitaires de ces cellules [133]. En effet, le TGF_β réduit l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et II (CMH I et II) à la surface de la microglie [134], bloque la prolifération des cellules microgliales et leur production de radicaux oxygénés [135]. Pour finir, les cellules microgliales peuvent produire de l'IL-10 dont les activités anti-inflammatoires sont bien connues [136, 137] ou des facteurs neurotrophiques comme bNGF (« nerve growth factor »), NT-3, NT-4/5 (neurotrophines 3, 4, 5), BDNF (« brain derived neurotrophic factor »), GDNF (« glial cell derived neurotrophic factor ») [7, 138, 139]. Par conséquent, l'activation des cellules microgliales n'a pas que des conséquences néfastes sur l'activité et l'intégrité neuronale ou du système nerveux. 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 [140]. Après ischémie cérébrale ou lésion de la moelle épinière, les neurones sont protégés ou repoussent mieux après greffe de cellules microgliales [141, 142]. Ces fonctions bénéfiques pourraient d'ailleurs s'expliquer par la sécrétion microgliale de facteurs neurotrophiques lors d'une inflammation [143]. De manière intéressante, les cellules microgliales phagocytaires ont également une fonction immuno-modulatrice. En effet, elles éliminent les lymphocytes T infiltrés apoptotiques, inhibant ainsi l'inflammation [144] et la prolifération des cellules lymphocytaires adjacentes [145].

Pour conclure, l'activation des cellules microgliales et l'infiltration des cellules immunitaires périphériques dans le système nerveux central peut être soit bénéfique soit délétère. Cela dépend essentiellement du degré d'activation de la microglie, du type de cellules immunitaires recrutées et du contexte inflammatoire. Par exemple, bien que la phagocytose médiée par les cellules microgliales activées et les macrophages infiltrés permet d'éliminer les éléments nocifs, cette activité peut favoriser la démyélinisation des neurones [13, 109, 112, 146], initiant ainsi une pathologie neuro-dégénérative, la sclérose multiple. D'ailleurs, le déclenchement de la réponse immunitaire de type Th1 et la synthèse de médiateurs proinflammatoires, comme le TNF-a et l'IFN-y, sont autant d'éléments pouvant devenir délétère pour les neurones : sur-activant les cellules microgliales, les cytokines agissent de manière autocrine/paracrine [9, 10, 28], promouvant leur propre synthèse et celle de NO (monoxyde d'azote) ou de ROS (radicaux oxygénés libres) qui sont potentiellement la neurotoxiques. Par conséquent, combinaison « activation microgliale/ modifications phénotypiques de la BHE/ cellules immunitaires infiltrées » semble créer une sorte de « boucle d'amplification » de l'inflammation au sein du tissu nerveux (figure 5). De nombreuses études ont d'ailleurs démontré la corrélation existant entre l'activation microgliale, la présence des cellules immunitaires périphériques au sein du système nerveux central et l'évolution des maladies neurodégénératives [7, 9, 10, 13, 16, 19, 107, 110]. Si les cellules microgliales et les mécanismes d'activation sont fondamentalement neuro-protecteurs, la sur-activation ou le dysfonctionnement des cellules microgliales ainsi que l'infiltration massive ou excessive de cellules immunitaires inflammatoires au sein du parenchyme cérébral peuvent entraîner des dommages neuronaux [98, 147, 148]. Par conséquent, il devient nécessaire de comprendre les mécanismes à l'origine de l'activation des cellules microgliales.



Figure 5 : Activation microgliale et infiltration de cellules immunitaires périphériques (d'après [13] [16]). Les cellules microgliales sont activées dans diverses conditions pathologiques. L'activation de la microglie provoque le déclenchement de l'activité phagocytaire des cellules microgliales ainsi que la production de médiateurs proinflammatoires et de molécules neurotoxiques comme le NO ou les ROS (radicaux oxygénés libres). Ces molécules, produites par les cellules microgliales activées, augmentent la perméabilité de la BHE et recrutent les cellules immunitaires périphériques au sein du SNC. Les macrophages infiltrés et les cellules microgliales activées participent à la phagocytose des éléments nocifs. Ensuite, les phagocytes deviennent des cellules présentatrices d'antigènes (CPAs ou APC). Les APC stimulent les cellules T qui se différencient en Th1. Les APC et les cellules Th1 sécrètent à leur tour des médiateurs, du NO et des ROS, qui amplifient le recrutement des cellules immunitaires, créant ainsi une sorte de boucle d'amplification de l'inflammation neurotoxique au sein du SNC. Par conséquent, l'activation microgliale semble être le « starter » de pathologies liées à la neuroinflammation.

C. Activation des cellules microgliales

Quelque soit la perturbation touchant le SNC, les cellules microgliales activées produisent de nombreux facteurs pro- ou anti-inflammatoires, provoquant ainsi le recrutement des cellules immunitaires périphériques dans le SNC. Véritables « censeurs » du système nerveux, les cellules microgliales sont équipées de multiples récepteurs permettant de reconnaître une large variété de signes, indépendamment de leur nature biochimique (peptides, lipoprotéines, glycolipides ou nucléotides) ou diverses conditions pathologiques. Quelques exemples de couple ligand-récepteur activant les cellules microgliales sont présentés dans le tableau 2.

Sans lister de façon exhaustive les récepteurs microgliaux, il est possible de les répertorier selon trois conditions/voies d'activation.

Class of compound	Examples		
Surface structures and DNA/RNA of viral, bacterial or fungal origin	Agonists of members of the pattern recognition receptor families, notably TLR1/2, TLR3, TLR4, TLR6/2 and TLR9, such as bacterial LPS or cell wall proteoglycans and lipoteichoic acid (LTA), gp41, gp120 (the TLR4-agonistic LPS serving as a common model agent)		
Abnormal endogenous proteins	β-amyloid (aggregates), Aβ25–35, Aβ40, Aβ42, prion protein (PrP)		
Complement	Complement factors C1q, C5a		
Antibodies	Immunoglobulin of various classes and isotypes (IgA, IgG, IgM), presented in immune complexes		
Cytokines	Colony stimulating factors (M-CSF, GM-CSF), IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IFN-γ, TGF-β, TNF-α		
Chemokines	Ligands for chemokine receptors: CCR3, CCR5, CXCR2, CXCR, CXCR4, CX3CR1, IL-8R		
Neurotrophic factors	Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), glial-derived neuro- trophic factor (GDNF), nerve growth factor (NGF), neurotrophin 3 (NT-3), NT-4		
Plasma components	Albumin, fibronectin, fibrinogen, thrombin		
Other proteins and peptides	Apolipoprotein E (ApoE), heat shock proteins hsp60 and hsp70, CD40L, melanocyte-stimulating hormone (MSH), endothelin, S100 proteins, vasoactive intestinal peptide (VIP)		
Neurotransmission-related compounds	ATP (and related purines), β -adrenergic agonists, glutamate, kainate, NMDA		
lons	K+, Mn ²⁺		
Other compounds	Cannabinoids, ceramide, gangliosides, lysophosphatidic acid (LPA), melatonin, opioids (endomorphines), platelet-activating factor (PAF), prostaglandin E ₂ (PGE ₂), steroid hormones, vitamin D ₃		

Tableau 2 : Quelques exemples de signaux et de modulateurs impliqués dans l'activation des cellules microgliales [9].

1. En cas de dysfonctionnement ou de lésions neuronales

Les neurones informent constamment la microglie sur leur état physiologique. Par ailleurs, la survie de neurones endommagés ou menacés peut dépendre de l'activation de la microglie [7]. Un trouble du fonctionnement ou une lésion des neurones seront détectés au moyen de différents récepteurs présents à la surface des cellules microgliales, comme les récepteurs aux neurotransmetteurs, le CD200R et le CX₃CR1.

a. Les récepteurs aux neurotransmetteurs

Les purinocepteurs

Au sein du système nerveux central, l'ATP et ces dérivés représentent les principaux médiateurs purinergiques. Ils fonctionnent comme neurotransmetteurs

dans le cerveau, la moelle épinière, ainsi que dans le système nerveux périphérique et ils sont particulièrement importants dans la régulation des interactions neuronesglie. Les effets physiologiques de ces molécules sont médiés par des purinocepteurs, exprimés notamment à la surface des cellules gliales et en particulier à la surface des cellules microgliales. En conditions pathologiques, une libération massive d'ATP est due et s'accompagne d'une destruction massive de neurones. Un excès d'ATP au sein du parenchyme cérébral est neurotoxique. Des expériences *in vitro* et *in vivo* ont démontré que de fortes concentrations d'ATP et de ses dérivés entraînent une activation rapide des cellules microgliales avec une migration de ces cellules vers le ou les sites de lésions, une sécrétion de cytokines et de protéines inflammatoires, le développement de l'activité de phagocytose et enfin, la synthèse de facteurs neurotrophiques comme le NGF (nerve growth factor) et le BDNF (brainderived neurotrophic factor) afin de protéger et maintenir les neurones intacts [28].

• Le glutamate

Le glutamate (Glu) est un neurotransmetteur excitateur majeur, lié à l'apprentissage et à la mémoire. Lors d'un dysfonctionnement neuronal, la concentration en Glu dans la fente synaptique peut atteindre un niveau excessif, provoquant une hyperstimulation des neurones et les menant à leur mort [28]. De plus, le TNF-α, produit par les cellules microgliales activées lors d'une infection ou d'une lésion du CNS, entraîne une sécrétion importante de glutamate par les astrocytes, ce qui est neurotoxique [10]. Les cellules microgliales peuvent être activées par le glutamate via des récepteurs nommés mGluRs, pour « metabotropic glutamate receptors ». Les mGluRs sont classés en sous-groupes. Leur stimulation semble induire différents types d'activation microgliale. En effet, si les mGluRs du groupe I semblent contrôler l'activation des cellules microgliales médiée par le LPS, l'excitation des mGluRs du groupe II entraîne la production de TNF-α par les cellules microgliales, rendant leur activation encore plus délétère pour les neurones. Les récepteurs mGluRs du groupe II semblent également participer à l'activation des cellules microgliales par la chromogranine A, un peptide sécrété et présent au niveau des plaques neuritiques de la maladie d'Alzheimer. [7, 28].

b. Les interactions CD200-CD200R et CX₃CL1-CX₃CR1

L'activation des cellules microgliales peut être sous l'influence directe des neurones via des interactions ligand-récepteur spécifiques [9]. Ainsi, une rupture des interactions CD200-CD200R ou CXCL1-CXCR1 aboutissent à l'activation de la microglie [9, 10, 24]. Le CD200 (OX2) et la fractalkine (ou CX₃CL1), exprimés de façon constitutive par les neurones, se lient respectivement au CD200R (OX2R) et au CX₃CR1, présents à la surface des cellules microgliales [10, 24, 28]. Il a été démontré que, chez la souris, une déficience en OX2 mène à un phénotype activé de la microglie et que ces cellules microgliales sont plus réactives en cas de lésion du nerf facial. Ces expériences suggèrent donc fortement que l'interaction CD200-CD200-CD200-R régule l'activation des cellules microgliales [24].

Le CX₃CL1 joue un rôle crucial au sein du CNS : en se liant à son récepteur, le CX₃CR1, la fractalkine neuronale permet la survie des cellules microgliales et constitue une sorte de signal apaisant qui inhibe l'activation de ces cellules. En effet, de façon similaire au couple CD200-CD200R, une simple rupture de l'interaction CX₃CL1-CX₃CR1 mène à l'activation des cellules microgliales. De plus, en cas de lésions du SNC, la production de CX₃CL1 par les neurones est réduite alors que celle du CX₃CR1 par les cellules microgliales augmente. De manière très intéressante, les cellules microgliales sont elles mêmes capables de produire la fractalkine. Ce phénomène peut constituer un signal d'autorégulation pour les cellules microgliales puisque l'ajout de fractalkine, sur des cellules microgliales activées, réduit significativement la synthèse de TNF- α , cytokine proinflammatoire potentiellement neurotoxique [10, 28].

Il existe d'autres types de récepteurs et d'interactions non décrits ci-dessus mais dont les modalités d'action sont identiques. Par exemple, les interactions SDF-1- CX₃CR4 et SIRPα-CD47 reposent sur le même fonctionnement que les CD200-CD200R et CX₃CL1-CX₃CR1. Les cellules microgliales sont également pourvues de récepteurs à la dopamine, impliqués notamment dans la genèse de la maladie de Parkinson, et de récepteurs aux neurohormones et neuromodulateurs comme la bradykinine, la neurokinine ou aux neurotrophines. Ainsi, en cas de lésions ou de troubles dans le fonctionnement des neurones, les cellules microgliales sont activées. Cette activation microgliale peut induire la migration de ces cellules vers le ou les sites endommagés ainsi que leur prolifération. Elles pourront également participer à la réparation ou au maintien du SNC en sécrétant, par exemple, des facteurs neurotrophiques [7] ou en phagocytant les cellules neuronales apoptotiques ou endommagées. Aussi, elles initient la réponse inflammatoire au sein du SNC en sécrétant notamment des facteurs proinflammatoires et des radicaux libres, cytotoxiques, rendant l'activation de ces cellules microgliales neurotoxique [7, 9, 10, 24].

2. <u>En cas d'infections ou en présence d'agents potentiellement</u> <u>toxiques</u>

En cas d'invasion du SNC par des agents pathogènes (bactéries, virus, parasites, etc.) ou en présence de protéines potentiellement toxiques comme les peptides Aβ, les cellules microgliales déclenchent immédiatement la réponse immunitaire innée au sein du parenchyme cérébral [25]. Pour reconnaître et éliminer ces corps étrangers ou nocifs, les cellules microgliales font intervenir diverses structures dont les principales sont détaillées ci-dessous.

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

Les SR permettent la reconnaissance et l'élimination des lipoprotéines modifiées des cellules apoptotiques, des bactéries ou encore de substances comme le peptide A β (β -amyloïde), peptide caractéristique de la maladie d'Alzheimer [149, 150]. Les cellules microgliales expriment les récepteurs scavenger suivants : SR-A; SR-BI; CD36, RAGE (receptor for advanced glycation end products); LRP (low density lipoprotein receptor-related protein); MARCO (macrophage receptor containing a collagenous domain) [151]. Bien qu'ils soient constitutivement exprimés par les cellules microgliales amiboïdes au stade néonatal, certains de ces récepteurs, comme SR-A et SR-BI, sont moins présents au stade adulte et ne sont ré-induits qu'en cas d'inflammation. Les conséquences de l'activation de ces récepteurs d'épuration sont encore méconnues. Néanmoins, le peptide A β , à l'origine des plaques amyloïdes, peut être reconnu et internalisé par les cellules microgliales via les SR [152].

b. <u>Les récepteurs de la famille Toll (« Toll-like receptors » ou</u> <u>TLRs</u>)

Les TLRs ou PRRs (« pattern recognition receptors ») sont des récepteurs transmembranaires qui permettent la reconnaissance de molécules ou de motifs appelés PAMPs (« pathogen-associated molecular patterns »). Les PAMPs sont produits par des agents infectieux de type bactéries, virus, parasites ou champignons [25]. Les TLRs, exprimés par les cellules microgliales, sont des glycoprotéines aux fonctions hautement spécialisées. En effet, le TLR2, en association avec les TLR1 ou TLR6, détectent des lipoprotéines bactériennes (tri- et diacyls), l'acide lipotéichoïque (LTA) et les peptidoglycanes (PGN); le TLR3 reconnaît les ARN « double brin » de certains virus ; le TLR4 est activé par le LPS (lipopolysaccharide), le composant principal de la membrane cellulaire des bactéries gram-négatives ; le TLR5 répond à la flagelline de bactéries ; les TLR7 et TLR8 reconnaissent les ARN « simple brin » de virus comme celui du virus du sida (HIV-1) ou celui de la grippe (influenza); enfin, les CpG d'ADN bactériens ou viraux sont décelés via le TLR9 [25, 28]. Hormis le TLR3, toute stimulation des récepteurs Toll induit la transcription des gènes codant pour les cytokines (IL-1, TNF-α, IL-6...), les chemokines (MCP-1, IL-8, RANTES...), les protéines du système du complément (C3, C3aR, C5aR, facteur B...), des enzymes (COX-2, iNOS...), des molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1, P-sélectine et E-sélectine...) et de récepteurs de l'immunité innée (CD14 corécepteur des TLRs, IL-6R...) [25]. En résumé, l'activation des cellules microgliales via les Toll-like récepteurs (sauf le TLR3) déclenche la production des effecteurs de l'immunité innée, c'est-à-dire la synthèse de facteurs et de récepteurs proinflammatoires. De nombreuses études montrent l'implication et l'importance des TLRs dans les maladies neuro-dégénératives, y compris dans les infections et les traumatismes du SNC. Par exemple, dans la pathologie d'Alzheimer, les peptides Aß semblent potentialiser une réponse inflammatoire en activant la microglie via les TLRs 2 et 4. D'ailleurs, le taux d'expression des TLRs, à la surface des cellules microgliales, est significativement plus important dans les maladies d'Alzheimer et de Parkinson, la sclérose multiple et la sclérose latérale amyotrophique (ALS ou amyotrophic lateral sclerosis) [28].

c. <u>Les molécules du complément</u>

Dans le système périphérique, le système du complément, constitué de 35 protéines, est spécialisé dans la reconnaissance et l'élimination d'agents pathogènes ou de cellules, dans l'activation de la réponse immunitaire à médiation cellulaire et le métabolisme des complexes immuns circulants grâce aux récepteurs du complément. Les principales protéines du complément sont notées de C1 à C9 [153-155] et les facteurs allant de C5 à C9 s'assemblent pour former le « complexe d'attaque membranaire » (CAM), responsable de la lyse des cellules infectées ou endommagées et des agents pathogènes présents dans le SNC [3, 156-158]. Les protéines du complément se présentent sous la forme de pro-enzymes inactives. Ces enzymes sont activées en cascade par clivage enzymatique qui libère une fraction protéasique et une fraction avant une activité proinflammatoire, comme les fragments C3a et C5a, les anaphylatoxines. Ces cascades d'activation se résument en trois voies biochimiques : classique, alterne et voie des lectines [111, 153-155] (Kuby) (figure 6). Les protéines du complément (également nommées « opsonines ») participent à « l'opsonisation » de pathogènes facilitant ainsi leur phagocytose, et donc, leur élimination.



Figure 6 : Activation et régulation du système du complément [2, 3]. Le système du complément est activé par trois voies principales : (1) La voie classique activée par les complexes immuns. (2) La voie alterne faisant intervenir les facteurs B et D pour la formation de la C5-convertase. (3) La voie des lectines activée par des résidus carbohydrates présents à la surface d'agents pathogènes. L'activation de ces trois voies aboutit à la formation du « complexe d'attaque membranaire » (CAM). Ce système est régulé par différentes protéines solubles (Gras, italique) ou membranaires (Gras, encadré).

Les anaphylatoxines C3a et C5a produites peuvent activer les cellules microgliales en se liant sur des récepteurs constitutivement exprimés à leur surface. L'activité chimioattractante est majoritairement médiée par le C5a [28].Les cellules microgliales expriment les récepteurs CR1, CR3 (CD11b/CD18) et CR4, qui se lient aux fragments C3b et C3bi [24, 159], ainsi que les récepteurs FcγRI, RII et RIII qui reconnaissent les régions constantes (Fc ou parties cristallisables) des immunoglobulines [24]. La stimulation des CR et des FcγR induit l'activité phagocytaire des cellules microgliales ainsi que la synthèse des médiateurs proinflammatoires et cytotoxiques [24, 112, 160]. De plus, l'expression des récepteurs CR1, CR3 (CD11b/CD18) est souvent utilisé pour marquer les cellules microgliales *in situ* chez la souris, ou comme marqueur d'activation des cellules microgliales.

En résumé, en présence d'agents infectieux ou de composants potentiellement nocifs, les cellules microgliales sont activées. Les « scavenger receptors », les TLRs, les protéines du complément et leurs récepteurs sont autant de molécules qui permettent aux cellules microgliales de détecter ces éléments pathogènes au sein du SNC. L'objectif étant de les éliminer, la stimulation de ces récepteurs entraîne essentiellement le développement de l'activité phagocytaire de la microglie. La phagocytose, initialement bénéfique et nécessaire, peut vite s'avérer délétère, notamment par la sécrétion de cytokines et autres médiateurs proinflammatoires. En effet, les cellules microgliales sont également sensibles aux cytokines puisqu'elles disposent d'un véritable arsenal moléculaire permettant de les reconnaître.

3. Activation microgliale via les cytokines

De manière générale, suite à une perturbation du SNC, les cellules microgliales activées expriment certaines cytokines présentées en tableau 3 [10, 24, 28, 161]. Les cytokines représentent une grande famille de protéines qui jouent un rôle fondamental dans la communication cellulaire. Sécrétées pour une signalisation autocrine/paracrine, associées à la membrane lors d'une interaction intercellulaire ou occasionnellement porteuse d'une information biologique, ces protéines régulent la croissance, la survie, la différenciation et l'activité des cellules [10]. En majorité, elles

peuvent également agir en tant que médiateurs inflammatoires. Les chemokines, le TNF- α , l'IFN- γ , et les interleukines, pour ne citer que ces catégories de molécules, sont présentes dans les régions cérébrales et le liquide cérébrospinal (CSF) suite à un traumatisme, une infection ou un mécanisme pathologique [10, 17-19, 107]. Leur présence au sein du système nerveux résulte soit d'un passage au travers de la BHE, soit d'une production par les cellules microgliales activées ou par les cellules immunitaires infiltrées au sein du parenchyme cérébral.

Abbreviation	Full name		
GROα	growth regulated oncogene α		
\mathbb{L} -1 α / \mathbb{L} -1 β	interleukin-1α/-1β		
IL-1ra	interleukin-1 receptor antagonist		
IL-3	interleukin-3		
IL-6	interleukin-6		
IL-8	interleukin-8		
IL-10	interleukin-10		
IL-12	interleukin-12		
IL-15	interleukin-15		
IL-18	interleukin-18, also interferon-γ inducing factor		
	(IGIF)		
IP-10	gamma interferon inducible protein-10		
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1		
M-CSF	macrophage colony stimulating factor		
MDC	macrophage derived chemokine		
MIP-1α/MIP-1β	macrophage inflammatory protein-1α/-1β		
MIP-2	macrophage inflammatory protein-2		
MIP-3β	macrophage inflammatory protein-3β		
TGFβ	transforming growth factor		
$TNF\alpha$	tumor necrosis factor α		
RANTES	regulated on activation, normal T cell		
	expressed and secreted		

Tableau 3 : Cytokines et chemokines synthétisées par les cellules microgliales. [10]

a. Les chemokines

Les chemokines sont de petites protéines, de 8 à 14 kDa. Elles sont produites par les neurones, les astrocytes et les cellules microgliales activées ou non [10]. Cette production basale ou induite de chemokines au sein du système nerveux peut varier en fonction des espèces, de la région du SNC, de l'âge de l'individu et peut aussi diverger entre deux individus de la même population [28]. Cependant, lors d'une lésion cérébrale, d'une infection ou, plus généralement, dans le cas de diverses pathologies neuro-dégénératives, la synthèse des chemokines et de leurs récepteurs est considérablement accrue dans les cellules microgliales activées. De ce fait, les cellules microgliales sont considérées comme la principale source ainsi que la principale cible des chemokines dans le SNC [10, 28, 161].

Les chemokines sont connues pour leur capacité chimioattractante. Elles permettent la migration de la microglie activée vers les régions cérébrales lésées ou infectées et l'infiltration de cellules immunitaires périphériques dans le système nerveux. De plus, les chemokines induisent la synthèse de cytokines comme le TNF- α et l'IL-1 par les cellules microgliales et semblent jouer un rôle dans l'apoptose et la phagocytose [10, 28, 161]. Bien que les leucocytes recrutés modulent la production microgliale des chemokines en sécrétant de l'INF- γ , l'infiltration de cellules immunitaires et la sécrétion de TNF- α , induites par les chemokines au sein du SNC, constitue la principale boucle d'amplification de l'inflammation.

b. <u>Le TNF-α et l'IFN-γ</u>

• <u>Le TNF- α (Tumor Necrosis Factor α)</u>

Le TNF- α est une cytokine proinflammatoire. Elle est produite par les neurones, les astrocytes et les cellules microgliales activées. En effet, suite à une lésion ou une ischémie, une infection (bactérienne ou virale) et dans les pathologies d'Alzheimer et de la sclérose multiple, le taux de TNF-a augmente significativement dans le cerveau. De plus, le TNF- α agit aussi de façon autocrine : comme les chemokines, cette cytokine amplifie sa propre production et sécrétion par les cellules microgliales activées [24, 28]. Le TNF-a déclenche l'activité phagocytaire de la microglie [24, 28]. La phagocytose d'éléments nocifs par les cellules microgliales leur permet de se différencier en CPAs ou cellules présentatrices d'antigènes : elles présentent l'antigène aux lymphocytes T infiltrés dans le cerveau ou présents au niveau de la BHE. L'interaction du complexe CMHII/peptide avec le TCR (T cell receptor) va d'ailleurs entraîner la production autocrine du TNF- α et de l'IL-12 par les cellules microgliales et, donc, induire la différenciation des lymphocytes T en Th1. De plus, dans ce contexte, l'activation des cellules microgliales est amplifiée par l'interaction CD40-CD40L. Le CD40, présent à la surface de la microglie activée, appartient à la famille des récepteurs TNF. Il reconnaît son ligand, le CD40L (ou CD154), situé dans la membrane des lymphocytes T, ce qui provoque la prolifération de ces cellules [10, 16, 24, 162]. En aparté, l'existence de sous-populations microgliales, capables de présenter l'antigène soit aux lymphocytes CD4+ soit aux lymphocytes CD8+, a été suggérée [163].

De plus, le TNF- α stimule la production de PGE₂ (prostaglandine E2) par les cellules microgliales. Cette prostaglandine induit la sécrétion de glutamate et de

49

chemokines par les astrocytes. Ce phénomène va alors amplifier l'inflammation puisque le glutamate et les chemokines vont également activer les cellules microgliales en se liant à leurs récepteurs [10, 24, 28]. En outre, le TNF- α est, intrinsèquement, nocif pour les neurones et la myéline [10]. Cependant, si de forte concentration en TNF- α possède un effet délétère, neurotoxique, de faible quantité de TNF- α semble avoir des effets neuro-protecteurs en stimulant la synthèse du facteur neurotrophique NGF [10].

<u>L'IFN-γ (Interféron γ)</u>

L'IFN- γ joue un rôle pivot dans les pathologies neuro-dégénératives puisqu'il induit la réponse immunitaire de type Th1 et les taux d'IFN- γ sont particulièrement élevés dans de nombreuses conditions neuro-pathologiques. En stimulant les cellules microgliales, l'IFN- γ provoque une augmentation de l'expression des molécules du CMH I et II, des co-stimulateurs CD80 et CD86, des récepteurs du complément (CR3), des récepteurs d'épuration de type SR-A (scavenger receptor A), des récepteurs Fc, du CD14 (un récepteur du LPS), et enfin, des molécules d'adhérence comme ICAM-1 à la surface de ces cellules. Par conséquent, comme le TNF- α , l'IFN- γ potentialise l'activité phagocytaire des cellules microgliales qui deviennent alors des cellules présentatrices des antigènes (CPAs). S'ensuit des mécanismes déjà décrits dans les paragraphes précédents. L'IFN- γ active également la production et la sécrétion de cytokines (TNF- α , IL-1, IL-6), de facteurs du complément dont le C1q et de monoxyde d'azote (NO) par les cellules microgliales.

c. Les interleukines

• L'IL-1 (interleukine 1) et l'IL-18 (interleukine 18)

L'IL-1 est une cytokine potentiellement impliquée dans de nombreux processus neuro-pathologiques. En effet, la suppression de cette cytokine présente souvent des effets neuro-protecteurs dans un système nerveux mature. Cependant, une déficience en IL-1 lors de la neurogenèse perturbe son développement [10]. Par conséquent, cette cytokine présente une dualité: une fonction inflammatoire neurotoxique et une action bénéfique lors de la genèse du SNC. Par exemple, en cas d'infection par des bactéries gram-négatives, le LPS active les cellules microgliales via les TRL4, entraînant la production de divers facteurs proinflammatoires dont l'IL-1 [25]. Cette production microgliale d'IL-1 a également été

observée dans la maladie d'Alzheimer et suite à un traumatisme du SNC [10]. Aussi, cette cytokine peut être synthétisée par les cellules immunitaires périphériques infiltrées dans le parenchyme cérébral. L'IL-1 active les cellules microgliales, provoquant notamment la production microgliale de médiateurs proinflammatoires tels que le PGE₂ et l'IL-6. L'IL-1 est également connue pour sa capacité à induire la fièvre et le sommeil en agissant de façon endocrinienne au niveau de l'hypothalamus, région au niveau de laquelle l'endothélium de la BHE est naturellement fenestré [10] (Kuby). Cette cytokine peut, en effet, diffuser dans le SNC et elle semble être impliquée dans les processus pathologiques neurotoxiques.

En outre, l'IL-18 (interleukine-18) est une cytokine similaire à l'IL-1 de par sa structure et certaines de ses fonctions dans la réponse immunitaire innée et adaptative. Produite principalement par les macrophages, les monocytes, les astrocytes et les cellules microgliales, l'IL-18 incite le développement d'une réponse immunitaire de type Th1. En synergie avec l'IL-12, cette molécule déclenche la production d'IFN- γ et de TNF- α qui stimulent l'activité phagocytaire de la microglie et la production de cytokines proinflammatoires dont l'IL-1. Ceci suggère fortement que l'IL-18 joue un rôle critique dans l'inflammation du SNC. [9, 10].

• L'IL-2 (interleukine 2)

Seules les cellules microgliales activées peuvent répondre à cette cytokine : l'IL-2 induit la prolifération des cellules microgliales, prolonge leur durée de vie et, combinée au LPS ou à l'IFN- γ , elle augmente la production microgliale de NO (monoxyde d'azote), neurotoxique. Par conséquent, en déclenchant la prolifération des lymphocytes infiltrés et des cellules microgliales activées et en stimulant la production de composés neurotoxiques, l'IL-2 accroît les processus inflammatoires au sein du SNC. De plus, comme le TNF- α , l'IL-2 est intrinsèquement neurotoxique à forte concentration, entraînant une pléthore de conséquences neuroendocriniennes et neuronales [10, 28].

• L'IL-6 (interleukine 6)

Dans le SNC, l'IL-6 est une cytokine proinflammatoire produite par plusieurs types cellulaires dont les cellules microgliales. Comme l'IL-1 et le TNF- α , cette molécule initie et développe la réponse immunitaire au sein du système nerveux, limitant l'expansion des agents infectieux. Elle active notamment les cellules

microgliales via son récepteur, l'IL-6R. Comme l'IL-1, cette cytokine agit de façon endocrine, induisant la fièvre et le sommeil, régulant l'appétit, mobilisant les réserves d'énergie, augmentant la perception de la douleur [28].

Pour conclure ce paragraphe, les cellules microgliales sont activées par de nombreuses cytokines proinflammatoires. Cette stimulation promeut l'activité phagocytaire de la microglie, le recrutement de ces cellules vers les régions cérébrales inflammées, la prolifération des cellules microgliales activées et la sécrétion microgliale de radicaux libres, comme le NO ou les ROS, qui en concentration trop importante deviennent potentiellement neurotoxiques. En effet, les radicaux libres sont des molécules très réactives du fait de la présence d'un électron non apparié situé sur la couche externe des atomes qui les constitue. La tendance naturelle de cet électron à se réapparier peut déstabiliser l'ensemble des biomolécules et notamment les acides gras composant les phospholipides des membranes plasmidiques. Les radicaux libres agissent non seulement sur le plasmalemme mais ils déclenchent également un stress oxydatif au sein des neurones, déclenchant ainsi leur apoptose [121]. Aussi, toutes les cytokines agissant sur la microglie n'ont pas été mentionnées et pour cause, elles sont trop nombreuses. Un dernier exemple : les cellules microgliales sont aussi sensibles à certains facteurs de croissance comme le M-CSF, le GM-CSF ou l'IL-3. Ces molécules induisent une prolifération des cellules microgliales ou facilitent l'acquisition de leur activité phagocytaire [24, 164, 165].

Bien que les cellules microgliales possèdent un rôle neuro-protecteur [7, 29, 30, 79, 80], la microglie activée semble être à l'origine du développement de nombreuses pathologies du SNC [9, 16-19, 28, 107, 166]. En effet, plusieurs rapports suggèrent fortement l'implication des cellules microgliales dans l'initiation des processus inflammatoires au sein du SNC menant à divers troubles neurologiques sans pour autant démontrer que l'inhibition de la microglie réduise ou amplifie ces pathologies [25, 27]. La présence d'agents infectieux, de toxines, d'éléments pathogènes comme le peptide Aβ, de facteurs proinflammatoires au sein du SNC ou une lésion neuronale entraîne l'activation des cellules microgliales. Le terme « activation microgliale » inclut la prolifération de ces cellules, le

développement de leur activité phagocytaire, leur recrutement sur les zones inflammées et la production de protéines proinflammatoires qui peuvent perturber le phénotype de la BHE et induire le recrutement de cellules immunitaires périphériques dans le système nerveux. L'ensemble de ces phénomènes peut créer une sorte de boucle d'amplification de l'inflammation, menant à la dégénérescence des neurones.

Cependant, il est difficile de déterminer avec exactitude la place et l'importance de cette « activation microgliale » dans l'initiation et le développement des pathologies neuro-dégénératives. En effet, il devient impossible de différencier les cellules microgliales activées des cellules immunitaires infiltrées. De plus, le SNC des mammifères est caractérisé par la présence de neurones, de cellules microgliales, d'oligodendrocytes et d'astrocytes. Si les cellules microgliales sont les principaux censeurs de l'homéostasie du système nerveux, leur activation débouche sur l'émission de nombreux médiateurs, comme le glutamate, le PGE₂, le NO (monoxyde d'azote) et les facteurs neurotrophiques, pouvant soit stimuler les neurones et les astrocytes, soit induire leur mort cellulaire, soit les maintenir en vie et les protéger. L'ensemble des faits cités ci-dessus dénote une grande difficulté pour évaluer l'impact de l'activation microgliale dans la dégénérescence ou la réparation du SNC mammalien à la suite d'une atteinte. Pour finir, chez les vertébrés, la régénérescence des axones et des tissus nerveux lésés est limitée. Aucune étude n'a déterminé quelles interactions cellulaires interviennent dans les mécanismes neurorégénérateurs, ni mis en évidence une repousse axonale complète avec une restauration structurale et fonctionnelle des synapses. Les premiers travaux démontrant de tels phénomènes ont été menés sur un modèle invertébré : la sangsue médicinale, Hirudo medicinalis [31, 32, 36].

II. <u>Les phénomènes de réparation nerveuse chez la sangsue,</u> <u>*Hirudo medicinalis*</u>

Il existe environ 650 espèces de sangsues. Près de 300 espèces sont des ectoparasites temporaires d'animaux marins, terrestres ou d'eau douce. Parmi tous ces spécimens, la sangsue H. medicinalis est employée depuis des millénaires [167, 168], et l'est encore actuellement, en médicine pour son activité hématophagique. La sangsue médicinale est un Annélide d'eau douce. Elle ne possède ni parapode ni soie, elle appartient au groupe des Achètes. Cet animal dispose de mâchoires (Gnathobdellides) mais pas de trompe. Elle est répertoriée dans le groupe des Hirudinées. La sangsue médicinale, hématophage, est utilisée plus particulièrement dans les services de chirurgie plastique et traumatologiques, sur des personnes atteintes de troubles veineux ou ayant subit une greffe afin de favoriser le retour veineux au sein du ou des greffons. Cependant, depuis le milieu du XXème, de nouvelles applications thérapeutiques ont été découvertes. En 1949, les travaux des docteurs H. Bottenberg, R. Vendel, Bach et surtout, P.-E. Morhardt, ont permis de résumer les diverses utilisations de la sangsue et ses diverses propriétés. Ils tirent la conclusion suivante : « Les indications de la sangsue concernent d'abord les maladies du système veineux, notamment les thromboses et les embolies, les phlébites, les hémorroïdes, les inflammations phlegmoneuses, les abcès amygdaliens, beaucoup d'affections des yeux. Certains troubles mentaux en bénéficieraient également, de même la ménopause surtout compliquée de troubles circulatoires... ». Depuis, de nouvelles vertus ont été découvertes. En effet, la salive de la sangsue possède des propriétés anticoagulantes, antiphlogistiques, analgésiques et antibactériennes [169]. Des travaux de recherche récents ont permis de mettre en évidence une autre capacité : celle de traiter les troubles squelettiques et notamment ceux de l'arthrose. Cet effet anti-arthrosique ne peut être attribué à un constituant bien précis de la salive mais plutôt à un effet synergique tel que l'on pourrait l'observer avec une huile essentielle. [170-172]. Désormais la sangsue est moins employée pour son effet « saignée » et de plus en plus pour les propriétés thérapeutique de sa salive, ce qui a conduit les allemands à enregistrer la sangsue comme « médicament vivant » (« lebendes Arzneimittel ») mettant ainsi en avant les effets pharmaceutiques des composants de la salive.

Comme mentionné dans l'avant-propos, la sangsue médicinale se caractérise par une autre propriété : celle de réparer efficacement son système nerveux central à la suite d'une lésion. Or, le tissu nerveux cet animal est relativement simple, possédant une diversité cellulaire moindre [39], comparé aux SNC des mammifères. De plus, contrairement aux vertébrés, les invertébrés ne possèdent pas d'immunité acquise. La réponse immunitaire innée, médiée notamment par les cellules microgliales dans le SNC [25, 28, 45], consiste en une série de réactions rapides en cas d'infection par des microorganismes pathogènes ou de lésion. Par conséquent, la microglie est considérée comme le principal élément du système de défense présent dans le SNC de la sangsue H. medicinalis [8, 45]. D'ailleurs, de manière fort intéressante, les cellules microgliales ont été nommées ainsi suite aux observations faites par del Rio-Hortega dans le système nerveux central de la sangsue médicinale. Ensuite, les cellules microgliales ont été identifiées dans le système nerveux de vertébrés ainsi que dans celui d'autres modèles invertébrés, notamment chez les bivalves (Mytilus edulis), les mollusques (Planorbarius corneus, Helix aspersa) et les insectes (Leucophaea maderae) [28, 173]. Les cellules microgliales de vertébrés et d'invertébrés possèdent beaucoup de similitudes, notamment leur plasticité morphologique et leur motilité [5, 28, 42, 43]. Chez les vertébrés, une lésion du système nerveux central entraîne la mobilisation de cellules microgliales activées vers le site en question. Pareillement, une atteinte du système nerveux central d'escargot (Helix aspersa), de sangsue (Hirudo medicinalis), ou de moule (Mytilus edulis), déclenche une migration de cellules microgliales vers la zone lésée [14, 28, 42, 43, 47] (figure 8). Pour finir, si l'activation des cellules microgliales initie la genèse de pathologies neuro-dégénératives chez les mammifères, la microglie activée semble jouer un rôle fondamental dans les mécanismes de réparation du SNC chez la sangsue et chez d'autres modèles invertébrés [14, 42, 45, 47].

A. Le système nerveux de la sangsue

Situé dans le sinus sanguin ventral de l'animal (figure 7), le système nerveux central de la sangsue se compose d'une chaîne de ganglions reliés entre eux par deux connectifs inter-ganglionnaires. De plus, quatre nerfs segmentaires (deux antérieurs et deux postérieurs) partent de chaque ganglion constituant ainsi le système nerveux périphérique de l'animal. La chaîne nerveuse centrale débute par

quatre ganglions innervant la partie antérieure de la sangsue. Ces quatre ganglions sont fusionnés en deux masses : les ganglions supra-œsophagiens et les ganglions sous-œsophagiens. Les ganglions supra-œsophagiens ont un rôle dans la neurosécrétion et les ganglions sous-œsophagiens innervent la ventouse antérieure et les mâchoires. Ces deux masses sont reliées entre elles et forment le collier périœsophagien. Ensuite, chaque métamère de l'animal est innervé par un ganglion. Enfin, sept ganglions fusionnés forment un ganglion caudal volumineux innervant la ventouse postérieure de l'animal. L'ensemble de la chaîne nerveuse est enveloppée dans une capsule fibreuse. Elle ne dispose donc pas, à proprement parler, d'une barrière hémato-encéphalique.

L'architecture neuronale des ganglions segmentaires est bien caractérisée et est conservée d'un ganglion à un autre (phénomène de métamérisation) (figure 7). Les ganglions comportent environ 400 neurones, excepté les ganglions 5 et 6, innervant les régions génitales de l'animal, qui en contiennent près de 700. Au sein des ganglions, les corps cellulaires des neurones sont séparés en 6 follicules enveloppés chacun par une cellule gliale (cellule gliale des paquets) et de nombreuses cellules microgliales sont dispersées au sein du neuropile et du neuvrilème. Deux autres cellules gliales géantes sont également présentes dans le neuropile (neuropile glia) et une cellule gliale supplémentaire est associée à chaque connectif (cellules gliales des connectifs). Une cartographie précise du rôle de la plupart des neurones a été établie par Nicholls et Baylor [38]. Les corps cellulaires les plus volumineux sont associés aux sens : neurones T pour le toucher, neurones P pour la pression, neurones N pour la nociception. Les neurones de taille plus réduite sont impliqués dans d'autres fonctions comme la nage, la circulation sanguine ou encore l'activité sexuelle.



Figure 7 : Schématisation du système nerveux de la sangsue médicinale (d'après [1]). A. Structure générale de la sangsue avec une vue ventrale de sa chaîne nerveuse. B. Anatomie et localisation du SNC de la sangsue médicinale. C. Schéma d'un ganglion du SNC de la sangsue. 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 dispersées dans les ganglions et les 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).

Du fait de sa position anatomique, la chaîne nerveuse de la sangsue *Hirudo medicinalis* est un tissu accessible, facilement isolé de la circulation sanguine de l'animal. Sa structure, bien cartographiée, révèle une absence d'astrocytes ou d'oligodendrocytes. Par conséquent, l'étude de la réparation du système nerveux central de la sangsue semble plus aisée que celle faisant intervenir des modèles mammaliens. De manière intéressante, l'annélide *Platynereis dumerilii* présente un degré de proximité génomique avec l'homme plus important qu'avec les nématodes ou les ecdysozoaires [174, 175]. Or, la sangsue *Hirudo medicinalis* est également un annélide. Par conséquent, l'ensemble de ces données tendent à prouver que l'utilisation du modèle *H. medicinalis* dans l'analyse des mécanismes cellulaires et moléculaires de la réparation du SNC est judicieuse.

B. <u>La capacité de réparation nerveuse chez la sangsue</u> <u>médicinale</u>

Les premières études faisant état d'une reconnexion synaptique fonctionnelle ont été menées grâce aux connaissances obtenues sur la structure du système nerveux de la sangsue et de son innervation [31, 34, 38]. En effet, dans des expériences d'électrophysiologie, les chercheurs ont pu démontrer que, dans les jours suivant la lésion du SNC de l'animal, l'influx nerveux entre différents neurones sensitifs et moteurs se rétablit progressivement [32, 41, 176]. De fait, les axones des neurones lésés repoussent après avoir été sectionnés et les neurones se reconnectent entre eux de manière spécifique [32, 37, 38, 41]. De manière intéressante, bien que cela puisse dépendre de la composition du milieu de culture [177], les neurones de sangsue isolés et mis en culture sont capables de se régénérer et d'établir des connexions synaptiques [35, 178]. Enfin, des cellules nerveuses, prélevées puis réimplantées dans un autre ganglion, se sont intégrées dans le système nerveux d'accueil de la sangsue [33, 178]. L'ensemble de ces données souligne la grande plasticité du SNC de la sangsue et sa capacité de régénérescence. Cependant, de nombreuses questions biologiques, concernant les phénomènes cellulaires et moléculaires de la réparation nerveuse chez ce modèle, sont à élucider : Quels sont les mécanismes biochimiques ou cellulaires déclenchés par la lésion qui induisent la repousse des axones? Comment les neurites interagissent-elles avec la matrice extracellulaire ou comment entrent-elles en contact ? Quels facteurs sont sécrétés afin de maintenir la croissance neuritique et la repousse des axones endommagés ? Comment les cônes de croissance sont-ils guidés au travers de la section vers leur(s) cible(s) cellulaire(s) potentiel(s) ? Quel(s) phénomène(s) entraîne(nt) l'arrêt de cette repousse axonale et neuritique ?

Deux mécanismes, pouvant intervenir dans la régénérescence du système nerveux central de la sangsue, ont été étudiés. Premièrement, suite à une hémisection, c'est-à-dire à la coupure d'un connectif sur deux, la lésion est en quelque sorte remplie par le tissu conjonctif du connectif [33]. Des extractions protéiques de cette matrice extracellulaire ont été effectuées puis ont été utilisées dans la composition d'un milieu de culture afin d'y placer des neurones de sangsue isolés. Comparé à un milieu de culture basique comme la Concanavaline A (ConA), ce milieu permet d'accélérer et d'augmenter significativement la croissance neuritique des neurones prélevés. Cette expérience suggère donc fortement la présence de facteurs qui induisent la croissance neuritique dans la matrice extracellulaire des connectifs [177]. Ensuite, l'un des constituants de cette matrice extracellulaire a été identifié : il s'agit de la laminine [179]. Bien que la laminine de sangsue présente quelques analogies avec la laminine des vertébrés, cette molécule diffère de son homologue mammalien par son effet sur les neurones de sangsue. En effet, contrairement au milieu de culture contenant la laminine de sangsue, le milieu composé de laminine de vertébrés ne stimule pas la croissance neuritique des neurones de sangsue. En outre, des expériences immunohistochimiques, réalisées avec un anticorps spécifiquement dirigé contre la laminine de sangsue, ont montré que, suite à la lésion, cette protéine est redistribuée au sein du connectif. Cette molécule a notamment été localisée à proximité des axones lésés [44]. En parallèle, une accumulation de cellules microgliales de sangsue a été observée [42, 43]. Afin de déterminer le rôle joué par ces cellules, des expériences de déplétion ont été réalisées. Le fait d'éliminer les cellules macrogliales et microgliales semble perturber la repousse des axones lésés, promouvant la formation de synapses aberrantes [33, 41]. D'ailleurs, de manière intéressante, il semble que la redistribution de la laminine soit corrélée à la migration des cellules microgliales vers le site de la lésion [44]. Ces données suggèrent que les cellules microgliales de sangsue jouent potentiellement un rôle dans la réparation du système nerveux central.

C. Le recrutement des cellules microgliales

Pour comprendre les mécanismes de régénérescence, des ganglions prélevés sur une chaîne nerveuse de sangsue ont été mis en culture dans un gel de collagène puis des images par contraste de phase ont été prises (figure 8). Ces images montrent que les cellules microgliales sont rapidement mobilisées vers les sites de coupures et que cette migration est suivie d'une croissance des axones lésés [14]. Le recrutement des cellules microgliales ainsi que la repousse axonale sont visibles dans le gel. Cette expérience pratiquée sur des ganglions d'escargot (*Helix aspersa*) a donné des résultats similaires [14] (figure 9). Les travaux de von Bernhardi et Muller ont mis en évidence la restauration des synapses entre les neurones de sangsue lésés et la récupération de leurs fonctions [45]. L'inhibition du recrutement et de l'accumulation des cellules microgliales au site de lésion retarde la repousse des axones lésés et la reconnexion synaptique. Cela suggère fortement que ces deux mécanismes (le recrutement et l'accumulation des cellules microgliales) sont essentiels à la réparation du système nerveux central chez la sangsue [47].



Figure 8 : Mobilisation des cellules microgliales au niveau d'un ganglion de sangsue médicinale mis en culture [14]. A. Aperçu du ganglion avant la mise en culture. B. Image en contraste de phase d'un ganglion après 5 jours de culture sur gel de collagène. Le ganglion est entouré par les cellules microgliales ayant migré dans le gel et, à partir des extrémités lésées, des axones sont en train de croître.



Figure 9 : Mobilisation des cellules microgliales au niveau de ganglions d'escargot (*Helix aspersa*) mis en culture sur gels de collagène [14]. A. Sur une paire de ganglions buccaux maintenus 13 jours en culture, il est possible de remarquer une forte excroissance au niveau des extrémités coupées et les ganglions sont entourés d'un halo de cellules microgliales ayant migré dans le gel. B. Sur ces ganglions sub-œsophagiens, maintenus 12 jours en culture, et dépourvus de leur capsule extérieure, une boucle de connexion à été réalisée entre des neurites de deux racines nerveuses adjacentes. C. Sur ces quatre ganglions supra-œsophagiens, cultivés pendant 14 jours et dont la capsule extérieure a été maintenue, il est possible de visualiser un fort afflux de cellules microgliales.

Chez la sangsue, les cellules microgliales migrantes subissent un changement de phénotype similaire à celle observée lors de l'activation des cellules microgliales chez les vertébrés [14, 42, 45]. Possédant une morphologie stellaire à l'état quiescent, les cellules microgliales de sangsue deviennent amiboïdes, mobiles et développent des capacités de phagocytose en réponse à une détérioration du SNC [8, 28, 173]. Il est, en effet, possible de les identifier et de suivre leur migration avec un marquage nucléaire de type Hoechst (figure 10), sans risquer de les confondre avec d'autres types cellulaires en effet, le système nerveux central de la sangsue pouvant être isolé de la circulation sanguine, il est possible d'éviter toute infiltration de macrophages périphériques. De plus, au sein de ce système nerveux, il n'existe qu'une seule cellule gliale géante entourant les axones des connectifs et qui s'étend sur plus de 5 mm entre les ganglions.

Les études ont montré que les cellules microgliales migrent vers la région endommagée avec une vitesse de 7µm/min si elles sont localisées à environ 400µm de la lésion [8, 43] (figure 10). Certains facteurs produits à la suite de la lésion provoquent le recrutement de la microglie vers la région lésée [8, 46, 180] (figure 10). L'un de ces facteurs est le NO (monoxyde d'azote). Rapidement libéré à la suite d'une lésion, cette molécule est essentielle pour l'accumulation des cellules microgliales au niveau du site endommagé ainsi que pour les processus de réparation [181, 182]. Cependant, une forte concentration de NO inhibe le recrutement des cellules microgliales [46]. Ces données soulignent l'importance du recrutement dose-dépendant médié par le NO sur la microglie de la sangsue. En effet, dans un premier temps, la libération du NO permettrait d'activer et attirer les cellules microgliales vers la lésion. Puis, dans un second temps, sa forte concentration stopperait la migration des cellules au niveau du site endommagé, permettant ainsi leur accumulation. Le NO agirait également sur la croissance neuritique. Il interviendrait donc dans la repousse des axones lésés [183]. En effet, chez les invertébrés, le NO est connu pour son rôle dans la croissance des neurites. L'inhibition du NO, chez des embryons de criquet, altère le processus de régénérescence des connectifs inter-ganglionnaires. Des enzymes apparentées aux NOS des vertébrés ont d'ailleurs été identifiées dans le SNC et les organes périphériques de mollusques [184] et d'insectes [185]. Chez l'escargot d'eau douce (Corneus planorbarius), l'expression d'iNOS est activée dans certains neurones et dans les cellules microgliales suite à une stimulation médiée par le LPS. Par conséquent, les taux de NO augmentent dans le SNC de l'escargot en cas d'infection par des bactéries Gram négatif. En revanche, les taux de nNOS ne varient pas au sein des neurones, même en cas de challenge bactérien. Cette enzyme est donc synthétisée de manière constitutive [186].

Ces données montrent l'importance des facteurs libérés à la suite d'une lésion du système nerveux central de la sangsue. Des expériences de chimiotactisme menées au sein du laboratoire, ont mis en évidence les propriétés chimioattractantes du milieu ayant incubé pendant 24 heures des systèmes nerveux lésés (milieu conditionné) (figure 11). Afin d'appréhender les mécanismes de recrutement des cellules microgliales au sein du système nerveux de la sangsue, nous avons souhaité isoler les facteurs responsables du recrutement des cellules microgliales présents dans ce milieu conditionné.



Figure 10 : Mobilisation des cellules microgliales (d'après [8] pour les images A, B et C ; résultat expérimental obtenu au sein du laboratoire en D). (A). Migration et accumulation des cellules microgliales au niveau du connectif 6h après la lésion. (B et C) Expériences d'immuno-marquages obtenus 6h après la lésion en employant des anticorps spécifiques anti-eNOS (B) et (C) anti-cGMP. (NB : NOS est une enzyme impliquée dans la production du NO. Le cGMP est également produit à la suite d'une lésion) En (D), observation de la migration des cellules microgliales, du ganglion vers de site de lésion, obtenue à l'aide d'un marquage au Hoechst. Image obtenue par microscopie confocale.



Figure 11 : Effet chimioattractant du milieu conditionné 24h à différentes concentrations (0 ; dilué au ¹/₄ ; dilué au ¹/₂) sur les cellules microgliales de sangsue.

III. Les objectifs du travail de thèse

La constitution puis l'analyse d'une banque normalisée d'EST construite à partir d'ARN totaux de système nerveux de sangsues adultes ont permis de détecter deux protéines potentiellement chimioattractantes : une molécule apparentée à l'interleukine 16 (IL-16) humaine, *Hm*IL-16 (pour *Hirudo medicinalis* IL-16) et une molécule homologue au C1q humain, *Hm*C1q (pour *Hirudo medicinalis* C1q) [1, 5] (figures 13 et 19).

A. <u>Etude de HmIL-16 et de son implication dans le recrutement</u> <u>des cellules microgliales</u>

1. L'interleukine-16 (IL-16) chez les mammifères

Chez l'homme, l'IL-16, également appelée LCF, a été décrite comme facteur chimioattractant des lymphocytes [187-189]. La fonction est exclusivement attribuée à la partie C-terminale sécrétée, définie comme la forme active de l'IL-16, qui est issue de la maturation de la prolL-16 (figure 12). La forme N-terminale qui en résulte est impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire. Sa maturation est permise par l'action de la caspase 3 [190]. L'IL-16 est produite par les lymphocytes T CD8+ et, une fois libérée puis auto-agrégée sous forme multimérique, induit le chimiotactisme des cellules CD4+, des monocytes et des polynucléaires éosinophiles [191, 192]. L'étude de sa fonction chimioattractante a permis de définir l'IL-16 active comme le ligand naturel de la molécule CD4. Ce récepteur est une glycoprotéine transmembranaire 55 kDa d'environ composée de quatre domaines immunoglobulines numérotées D1, D2, D3 et D4. La forme active de l'IL-16 se lie, via une séquence peptidique «RRKSLQKETTAAGDS » située à l'extrémité C-terminale du domaine PDZ, sur le domaine D4 du CD4 [6, 192-196]. Un peptide homologue à cette séquence, 106RRKSLQKETTAAGDS120, employé dans des expériences de recrutement de cellules humaines CD4+, est un inhibiteur compétitif de l'IL-16 humaine. Les expériences de mutagenèse dirigée ont prouvé que l'arginine 107 (R107) joue un rôle fondamental dans le recrutement des cellules humaines [195]. Par sa capacité à se lier au CD4 avec une grande affinité, certains auteurs ont décrit les effets suppressifs de l'IL-16 sur la réplication du virus HIV1 [197-199]. Sa liaison au CD4 interfère également avec la formation du complexe du TCR (récepteur des cellules T) qui utilise la molécule CD4 dans la reconnaissance du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe 2 couplé à l'antigène. Ainsi, l'IL-16 se fixe au CD4 et engendre une réaction proinflammatoire caractérisée notamment par un recrutement cellulaire important, empêchant de ce fait l'activation antigénique via le complexe TCR. La présence ou non de la forme active de l'IL-16 joue par conséquent un rôle pivot dans la régulation de la réponse immunitaire [6]. Récemment, de nombreuses études ont impliqué l'IL-16 dans le développement de maladies infectieuses et/ou inflammatoires auto-immunes, incluant entre autre des infections virales, l'asthme, l'arthrite rhumatoïde, des dermatites, ou encore le lupus érythémateux systémique (SLE). Concernant cette dernière pathologie riche en travaux, certains auteurs suggèrent que le rôle immuno-modulateur de l'IL-16 très important dans la maladie engendre une baisse de la sensibilité des patients face au virus HIV [200].

De plus, la cytokine a été détectée dans le système nerveux central. Dans un premier temps, certains auteurs ont décrit l'existence d'une forme neuronale de l'IL-16 appelée NIL-16 [201]. En effet, jusqu'à cette étude, la cytokine ne fut détectée et étudiée en détail que dans le système immunitaire [202]. Dans les cellules immunitaires, la prolL-16 est une protéine de 67 kDa contenant 3 domaines PDZ (PDZ pour Postsynaptic density/Disc large/Zona occludens-1). La forme neuronale du précurseur (nprolL-16) est plus grosse (141 kDa). Sa région N-terminale plus longue contient, en effet, deux domaines PDZ supplémentaires (figure 12). Dans un second temps, certains travaux ont montré qu'après maturation des précurseurs, les parties N-terminales, également nommées prodomaines, peuvent exercer des fonctions biologiques identiques ou différentes du fait de leurs structures respectives. Après maturation de la npro-IL-16, le prodomaine interagit avec l'extrémité cytoplasmique de nombreux canaux ioniques neuronaux. Il se fixe notamment à la sous-unité α1 des canaux calciques de type C, aux sous-unités des récepteurs NMDA (récepteurs au glutamate) et aux canaux potassiques de type Kir. Cette liaison est due à l'interaction entre un domaine PDZ et une séguence consensuelle X-S-X-V/I/L présente sur ces canaux ioniques [201]. Un mécanisme similaire a été observé dans la reconnaissance de la protéine Tax par le premier domaine PDZ (PDZ1) des prodomaines de la npro-IL-16 et de la pro-IL-16. Tax est une molécule de 40 kDa encodée par le virus HTLV-1 (Human T cell leukemia virus type 1). Elle régule les processus de la cellule hôte en agissant notamment sur la transcription et le cycle cellulaire. L'interaction Tax/PDZ1 déclenche le passage du cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S. Par conséquent, le domaine PDZ1, présent au niveau des extrémités N-terminales des précurseurs de l'IL-16, est probablement impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire [203]. Par ailleurs, le prodomaine de la pro-IL-16 comporte non seulement deux domaines PDZ mais aussi un motif CcN (signal de localisation nucléaire ou NLS) et deux sites de fixation pour deux enzymes impliquées dans la progression du cycle cellulaire – la caséine kinase kinase (CK2) et la cdc2 kinase [203, 204]. Le motif CcN permet de bloquer l'action de la protéine Skp2 (S-phase kinase -associated protein) impliquée dans la dégradation de la molécule p27kip1. Or, p27kip1 induit l'arrêt du cycle cellulaire en maintenant les cellules en phases G0/G1. L'ensemble de ces données permet de supposer que l'extrémité N-terminale de la pro-IL-16 et de la npro-IL-16 joue un rôle dans la régulation et le maintien du cycle cellulaire en phases G0/G1. Cependant, les prodomaines semblent être également impliqués dans la motilité ou la morphologie des cellules. En effet, le deuxième domaine PDZ peut interagir avec trois sousunités, MYPT1, MYPT2 et MBS85, des myosines phosphatases [205]. Ces interactions peuvent provoquer une redistribution de l'actine et de la myosine au sein des cellules et donc, contrôler leur activité contractile ou modifier la position des canaux ioniques [206-210].

Toutefois, la forme active de l'IL-16, résultant de la maturation de la npro-IL-16, est identique à celle de la forme immunitaire et exerce une fonction chimioattractante dans le système nerveux [211]. De manière très intéressante, l'IL-16 est impliquée dans certaines pathologies neuro-dégénératives [6, 211]. Le processus de développement de la sclérose en plaque, très bien documenté, implique une réponse inflammatoire exacerbée et une production renforcée de l'IL-16 active chez les patients atteints [212]. L'utilisation du modèle murin d'encéphalite autoimmune expérimentale (EAE) génère des résultats qui vont dans ce sens. En effet, le taux d'IL-16 est élevé dans le système nerveux de tels modèles et semble être corrélé au taux de lymphocytes T CD4+ infiltrants [213, 214]. Il est d'ailleurs très intéressant d'observer qu'une neutralisation de l'IL-16 avec un anticorps monoclonal permet de supprimer la paralysie qui avait été induite expérimentalement 7 jours auparavant [215]. Il est important de souligner que la forme active de l'IL-16 semble être ici en partie d'origine lymphocytaire. La part d'IL-16 neuronale impliquée dans le processus reste à définir. Toujours dans le système nerveux, une localisation microgliale de l'IL-16 a été détectée à travers l'étude de modèles murins de type EAE, de neurotoxicité (déclenchée par trimethyltin) ou encore après lésion expérimentale de la colonne vertébrale [216, 217]. Dans le modèle EAE, les auteurs montrent par ailleurs que les cellules microgliales impliquées sont toutes positives en IL-16, ce qui permettrait de l'utiliser comme marqueur spécifique de l'activation microgliale [216]. Aussi, de récents travaux ont montré que l'activation des cellules microgliales par divers facteurs induit la production de l'IL-16 dans ces cellules. Les facteurs incriminés sont l'IL-12, l'IL-23, les LPS, le TNF- α et l'IFN- γ . De manière intéressante, l'IL-16 agit de manière paracrine/autocrine sur les cellules microgliales et déclenche ainsi sa propre production [218, 219].



Figure 12 : Mécanismes de production de la forme active de l'IL-16 (d'après [6]). La forme active de l'IL-16 humaine ne représente que la partie C-terminale de deux précurseurs : la pro-IL-16, de 67 kDa, exprimée par les cellules immunitaires périphériques et la pro-NIL-16, de 140 kDa, identifiée dans les neurones. Ces deux précurseurs sont clivés par la caspase 3 sur un site aspartate. Suite à cette maturation enzymatique, la forme active est libérée dans le milieu extracellulaire puis se tétramérise afin d'exercer une activité chimioattractante sur ces cellules cibles : les cellules CD4+.

2. Une molécule analogue à l'IL-16 mammalienne (d'après [5])

L'analyse des banques de données a permis d'identifier, dans un premier temps, une molécule apparentée à l'IL-16 mammalienne. La séquence nucléotidique partielle de *Hm*IL-16 dont nous disposons est constituée de 784 nucléotides dont 348 forment la fin du cadre de lecture (figure 13A).

Α			В		
1	gaaggaattcaacgttcaatcccacgtaattccacgctaagaacatccgggatcgaaagt E G I Q R S I P R N S T L R T S G I E S	20	Protein ID	Common name (scientific name)	Homology
61	${\tt tcaaaggtcagagatgaagttgtgaactttgacacaaccacggtgaagttggagaagggc}$		ref XP_784502.2 similar to interleukin-16 precursor	Purple urchin (Strongylocentrotus purpuratus)	67%
121	the structure and the structur	40	ref XP_317940.4 AGAPD11384-PA	African malaria mosquito (Anopheles gambiae)	65%
	F L G V G F C I E G G R A S P Y G D K P	60	emb CAD70074.2 interleukin-16	Rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)	65%
181	atcctgataaaaagggttgtcagaggtgacgttcccttgagagcaggtgatgagtggtg		gb AAC04383.1 interleukin-16 precursor	House mouse (Mus musculus)	65%
241		80	ref[XP_001606112.1] similar to prIL-16	Jewel wasp (Nasonia vitripennis)	64%
	S V N G K E V S S M T S A Q V W S L L K	100	gb[AAX36076.3] interleukin 16	Pufferfish (Tetraodon nigroviridis)	64%
301	${\tt tcacttccaggtggagtgatggtgctggagttgagaaggaag$		gb AAB36371.2 prIL-16	Human (Homo sapiens)	62%
261		115	gb AAB35768.1 interleukin-16	African green monkey (Cercopithecus aethiops)	62%
421	taatgatgactgagaaggaaggaaggaaggaaggaaggaa		ref NP_998916.1 interleukin 16	Pig (Sus scrofa)	61%
481	agattgaaaagttgaaagettetetteatgtgactaettttaaatgagetgteteacate		ref XP_001121687.1 similar to interleukin 16 precursor	Honey bee (Apis mellifera)	58%
541	ttcagtgcttgcatttctttcgattggaattttttgcgaccaattttcatcgagttatt		ref NP_001068721.1 interleukin 16	Cattle (Bos taurus)	58%
601	ttgeaaataattgegaaaatgaetttgatttgggggattatttegatttgeetegaaaat		gb AAO18640.1 interleukin 16	Chicken (Gallus gallus)	58%
721	actcattatgtcaagoggagaattgataaaaacaaataaaaagcacaaaattccaatta		gb AAM73549.1 AF294320_1 interleukin-16 precursor	Mallard duck (Anas platyrhynchos)	56%
C	aaaa				
	1				143
Vaer	IN KGIQRSIPRNSTLRTSGIKSSKVRDEVVNFDTTTVKLKKGFIGVGFCIKG GNDLDNDTREVETIVRGVRTNGVTRNTANGDALHVENVKDGAGLGRGLKG	GRAS	PIGDEPILIERVVRGDVPLRAGDELVSVNGEEVSSNT:	SAQYWELLKSLPGGVMVLKLRRKE	
Hone	y bee SCKLKSRTASVETIIEGFETNDTAEDTAWGPPSVVAVYKDGTGLGFSLEG	GRDS	PLGNRPLLIKKIFTGGAAEKTGALKAGDQLLQVNGYDVTRMS)	RI EAWELMKKLHDGEVNLLVRHPATKSS	
Mosq	uito DGTASEDGLLSADDVSKCSSSNATDNVPEG-CRHVEINEDGAGLGFSIEG	GYDS	PAGNKPLII <mark>K</mark> KIFMGGAAEKSGL <mark>LRA</mark> GEEIVAI <mark>N</mark> DISIAK <mark>M</mark> TI	RIQ VW NMMKKLPNGGVRITLK	
Purp	le urchin QALGLLKTKRKDVVLVVARPLELEETEEGETEDVEMAKGPAGLGFSVEG	G <mark>R</mark> GS	<mark>P</mark> KGDQPITI <mark>K</mark> KIFIGGVADRSGL <mark>L</mark> HVGDEIVEV <mark>N</mark> GRRLSNLTI	HFEAWIFLKAVPSGMVKLKIKKPSKKGDEKDEGKDGVL	SEEVSASLE
Puff	erfish EGAKEGRSMDESGVTGVSPPVNCVSVEVQGGPITVKIIKGAAGVGFTLEG	GKGS	IHGDRPLVINRIFTDDDALKMGDVLLQVQDVSVQE <mark>M</mark> TI	RFEAWNLVKSLPEGPVTVVIARKTG	
Rain	bow trout GREGGGGKKTDDSSVSSSSTDLNPTVEDGGDMLTLELETGGGGVGFSLDG	GKCS	IHGDRPLVINRIFKGGAAEQSG-LQSGDELLQVQSTSLQELS	RFEAWNIVKALPEGHITLVIRRRKEDEAEGSA	
Duck	CONCEPTION OF CO	GRGS.	INCOMPTIINELF AGTS LEQS FVQ FGDELLQVETTALQGLT	FRAMMIIKALPDGPITALIKKANPSSVIKASETL	
Mous	e BATHDLNSSTDSAASAASDISVES-KEATVCTVTLEKTSAGLGFSLEG	GKGS	LHGDKPLTINRIFKGDRTGEMVOPGDEILOLAGTAVOGLT	RE BAWWVIKALPDGPVTIVIRETSLOCKOTTASADS	
Pig	BASPDLNSSTDSAASVSVASDISIDS-TEATVCTVTLEKTSAGLGFSLEG	GKGS	LHGDKPLTINRIFRGAASEQNETIQPGDEILHLAGTAVQGLTI	RF KAWNI IKALPDGPVTIVIRRKSLQSKGTTGAGDP	
Catt	le EATTOLNSSTDSSGSASVTSDVSIES-AEATVCTVTLEKTSAGLGFSLEG	GKGS	LHGDKPLTVNRIFKGLASEQSDTVQPGDEIVHLAGTAMQGLT	RF KAWNI IKALPDGP VTI VLRRKSLQSKGTPAAGDP	
Monk	ey ESMPDLNSTTDSAASASAASDVSVESSAEATVYTVTLEKMSJGLGFSLEG	GKGS	LHGDKPLTINRIFKGAASEQSETIQPGDEILQLAGTAMQGLTI	RFEAWNIIKALPDGPVTIVIRRKSLQPKETTAAADS	
Huma	IN EAMPDLNSSTDSAASASAASDVSVESTAEATVCTVTLEKMSAGLGFSLEG	GKGS	LHGDKPLTINRIFKGAASEQSETVQPGDEILQLGGTAMQGLT)	RFEAW IIIKALPDGPVTIVIRRKSLQSKETTAAGDS	

Figure 13 : Identification de la molécule *Hm*IL-16 [5]. (A) Séquences nucléotidiques et protéiques (avec numérotation respectivement à gauche et à droite). La région surlignée en gris correspond au domaine PDZ. (B) Homologies de séquence par comparaison BLAST-P avec les données Swissprot. (C) Alignement multiple montrant les motifs communs avec les séquences homologues. Les degrés de conservation (moyen et haut) sont représentés respectivement en bleu et en rouge.

Cette région a révélé après traduction la présence d'un domaine PDZ situé à l'extrémité C-terminale (représenté en gris dans la séquence). Des comparaisons aux banques de données Swissprot ont déterminé son homologie avec la forme active de plusieurs IL-16 de vertébrés ainsi que des formes putatives d'invertébrés n'ayant donné, à ce jour, aucune étude fonctionnelle (figure 13B). Aucune homologie significative n'a été observée avec une autre molécule. La protéine résultante a été nommée HmlL-16 (Genbank Accession Number # EU629212) et déposée le 1er Juillet 2008 sur le site NCBI. Ce domaine PDZ contient un motif GVGF situé au même endroit que le domaine GVGF de la pro-IL-16 du poisson Tetraodon nigroviridis (figures 13A et 13C, encadrés). Chez H. medicinalis, comme chez T. nigroviridis, ce motif s'aligne parfaitement avec le motif GLGF d'autres IL-16, spécifique du domaine PDZ. Le dernier domaine PDZ en position C-terminale des IL-16 mammaliennes ne peut assurer ses propriétés de liaison protéine-protéine à cause de l'interaction entre GLGF (ou GVGF) et un résidu tryptophane portés par ce même domaine. De manière intéressante, HmlL-16 pourrait présenter également cette caractéristique car son domaine PDZ contient un tryptophane en position similaire (figures 13A et 13C, encadrés) [5].

3. <u>Cellules microgliales de sangsue et IL-16 humaine (d'après [5])</u>

Afin de vérifier la capacité des cellules microgliales de migrer en réponse à l'IL-16, des tests de chimiotactisme ont été réalisés. Dans un premier temps, des cellules microgliales fraîchement préparées à partir de chaîne nerveuse de sangsue ont été testées en présence de diverses concentrations d'IL-16 humaine recombinante. De manière dose-dépendante, la molécule humaine exerce un effet chimiotactique vis-à-vis des cellules de sangsue (figure 14A). Cette donnée est importante car elle met en exergue la présence probable de récepteurs reconnus par l'IL-16 humaine à la surface de sous-populations de cellules microgliales de sangsue. De plus, l'effet chimioattractant du milieu conditionné (cf. paragraphe II.C.) est fortement réduit lorsque les cellules microgliales sont préincubées avec un anticorps monoclonal de souris anti-IL-16 humaine fourni par le Dr. WW Cruikshank (figure 14B). De manière intéressante, un effet inhibiteur similaire est obtenu lorsque les cellules sont préincubées avec l'anticorps spécifique anti-IL-16 de sangsue (anti-HmlL-16) (figure 14B). L'utilisation du sérum préimmun dans cette expérience ne montre aucune diminution de la migration cellulaire, ce qui atteste de la spécificité de l'action chimioattractante. De plus, l'utilisation de l'anticorps polyclonal anti-HmlL-16 par Western Blot a permis d'observer à partir de milieu conditionné un produit dont la taille (~22 kDa) s'apparente à celle de la forme active d'IL-16 mammaliennes (figure 14D). Ce produit n'est pas détecté avec le sérum préimmun. La forme active de la molécule apparentée à l'IL-16 (HmIL-16) serait donc présente dans le milieu d'incubation du système nerveux afin d'assurer le recrutement des cellules microgliales. Des expériences ex vivo réalisés sur des connectifs lésés ont permis d'observer les mêmes phénomènes de migration dans un délai de 4 heures. En effet, un écrasement du connectif déclenche naturellement l'accumulation de cellules microgliales sur le site de lésion alors qu'une injection de l'anticorps anti-HmlL-16 dans le connectif simultanément à la blessure ne montre (après 4 heures) aucune migration significative des cellules microgliales (figure 14C). Les injections contrôles de sérum préimmun (figure 14C) simultanément à la blessure ont montré une accumulation normale des cellules microgliales après 4 heures. L'effet neutralisant de l'anti-HmIL-16 met en évidence, une fois encore, le rôle de notre molécule d'intérêt dans ce processus de recrutement cellulaire. Ces expériences ont donc permis d'appréhender l'action de HmlL-16 sur les cellules microgliales dans un contexte cellulaire proche du processus *in vivo* et confirment nos résultats de tests *in vitro*.



Figure 14 : Effet chimioattractant de l'IL-16 humaine et de *Hm*IL-16 sur les cellules microgliales de sangsue [5]. (A) Effet chimioattractant dose-dépendant de l'IL-16 humaine. (B) Effet d'une pré-incubation des cellules microgliales avec du L-15 (**a**), avec l'anticorps anti-IL-16 humaine (**b**), avec l'anticorps anti-IL-16 de sangsue (*Hm*IL-16) (**c**) et avec le sérum préimmun de l'anti-*Hm*IL-16 (**d**). Les expériences sont réalisées en triplicat. (C) Observation de l'accumulation des cellules microgliales marquées au Hoechst 33258 sur des fragments de chaînes nerveuses lésées (Contrôle négatif : écrasement avec injection de sérum préimmun à l'intérieur des connectifs ; Anti-*Hm*IL-16 : écrasement avec injection simultanée de l'anticorps polyclonal anti-*Hm*IL-16 à l'intérieur des connectifs). La barre d'échelle correspond à 100µm. (D) Analyse par Western Blot des extraits protéiques de milieu conditionné en utilisant respectivement l'anticorps polyclonal anti-*Hm*IL-16 et le sérum préimmun.

L'analyse immunohistochimique utilisant l'anticorps polyclonal anti-*Hm*IL-16 a révélé que la protéine est présente constitutivement au niveau des corps cellulaires neuronaux et des cellules microgliales dans les ganglions (figure 15A). De manière intéressante, le signal est observé de façon plus intense au niveau des mêmes cellules 24 heures après la lésion (figure 15B). Ceci montre une augmentation du taux de la protéine à la suite de la lésion. Le marquage est localisé dans certains neurones à la périphérie du cytoplasme sous une forme visiblement vésiculaire

(figure 15C), ce qui suggère un transport actif vers l'extérieur de la cellule et/ou vers les axones. En revanche, aucun signal n'est détecté pour les cellules microgliales migrant vers la sortie du ganglion immédiatement après lésion (figure 15F). L'analyse du site de lésion (immédiatement après la blessure) montre, par ailleurs, la présence de HmlL-16 sur les extrémités axonales lésées alors que les cellules microgliales ne sont pas encore accumulées (figure 15D). L'ensemble de ces observations suggère que HmlL-16 pourrait être produit par les neurones à l'état basal et libéré très vite pour exercer son action chimioattractante sur une sous-population de cellules microgliales. Cette hypothèse est corroborée par des analyses en western blot réalisées sur des milieux d'incubations très courtes de chaînes nerveuses lésées. A partir des extraits protéigues de ces milieux, il est possible, en utilisant l'anticorps polyclonal anti-HmIL-16, de détecter la molécule dans les minutes qui suivent la lésion (résultat non présenté). En outre, les analyses d'immuno-marquages ne montrent un signal positif au niveau des cellules microgliales qu'à partir de 72 heures après la lésion (figure 16E). Or, les cellules se sont accumulées au site de la blessure dans les premières heures suivant la lésion expérimentale (environ 4 heures post-section) mais ne présentent aucun signal positif pour la protéine HmlL-(observations immunocytochimiques effectuées sur des accumulations 16 microgliales après 24 et 48 heures non présentées). Par conséquent, les cellules microgliales répondent au facteur chimioattractant mais ne semblent pas le produire rapidement. Le signal observé après 72 heures suggère que les cellules accumulées pourraient entretenir le recrutement cellulaire à plus long terme en produisant ellesmêmes le facteur chimioattractant. Notons que les expériences ayant utilisé le sérum préimmun comme contrôle négatif n'ont montré aucun signal (Figures 15A' et 15B'). En outre, des tests d'immuno-marquages complémentaires montrent qu'en effectuant des ligatures de part et d'autre des ganglions, la cytokine n'est plus libérée au niveau de la zone endommagée (figure 15E). Cela suggère un transport de la cytokine du corps cellulaire des neurones vers l'extrémité des axones lésés.

Des expériences d'hybridation *in situ*.ont été réalisées à partir de fragments de chaîne nerveuse lésée (figure 16A) afin de vérifier la possibilité d'une induction de l'expression du gène *Hm*IL-16 au cours du temps. Elles ont montré que le taux de transcrit *Hm*IL-16 est augmenté au cours de la réponse à la lésion dans les cellules microgliales qui s'accumulent au site de lésion (figures 16B et 16C, flèche). Enfin,

l'utilisation d'une sonde sens contrôle sur des connectifs lésés ne permet la détection d'aucun signal (figure 16D) malgré l'observation de l'accumulation cellulaire (figure 16D, flèche), ce qui atteste de la spécificité de l'expérience. Les cellules microgliales accumulées 24 heures après la blessure présentent une augmentation du taux d'ARNm de *Hm*IL-16. L'ensemble de ces expériences suggère que la production microgliale de *Hm*IL-16 est sous le contrôle du processus de recrutement.



Figure 15 : Analyses immunohistochimiques utilisant l'anticorps anti-*Hm*IL-16. Les observations sont réalisées immédiatement (A, A', D, E et F) et 24 heures (B, B' et C) après la lésion. Les prises de vue sont faites à l'intérieur du ganglion (A, B et C) ainsi qu'au niveau des connectifs (D, E et F). Les flèches blanches et la tête de flèche représentent respectivement des corps cellulaires neuronaux et les sites de lésions. Les inserts A' et B' montrent des tissus similaires analysés avec le sérum préimmun. En (D et E), les expériences de ligatures sont représentées. (D) Ligatures faites en amont des ganglions. Libération de *Hm*IL-16 à partir des extrémités des axones. (E) Ligatures faites en amont et en aval des ganglions. *Hm*IL-16 ne semble plus être libérée au niveau de la zone de lésion. En (F), analyse immunohistochimique en utilisant l'anticorps anti-*Hm*IL-16 au niveau des cellules microgliales migrant vers la lésion. Les cellules microgliales migrantes ne présentent aucun signal avec l'anticorps anti-*Hm*IL-16.


Figure 16 : Détection des transcrits *Hm*IL-16 par hybridation *in situ* en fluorescence (marquage au FITC). (A) Les quatre premiers ganglions ainsi que le cerveau sont prélevés afin d'être traités. Un des deux connectifs est lésé par écrasement (crush). Les connectifs entre les ganglions 2 et 3 sont laissés intacts. Toutes les observations sont faites 24 heures après les lésions. Une détection des transcrits *Hm*IL-16 est réalisée avec une sonde contrôle antisens (C) et une sonde sens (D). En parallèle, la visualisation des noyaux des cellules microgliales est effectuée par un marquage au Hoechst 33258 (B, D). Les flèches indiquent les emplacements de chaque lésion effectuée correspondant à une accumulation de cellules microgliales. (E) Analyse immunohistochimique utilisant l'anticorps anti-*Hm*IL-16. La prise de vue est faite à l'intérieur des connectifs, 72h après la lésion.

En conséquence, l'ensemble des expériences descriptives (localisation des ARNm et protéines) et fonctionnelles (chimiotactisme *in vitro* et *ex vivo*) montre qu'à la suite d'une blessure, *Hm*IL-16 est libéré afin d'exercer un effet chimioattractant permettant aux cellules microgliales de s'accumuler au site de lésion. Les cellules neuronales pourraient libérer le facteur chimioattractant au niveau des extrémités axonales lésées pour favoriser la migration des cellules microgliales. Puisque les cellules microgliales accumulées dans les premières 24 heures sont positives en transcrit *Hm*IL-16 mais ne montrent aucune présence de la protéine, il est possible que *Hm*IL-16 microglial soit plus tardivement produit puis libéré localement pour accentuer le recrutement de nouvelles cellules microgliales au site de lésion.

5. <u>Le récepteur de *Hm*IL-16 : sur la piste d'un potentiel *Hm*CD4</u>

Comme décrit précédemment, les tests de chimiotactismes ont montré que : 1/ Les cellules microgliales de sangsue migrent de façon dose-dépendante à un gradient d'II-16 humaine (figure 14A).

2/ Le MC permet le recrutement des cellules microgliales de sangsue (figure 11) et ce recrutement est inhibé lorsque les cellules sont préincubées soit avec l'anticorps anti-IL-16 humaine, soit avec l'anticorps anti-*Hm*IL-16 (figure 14B).

Ces résultats suggèrent fortement l'existence d'un récepteur reconnu par l'IL-16 humaine à la surface des cellules microgliales de sangsue. De plus, des tests de chimiotactismes, réalisés sur des lymphocytes T CD4+ humains, ont mis en évidence le recrutement dose-dépendant médié par le milieu conditionné (MC) ou l'IL-16 humaine sur ces cellules (figure 17A). Les effets chimioattractants de ces deux composés sont inhibés soit en présence de l'anticorps anti-IL-16 humaine soit avec l'anticorps anti-*Hm*IL-16 (figure 17A). De plus, l'emploi de CD4 soluble ou de peptide de synthèse (106RRKSLQETTAAGDS120), dans des tests de chimiotactisme similaires, réduit de moitié le recrutement des lymphocytes T CD4+ humains médié par le milieu conditionné (figure 17C). L'effet chimiotactique du milieu conditionné est bien ciblé sur les cellules humaines CD4+ et non sur des lymphocytes T CD8+ comme cela est souligné dans la figure 17B.

L'ensemble de ces données expérimentales permet de supposer la présence d'une molécule analogue au CD4 humain à la surface des cellules microgliales de sangsue et, par conséquent, une analogie de fonction entre la forme active de l'IL-16 humaine et *Hm*IL-16. Cependant aucune molécule analogue au CD4 humain n'a été détectée suite à l'analyse de la banque EST de sangsue. C'est pourquoi, il est nécessaire d'isoler la molécule reconnue par l'anticorps anti-CD4 humain et de la caractériser.



Figure 17 : Effets chimioattractants de *Hm*IL-16 et de l'IL-16 humaine sur les cellules T CD4+ humaines [5]. (A) Recrutement dose-dépendant des cellules CD4+ médié soit par le milieu conditionné (MC) soit par la cytokine humaine. L'anticorps polyclonal anti-HmIL-16 (dilution 1/1000ème, 1/500ème et 1/250ème) et l'anticorps anti-IL-16 humaine (0.5, 1 et 5 µg/ml) réduisent significativement le nombre de cellules recrutées. (B) Recrutement dosedépendant des lymphocytes humains (Mixed T lymphocytes), des cellules CD4+ (CD4+) et CD8+ (CD8+) médié par le MC (non dilué 1 :1, dilué au dixième 1 :10 ou au vingtième 1 :20). La pré-incubation des cellules CD8+ avec l'anticorps anti-IL-16 humaine (1 µg) n'ayant aucun effet significatif sur le recrutement médié par le MC, il semble que le recrutement des cellules CD8+ est indépendant de HmIL-16. (C) Effet chimioattractant dose-dépendant du MC, contenant HmIL-16, sur les cellules T CD4+. La pré-incubation des cellules avec l'anticorps anti-IL-16 humaine $(1 \ \mu g)$ réduit significativement le nombre de cellules recrutées alors que l'emploi de l'isotype contrôle (IgG2a à 1 µg) n'a aucun effet sur le recrutement cellulaire. L'anticorps reconnaît donc, de façon spécifique, une molécule chimioattractante (HmIL-16) dans le MC. De plus, le peptide de synthèse (5 µg), homologue à la séquence «106RRKSLOETTAAGDS120» de l'IL-16 humaine impliquée dans le recrutement des cellules CD4+, inhibe significativement le recrutement médié par le MC. L'inhibition semble spécifique puisque l'emploi d'un peptide contrôle, composé des mêmes acides aminés mais en désordre, n'a aucune incidence sur le nombre de cellules recrutées par le MC. Enfin, 5 µg de CD4 soluble, ajoutés au MC, inhibent significativement le recrutement des cellules T CD4+ humaines.

B. <u>Implication de HmC1q dans le recrutement des cellules</u> <u>microgliales de sangsue</u>

1. Description du C1q et son rôle dans le SNC des vertébrés

Le C1q exerce diverses fonctions biologiques qui sont directement en lien avec la structure particulière de ce facteur. Le C1q est un hétéro-hexamères de 462 kDa composé de six chaînes A, six chaînes B et six chaînes C. Ces chaînes polypeptidiques comportent deux domaines conservés : un domaine collagen-like situé à l'extrémité N-terminale et un domaine globulaire situé à l'extrémité Cterminale, appelé gC1q [220, 221] (figure 18).



Figure 18 : Structure du C1q [4]. Cette molécule est composée de six sous-unités dont chacune est formée de trois chaînes polypeptidiques (A, B et C). La partie N-terminale de ces chaînes comporte le domaine collagène et leurs extrémités C-terminale contiennent le domaine globulaire nommé gC1q.

a. Les fonctions du C1q dans le système périphérique

Le premier rôle du C1q est l'activation de la voie classique du complément en se liant aux complexes immuns via les domaines gC1q [4]. La seconde fonction biologique du C1q est l'opsonisation. Les protéines du complément sont, en effet, des opsonines : elles se fixent à la surface d'agents pathogènes et de cellules infectées ou endommagées. Dans le système périphérique, de nombreuses études ont montré l'importance du C1q dans les mécanismes de phagocytose. En se liant aux complexes immuns ou en opsonisant les éléments pathogènes, le C1q induit leur phagocytose par les cellules immunitaires, notamment par les macrophages et les cellules dendritiques [222-224]. De manière forte intéressante, le C1q est synthétisé par de nombreuses cellules immunitaires. En se liant à ses récepteurs, ce facteur active ces cellules et déclenche sa propre production. En effet, plusieurs

études ont montré l'action autocrine/paracrine du C1q [28, 111, 225]. Enfin, la troisième activité du C1q est le recrutement des cellules immunitaires au niveau des sites inflammatoires. Le C1q soluble agit comme une cytokine proinflammatoire [3, 226, 227], et ses propriétés chimioattractantes ont été démontrées pour les cellules dendritiques, les neutrophiles, les éosinophiles et les mastocytes [225, 227-230].

b. La place du C1q dans les pathologies du système nerveux

Après activation, la plupart des protéines du complément peuvent être produites par les astrocytes, les oligodendrocytes, les neurones et les cellules microgliales [3, 110]. Suite à une lésion ou une infection, la synthèse des protéines du complément est engagée au sein de la microglie et ce phénomène s'accroît en fonction de leur degré d'activation [25, 110, 111]. D'ailleurs, le suivi de la synthèse du C1q peut servir de bon marqueur d'activation microgliale : le taux d'expression du C1q, dans les cellules microgliales activées, augmente significativement par rapport au niveau de base, presque indétectable, de cette molécule dans ces cellules à l'état quiescent. Cette production microgliale de C1q semble être fortement impliquée dans le maintien et la régulation de l'activation des cellules microgliales au cours du développement de maladies neuro-dégénératives [231-233]. En effet, la microglie peut être activée soit par le C1q plasmatique qui infiltre le SNC, soit par le C1q synthétisé et sécrété au sein du système nerveux. Quelque soit le processus envisagé, le C1q contribue au maintien de l'activation des cellules microgliales de manière autocrine/paracrine [111]. En réponse à une stimulation médiée par le C1q, les cellules microgliales s'activent, se différencient et produisent de l'IL-6, du TNF-α, de monoxyde d'azote (NO) et des radicaux libres [111]. Une surproduction de NO, de radicaux libres ou de TNF- α étant neurotoxique, l'activation de la microglie par le C1q est potentiellement délétère pour les neurones. Par conséquent, le C1q peut contribuer au développement de maladies neuro-dégénératives. De plus, en se liant à ses récepteurs constitutivement exprimés à la surface des cellules microgliales, le C1q stimule l'activité phagocytaire de la microglie. Comme cela a déjà été mentionné dans le chapitre I, cette activité phagocytaire peut être bénéfique ou particulièrement nocive :

Lors de la neurogenèse, le C1q, ainsi que le facteur C3, opsonise les cellules nerveuses ayant créé des connexions aberrantes entre elles. L'élimination de ces cellules nerveuses par le facteur du complément permet ainsi l'élimination des mauvaises synapses en cours de développement. En effet, les souris déficientes en ces protéines du complément montrent une nette défaillance dans l'élimination des synapses malformées. Plusieurs études ont clairement démontré le rôle crucial du C1q et du C3 dans ce processus épuratif qui s'avère être réactivé au cours des maladies neuro-dégénératives [234, 235]. Dans la maladie d'Alzheimer, les protéines du complément, et notamment le C1q, sont impliquées dans le processus de clairance des neurones dégénérés et des plaques amyloïdes [159, 236, 237]. De manière générale, le C1q opsonise les cellules apoptotiques résultant de l'agression des cellules du système nerveux et engage leur élimination par phagocytose via les cellules microgliales [2, 238-240]. Ces données soulignent clairement le rôle bénéfique des facteurs du complément [241] et du C1q en particulier, dans un contexte inflammatoire.

Le C1q peut également avoir un rôle néfaste au sein du système nerveux central. En effet, certaines études, menées sur la maladie d'Alzheimer, montrent que le C1q entraîne l'accumulation des peptides Aß et bloque l'accès de ces dépôts aux cellules microgliales. Ces phénomènes déclenchent l'initiation d'un processus létal [236, 242, 243]. En outre, le taux de C1q dans le liquide cérébrospinal (CSF) est particulièrement élevé chez les patients atteints de sclérose multiple, maladie neurodégénérative due à la phagocytose de la gaine de myéline des neurones. Ceci suggère fortement l'implication de cette molécule, ainsi que le rôle joué par la relation « C1q-phagocytose microgliale », dans la genèse et l'expansion de cette pathologie. Pour terminer ce paragraphe, le C1q et les molécules du complément semblent être fortement impliqués dans d'autres pathologies du système nerveux comme la maladie de Parkinson et de Creutzfeld Jacob [244], l'ischémie cérébrale ou l'encéphalomyélite auto-immune (EAE) [245]. En effet, sur l'ensemble de ces pathologies, une augmentation de l'expression des facteurs du complément a été observée ce qui aboutit à l'exacerbation de l'inflammation. En ce qui concerne l'EAE, cette surexpression peut être corrélée à une destruction sélective des neurones et des oligodendrocytes [158].

En résumé, le C1q, semble jouer un double rôle dans les pathologies du SNC. En effet, il intervient dans l'élimination des éléments pathogènes soit directement en déclenchant les cascades d'activation complément, soit indirectement en activant les cellules microgliales et leur activité phagocytaire. Cependant, la surexpression de ce facteur engendre une sur-activation des cellules microgliales, provoquant une inflammation chronique délétère, neurotoxique.

c. Les récepteurs du C1q

Les C1qRp

Le C1qRp, constitutivement exprimé par les cellules microgliales, est une protéine de 126 kDa [220, 246]. Ce récepteur est particulièrement impliqué dans la phagocytose d'éléments pathogènes, comme celle des peptides Aβ dans la maladie d'Alzheimer, suite à leur opsonisation par le C1q [3, 160, 243]. En effet, le C1q, sous sa forme soluble, ne permet pas d'enclencher les mécanismes de phagocytose par la microglie [160]. Par contre, la reconnaissance du domaine collagène des molécules de C1q opsonisées par le C1qRp va induire la phagocytose des éléments nocifs par les cellules microgliales [160].

• <u>Le CR1</u>

Le CR1, également nommé CD35, est une protéine transmembranaire constituée d'une seule chaîne polypeptidique. Ce récepteur est présent à la surface de nombreuses cellules immunitaires dont les lymphocytes B et T, les monocytes, les granulocytes, les cellules dendritiques et les cellules microgliales [24, 159, 247]. Le CR1 se lie au domaine collagène du C1q et interagit également avec les fragments C3b et C4b du complément. Le CR1, en synergie avec les récepteurs CR3, CR4 et FcγR, déclenche la phagocytose au sein du SNC par les cellules microgliales [24, 247].

Le gC1qR

Le gC1qR, également appelé p32, p33, Tap (pour HIV-Tat associated protein) ou C1qBP (pour « C1q Binding Protein »), est une protéine de 33 kDa, très acide, caractérisée par la présence d'un domaine conservé MAM33 [225]. Cette molécule ubiquitaire est exprimée par de nombreux types cellulaires, notamment par les cellules immunitaires.

Par ailleurs, le gC1qR a été localisé à la surface et/ou à l'intérieur des cellules. En effet, le gC1qR est présent au niveau de la membrane plasmique de cellules, dans le cytoplasme cellulaire et au niveau de la membrane mitochondriale [4, 159, 225, 248]. Synthétisé sous la forme d'un précurseur de 282 acides aminés, la protéine mature

correspond aux résidus 74-282. Les 73 premiers acides aminés du précurseur contiennent un peptide signal qui dirige le C1qBP vers les voies sécrétrices, et une MTS (mitochondrial targeting sequence) qui oriente la protéine vers les mitochondries. Toutefois, les processus de maturation du gC1qR restent inconnus [225].

Le gC1qR ou C1qBP, localisé au niveau du plasmalemme, possède une structure particulière. En effet, il se distingue par l'absence d'un domaine transmembranaire ou d'une séquence permettant d'interagir avec une molécule d'ancrage de type GPI (glycosylphosphatidylinositol) [225, 247]. Cependant, la stimulation du gC1qR induit l'activation des voies de signalisations, ce qui suggère fortement l'existence d'une interaction du gC1qR avec une tierce protéine transmembranaire [225]. Le gC1qR reconnaît diverses molécules dont le kininogène, la vibronectine, le fibrinogène et des facteurs de coagulation comme le facteur XII [4, 248, 249]. Il se lie au domaine globulaire du C1q [250, 251], activant des cellules immunitaires notamment les lymphocytes B et T, les macrophages, les cellules dendritiques, les éosinophiles, les monocytes, les cellules endothéliales etc. [225]. Par ailleurs, l'expression de cette protéine au niveau de la membrane plasmique est modulée par l'activation de ces cellules. En effet, la stimulation des cellules de l'immunité par des cytokines proinflammatoires, notamment l'INF- γ , le TNF- α ou le LPS, provoque la surexpression de ce récepteur à leur surface [4, 225].

Le cC1qR

Le cC1qR, ou calréticuline (CR), est une protéine non-conventionnelle de 60 kDa qui possède de multiples ligands et une très forte affinité pour le calcium. Les divers interactants du cC1qR ont tous un point en commun : la présence d'un domaine collagène. Comme le gC1qR, la calréticuline a été détectée à la surface et dans le cytoplasme de différents types cellulaires. Cette molécule exerce plusieurs fonctions biologiques en lien avec sa structure et sa localisation au niveau des divers compartiments cellulaires. La calréticuline contient trois domaines particuliers : un domaine globulaire à l'extrémité N-terminale, nommé le domaine N (ou « N-domain »); un domaine riche en proline (domaine P) ayant un signal de localisation nucléaire (NLS ou « nuclear localization signal ») ; et enfin, un domaine C-terminal chargé négativement qui détient le site de fixation du calcium. Le cC1qR ne dispose pas d'un domaine transmembranaire. Par conséquent, ce récepteur semble se fixer

au plasmalemme via une protéine adaptatrice. En effet, puisque la stimulation de la calréticuline déclenche les mécanismes de transduction, la transmission du signal est probablement médiée soit par la protéine adaptatrice, soit par une autre molécule reconnaissant le complexe « C1q-cC1qR » [225, 247].

L'interaction C1q-cC1qR s'effectue par la reconnaissance du domaine collagène du C1q via la partie N-terminale de la calréticuline. En effet, l'extrémité N-terminale du cC1qR contient le site de liaison du C1q entre les domaines N et P [225, 247]. Il a été montré que les macrophages phagocytent des cellules apoptotiques ou des érythrocytes opsonisés par le C1q via un mécanisme dépendant de la calréticuline. De plus, de manière très intéressante, le cC1qR est co-localisé avec le CD91 (récepteur de l'α2-macroglobuline), récepteur impliqué dans la macropinocytose. La pré-incubation de macrophages avec un anticorps anti-cC1qR ou un anticorps anti-CD91 permet d'inhiber ce phénomène. Cela démontre l'implication du cC1qR dans les processus de macropinocytose [247].

Il est à noter que le cC1qR reconnaît également la MBL (mannose binding lectin), molécule responsable de l'activation du complément, en se liant à son domaine collagen-like. Or la MBL opsonise les bactéries en interagissant avec les motifs carbohydrates (sucres) situés à leurs surfaces grâce à son domaine CRD (carbohydrate recognition domain). Ces données suggèrent fortement l'implication du cC1qR dans la clairance des bactéries, jouant ainsi un rôle critique dans la réponse immunitaire innée [225].

d. <u>Implications des récepteurs gC1qR et cC1qR dans les</u> fonctions biologiques du C1g

Dans le système périphérique, le g- et c-C1qR, aussi appelés les « C1qR », sont, de manière générale, exprimés conjointement à la surface de nombreux types cellulaires dont les cellules constituant l'immunité. Bien qu'aucune interaction entre ces deux récepteurs n'ait été mise en évidence, ils semblent jouer de concert un rôle dans divers mécanismes inflammatoires médiés par le C1q. Le g- et le c-C1qR contribuent notamment à la phagocytose des éléments pathogènes par les macrophages et les cellules dendritiques. De plus, de manière extrêmement intéressante, le C1q agit comme un puissant facteur chimioattractant, recrutant les cellules dendritiques, les monocytes, les mastocytes et autres cellules immunitaires sur le ou les sites inflammatoires via sa liaison aux gC1qR et cC1qR [225, 227-230].

La mobilisation de ces cellules par l'interaction C1q-« C1qR » amplifie grandement la réponse immunitaire sur les sites d'intérêt, démontrant l'importance de ce facteur et de ces deux récepteurs dans les mécanismes inflammatoires et la genèse de pathologies, comme l'athérosclérose [225].

2. <u>*Hm*C1q, une molécule homologue et analogue au C1q humain</u> (d'après [1]

a. Des homologies structurales

Une molécule apparentée au C1q des vertébrés a été détectée suite à l'analyse des banques EST constituées à partir de systèmes nerveux de sangsue. La caractérisation complète de cette protéine par RACE-PCR a aboutit à l'obtention d'une séquence de 1837 nucléotides. Le cadre de lecture est constitué de 960 résidus nucléotidiques encodant une protéine de 320 acides aminés. L'analyse de cette séquence protéique par le logiciel Signal-P V1.1 a prédit l'existence d'un peptide signal situé sur les résidus amino acides 1 à 23. Le poids moléculaire pressenti de la protéine mature, correspondant à la région 24 à 320, est de 32,6 kDa. Via les programmes BLAST-P et BLAST-X, deux domaines conservés, retrouvés généralement dans les protéines mammaliennes contenant un domaine C1q (« C1qDC proteins » pour « C1q domain containing proteins »), ont été décelés. Il s'agit des domaines collagen-like contenant plusieurs motifs G-X-Y et du domaine globulaire (gC1q) (figure 19A). De plus, les alignements multiples obtenus par le logiciel BLAST-P soulignent les homologies existantes entre la molécule de sangsue et d'autres protéines dites C1qDC (figure 19B). Par conséquent, la protéine de sangsue a été nommée HmC1q pour H. medicinalis C1q (Genbank accession number EU81715). Pour finir, le western blot du milieu conditionné réalisé avec l'anticorps spécifique anti-HmC1q permet d'observer un signal à 33 kDa, ce qui est cohérent avec la masse attendue de la molécule ainsi identifiée. Ce même western blot réalisé avec le sérum préimmun ne présente aucun signal (figure 19C). HmC1q semble donc être sécrété dans le milieu extracellulaire à la suite d'une lésion, ce qui explique sa détection dans le milieu conditionné.



Figure 19 : Identification de HmC1q [1]. (A) Séquence nucléotidique et protéique (avec numérotation à gauche et à droite). Les régions surlignées représentent respectivement les domaines collagen-like et globular head like ; (B) Alignement multiple montrant les motifs communs avec les séquences homologues. Les degrés de conservation (moyen et haut) sont représentés en gris clair et en gris foncé ; (C) Western Blot du milieu conditionné (MC) réalisé avec l'anticorps polyclonal anti-HmC1q, produit chez le lapin. En comparaison avec le contrôle négatif obtenu via une incubation de la membrane dans le sérum pré-immun (ligne 1), l'emploi de l'anticorps polyclonal anti-HmC1q met en évidence une protéine à 33 kDa, masse moléculaire attendue de HmC1q, présente dans le MC (ligne 2).

b. <u>Localisation et production d'HmC1q dans le système</u> <u>nerveux</u>

Les expériences d'hybridation in situ ont permis de mettre en évidence les lieux de production de *Hm*C1q. Bien que certains transcrits aient été détectés dans les connectifs, HmC1q semble être produit constitutivement dans le corps cellulaire des neurones (figure 20A). Six heures après lésion des connectifs, le signal s'étend sur l'ensemble des corps cellulaires neuronaux du ganglion (figure 20C). Il est à noter que, en parallèle, la ribosonde sens, employée dans ces expériences, ne permet pas de détecter pas l'ARNm d'HmC1q (figure 20B et 20D). De plus, les expériences d'immunohistochimie, réalisées avec l'anticorps spécifique anti-HmC1q, permettent de localiser la protéine, HmC1q, dans le corps cellulaire des neurones (figure 21A et 21B), dans les cellules gliales du paquet (figure 21C), sur l'endothélium du ganglion (figure 21C) et au niveau de la lésion (figure 21D). De manière intéressante, l'immunomarquage de l'endothélium s'intensifie six heures après la lésion (figure 21E et 21F). L'ensemble de ces résultats suggère fortement que HmC1q est libéré dans le milieu extracellulaire à la suite d'une lésion. En effet, la protéine semble s'accumuler rapidement au niveau de la lésion et sa présence au niveau de l'endothélium suggère un passage de la protéine dans la circulation sanguine de l'animal.



Figure 20 : Expériences d'hybridation *in situ*. Ces images prises au microscope confocale montrent la localisation des ARNm d'HmC1q. L'emploi d'une ribosonde anti-sens permet de détecter les transcrits dans le corps cellulaire de neurones à T=0h (A) et, à T=6h suivant la lésion, ce marquage s'étend à l'ensemble des neurones présents dans le ganglion et il s'intensifie (C). La ribosonde sens, utilisée en parallèle, ne permet pas de localiser les transcrits d'HmC1q (B et D). La barre d'échelle correspond à une dimension de 20 µm.



Figure 21 : Expériences d'immunohistochimie, réalisées en employant l'anticorps spécifique anti-HmC1q. (A) Immunomarquage positif sur des neurones isolés de sangsue. (B) Immunomarquage positif des corps cellulaires neuronaux dans un ganglion. (C) Immunomarquage positif dans la cellule gliale du paquet et en (D), expérience faite en parallèle avec le sérum préimmun. L'absence de signal en (D) démontre la spécificité de la reconnaissance antigène-anticorps dans cette expérimentation. (E) Immuno-localisation positive de HmClq au niveau de la lésion. (F) et (G) Cellules endothéliales marquées par l'anticorps respectivement à T=0h et T=6h après section du connectif. La barre d'échelle correspond à une dimension de 20 µm.

c. <u>Effets chimioattractants d'HmC1q et du C1q humain sur</u> <u>les cellules microgliales de sangsue</u>

Suite à une lésion de son système nerveux, les cellules microgliales de sangsue migrent rapidement vers le ou les sites endommagés (figure 10). Chez les vertébrés, certaines protéines du complément semblent être impliquées dans le recrutement des cellules immunitaires lors d'une réponse inflammatoire (cf. paragraphes III.B.1.a., III.B.1.b et III.B.1.d). Comme *Hm*C1q possède des homologies avec le C1q humain, l'effet chimiotactique du facteur humain sur les cellules microgliales de sangsue a été évalué dans des tests de chimiotactisme. Ces expériences ont permis de mettre en évidence le recrutement dose-dépendant des cellules microgliales de sangsue par le C1q humain (figure 22A). La concentration optimale de C1q humain, permettant le recrutement de la microglie de sangsue, est de 25 nM (figure 22A). Par conséquent, cette quantité a été employée comme contrôle positif dans les expériences suivantes. Comme cela a déjà été mentionné

(cf. chapitre II), le NO (monoxyde d'azote) semble jouer un rôle dans le recrutement de la microglie de sangsue. Ainsi, l'effet d'un chélateur de NO, le cPTIO, a été mesuré sur le recrutement des cellules microgliales de sangsue médié par le C1q humain. La pré-incubation des cellules microgliales avec le cPTIO inhibe significativement le recrutement médié par la molécule humaine (figure 22B). Afin de d'essaver de déterminer les voies de signalisation permettant la migration des cellules de sangsue médiée par le C1q humain, deux autres inhibiteurs furent testés. Il s'agit de la toxine pertussique (ou PTX), qui inactive la protéine G, et la wortmannine, qui bloque la phosphatidylinositol-3-phosphate (ou « PtdIns (3,4,5) P3 »). De manière intéressante, la pré-incubation de la microglie de sangsue avec ces deux inhibiteurs et avec l'anticorps anti-gC1gR humain inhibe significativement le recrutement médié par le C1q humain (figure 22B). Or, chez les vertébrés, le C1q recrute les cellules immunitaires en reconnaissant l'un de ces récepteurs, le gC1gR. Ce récepteur semble agir sur les cellules en déclenchant les voies de signalisation induites par la protéine G et la phosphatidylinositol-3-phosphate [226]. Par conséquent, l'ensemble des données expérimentales décrites ci-dessus suggère fortement l'implication d'un analogue au gC1gR humain dans le recrutement des cellules microgliales chez la sangsue. Comme l'incubation des cellules microgliales de sangsue avec l'anticorps anti-HmC1g réduit significativement le recrutement médié par le milieu conditionné (figure 23), il semble que HmC1q est bien sécrété à la suite d'une lésion. De plus, il est possible que HmC1q recrute les cellules microgliales en interagissant avec un récepteur microglial analogue au gC1gR humain.



Figure 22 : Effet chimioattractant du C1q humain sur les cellules microgliales de sangsue. (A) Recrutement dose-dépendant du C1q humain sur la microglie de sangsue. La concentration optimale permettant le recrutement des cellules microgliales est de 25 nM. (B) Tests de chimiotactisme montrant l'inhibition du recrutement médié par 25 nM de C1q humain. La pré-incubation des cellules microgliales de sangsue avec le PTX, ou la wortmannine, ou avec l'anticorps anti-gC1qR humain, réduit significativement leur recrutement.



Figure 23 : Effet inhibiteur de l'anticorps anti-*Hm*C1q sur le recrutement des cellules microgliales de sangsue médié par le milieu conditionné 24h. Si la pré-incubation de la microglie avec cet anticorps inhibe leur recrutement, l'emploi du sérum préimmun n'a aucun effet.

Chez les vertébrés, l'activation des cellules microgliales peut s'avérer neuroprotectrice ou neuro-dégénérative. Cela dépend essentiellement de l'état d'activation des cellules microgliales, de l'importance du phénomène d'infiltration des cellules immunitaires dans le système nerveux et du contexte inflammatoire. La complexité cellulaire du SNC des vertébrés rend l'étude des mécanismes d'activation microgliale et de ses conséquences difficile.

Contrairement aux vertébrés, la sangsue médicinale possède la capacité de réparer efficacement son système nerveux central (SNC) à la suite d'une lésion. De plus, le système nerveux de cet animal possède une relative simplicité structurale et il est facilement accessible. Bien que les cellules microgliales de la sangsue présentes de nombreuses caractéristiques communes avec la microglie des vertébrés [151], elles jouent un rôle fondamental dans les processus de réparation de la chaîne nerveuse. De manière intéressante, ces dernières années, au sein du laboratoire, plusieurs facteurs, sécrétés depuis l'extrémité des axones lésés et impliqués dans le recrutement de cellules microgliales, ont été identifiés [1, 5, 55, 56]. Personnellement, je me suis intéressée au recrutement des cellules microgliales de sangsue médié par deux facteurs : *Hm*IL-16 et *Hm*C1q. Ces deux médiateurs proinflammatoires, chimioattractants, présentent des degrés d'homologies plus ou moins prononcés et des analogies fonctionnelles intéressantes avec les protéines

mammaliennes correspondantes [1, 5]. De plus, l'ensemble des données, présentées tout au long de ce chapitre, permet de supposer que ces deux molécules de sangsue exercent des effets chimioattractants différents sur les cellules microgliales.

Partant de ces constats, l'équipe m'a confié les missions suivantes :

1/ L'étude fonctionnelle et structurale de la molécule *Hm*IL-16 et de son récepteur (un CD4 potentiel).

2/ L'étude des récepteurs d'*Hm*C1q : *Hm*gC1qR et *Hm*cC1qR, nommés ainsi en raison de leurs homologies avec les récepteurs gC1qR et cC1qR humains.

Ces deux axes principaux ont pour objectif de concourir à une meilleure compréhension des mécanismes d'action de *Hm*IL-16 et de *Hm*C1q dans le recrutement des cellules microgliales et leur implication respective dans les processus de réparation neuronale. Les approches expérimentales envisagées vont approfondir les analyses *in vitro* des fonctionnalités de ces molécules et amorcer ainsi une étude comparative avec des modèles vertébrés susceptibles de préciser leur degré d'analogies fonctionnelles dans des processus neuro-inflammatoires au cours de l'évolution.

MATÉRIEL et MÉTHODES

I. Matériel biologique

La sangsue *Hirudo medicinalis* est un annélide achète d'eau douce. Les animaux utilisés pour les expérimentations sont fournis par la société RICARIMPEX située à Eysines (Gironde). Les sangsues adultes, récoltées au même stade de développement, jeûnent dans des bocaux pendant 4 mois à 18°C avant d'être envoyées au laboratoire.

A. <u>Dissection de la chaîne nerveuse</u>

Avant dissection, la sangsue est anesthésiée dans un bain d'éthanol 10% pendant 20 minutes. Elle est fixée sur sa face dorsale à l'aide d'épingles, puis une incision antéropostérieure est pratiquée au moyen d'un scalpel. Le sinus sanguin ventral (figure 7) est fendu à l'aide de microciseaux afin de récupérer la chaîne nerveuse après section des connectifs latéraux. Les chaînes nerveuses sont ensuite rincées dans du Ringer stérile (115 mM de chlorure de sodium (NaCl), de 1,8 mM de bichlorure de calcium (CaCl2), de 4 mM de chlorure de potassium (KCl) et de 10 mM de TRIS maléate à un pH de 7,4).

B. Préparation des milieux conditionnés 6H, 24H et 72H

Une fois les chaînes nerveuses prélevées et rincées, une lésion est réalisée entre chaque ganglion au moyen de pinces fines. Huit chaînes nerveuses lésées sont incubées dans 500 µl de milieu de Leibovitz ou L-15 (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) durant 6 heures, 24 heures ou 72 heures. Ces milieux, considérés comme des milieux conditionnés (appelés MC), sont ensuite récupérés puis centrifugés pendant 5 minutes à 14 000g. Le surnageant est alors récupéré et stocké à -20°C.

C. <u>Préparation des chaînes nerveuses</u>

Après dissection, les chaînes nerveuses sont prélevées et incubées pendant 15 minutes dans trois bains successifs d'antibiotiques (pénicilline 100Ul/ml ; streptomycine 100 μ g/ml ; gentamycine 100 μ g/ml). Ensuite, les chaînes nerveuses sont lésées avec une pince fine au niveau des connectifs, situés entre les ganglions 3 et 4, puis elles sont mises en culture sur des temps différents (T0h, T6h, T24h, T48h ou T72h) en fonction des expériences prévues. Le milieu de culture est du L-15 complété avec 2 mM de L-glutamine, 0.6% de glucose et 10 mM d'acide 4-(2hydroxyéthyl)-1-pipérazine-éthanesulfonique (HEPES). Ces chaînes nerveuses ont été utilisées dans les expériences *ex vivo*, d'immunohistochimie et d'hybridation *in situ*.

D. <u>Préparation des cellules microgliales</u>

A partir des chaînes nerveuses prélevées, chaque ganglion est incisé à l'aide de pinces fines puis « gratté » délicatement dans du milieu L-15 afin de récupérer les neurones ainsi que les cellules microgliales. La suspension cellulaire est alors filtrée selon une de porosité 8 µm afin de récupérer la fraction non retenue enrichie en cellules microgliales (5 µm) utilisées dans les tests de chimiotactisme.

E. <u>Extraction des protéines totales de SNC de sangsue ou des</u> protéines totales des cellules microgliales dissociées

1. Protéines totales de SNC de sangsue (PT0h)

Immédiatement après dissection du système nerveux central de huit sangsues, les chaînes sont placées dans des tubes contenant des billes céramiques avec 40 µl d'une solution d'inhibiteurs de protéases (SigmaFAST[™] Protease Inhibitor Cocktail Tablet) contenant de l'EDTA 10 mM. Après broyage, les composés sont précipités à l'aide d'un tampon acétone/TCA 10% pendant 45 min à -20°C. Puis, après centrifugation (15 000g, 30 min, 4°C), les protéines sont de nouveau précipitées deux fois à l'aide d'une solution d'acétone pendant 45 min à -20°C. Après centrifugation (15 000g, 30 min, 4°C), les protéines sont solubilisées dans un tampon Urée 7M/Thio-urée 2M/Chaps 4% (U7T2C4), pendant 3h à température ambiante. Les protéines solubilisées sont alors dosées selon la méthode de Bradford.

2. <u>Protéines totales de cellules microgliales de sangsue (PTCMD)</u>

Après dissociation des cellules nerveuses de huit sangsues, les cellules microgliales sont placées dans un tube puis centrifugées à 2 000g pendant 3 minutes à 4°C. Le surnageant est retiré puis remplacé par 40 µl d'une solution d'inhibiteurs de protéases (SigmaFAST[™] Protease Inhibitor Cocktail Tablet) contenant de l'EDTA 10 mM. Ensuite, les cellules sont lysées par sonication (2 fois 2 minutes) et par trois

cycles de congélation (azote liquide)/décongélation (bain marie à 37°C). Les protéines sont alors extraites selon le même protocole que celui employé pour extraire les PT0h des chaînes nerveuses.

F. Extraction des ARN totaux de SNC de sangsue

L'échantillon (8 chaînes nerveuses de sangsue) a été broyé mécaniquement dans un tube avec des billes de céramique 1,4 mm en présence de 1 mL de tampon de lyse (QIAzol, QIAGEN[©]). Après ajout de chloroforme pur (v/v), l'échantillon est centrifugé (12000g, 15 min, 4°C) jusqu'à l'obtention de 3 phases distinctes. La phase aqueuse supérieure contenant les ARN est récupérée. Les ARN sont précipités par ajout d'isopropanol pur (10 min, T° ambiante). Les ARN précipités sont récupérés par centrifugation (12000g, 90 min, 4°C). Le culot est rincé avec de l'éthanol 75% et de nouveau centrifugé (15000g, 90 min, 4°C). Le culot est récupéré, séché à l'air libre sous hotte et repris avec de l'eau stérile. Les échantillons ARN ainsi obtenus ont été dosés par spectrophotométrie à 260 nm. Trois µg d'ARN ont été traités contre la contamination d'ADN génomique par utilisation de RQ1 DNase (RQ1 RNase-free DNase (1u/µL), RQ1 DNase 10x reaction buffer ; Promega[©]). Après une incubation de 30 min à 37°C, la réaction est arrêtée par ajout d'une solution stop (Stop solution, Promega[©]) et l'enzyme RQ1 est inactivée par une incubation de 10 min à 65°C. L'échantillon d'ARN traité est purifié sur une colonne (RNA isolation, NucleoSpin[©]) avec un tampon (NT Buffer, NucleoSpin[©]) permettant de lier les ARN à la membrane en silice de la colonne. Après centrifugation (1 min, 11000g, 4°C), la membrane est nettoyée par passage d'un tampon lavage. Une centrifugation (2 min, 11000g, 4°C) permet de sécher la membrane. Les ARN sont élués avec de l'eau stérile. L'échantillon purifié a été dosé par spectrophotométrie à 260 nm.

G. Synthèse des ADN complémentaires

Les ARN extraits des chaînes nerveuses et purifiés ont été rétro-transcrits en ADNc en utilisant le protocole SuperScript II (inVITROGEN[©]). 1 µg d'ARN purifié a été mis en solution en présence d'oligo (dT)₁₂₋₁₈ (500 µg/mL) et d'un mélange de dNTP (10 mM chacun). L'échantillon est chauffé à 65°C pendant 5 min avant d'y ajouter du DTT 0,1 M et un inhibiteur de RNase (40 u/µL). Après 2 min à 42°C, la rétro-transcriptase SuperScript II (200 u/µL, inVITROGEN[©]) est ajoutée à

l'échantillon. Pour le contrôle négatif, la rétro-transcriptase est remplacée par de l'eau stérile. L'échantillon est alors placé à 42°C durant 50 min puis l'enzyme est inactivée pendant 15 min à 75°C.

Ces ADNc ont été utilisés pour la préparation de l'ADN plasmidique nécessaire à la production de la protéine recombinante.

H. Production de la recombinante rHmC1q

1. <u>Construction du vecteur d'expression</u>

L'ADNc encodant HmC1q (Genbank accession number EU581715) a été amplifié par PCR à partir des ADNc de systèmes nerveux de sangsues adultes. L'amplification a été réalisée en employant les amorces spécifiques forward (5'gcgccctacgtaatgaaagtatttctggaaatcctcgc-3') et les amorces spécifiques reverse (5'taattgcggccgctcactttctgcttgcaatt-3'), contenant respectivement les sites de restriction SnaBI (forward) et Notl (reverse) et la séquence du peptide signal (forward). Les amplifications par PCR sont réalisées dans un Thermo Cycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) avec 150 ng d'ADNc en solution avec 1.25 U d'ADN polymérase de type Hot Start Proofreading (Accu Prime™ Pfx, Life Technologies, Grand Island, NY, USA), 0.3 µM de chaque amorce (forward et reverse) et le tampon de l'ADN polymérase (1X) contenant les dNTP nécessaires à la réaction, ce qui représente un volume final de 50 µl. Les cycles de la réaction ont été programmés comme ceci : 2 min à 95°C, suivis de 35 cycles de 15 secondes à 95°C, 30 secondes à 60°C et enfin, 1 min à 68°C. Un unique produit de PCR a été obtenu et inséré, via une T4 DNA Ligase (Life Technologies, Grand Island, NY, USA), dans le vecteur pPIC3.5 K préalablement digéré et ouvert au niveau des sites SnaBI et Notl, comme préconisé dans le protocole « Multi-Copy P. pastoris Expression Kit manual » (Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Le plasmide pPIC3.5 K/HmC1g ainsi formé a été cloné dans la bactérie Escherichia coli Top10F' (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) et les processus ont été validés par le séquençage de l'ADN (Eurogentec S.A., Liège, Belgique).

2. Transformation des clones P. pastoris

Le plasmide recombinant pPIC3.5 K/HmC1q a été linéarisé en employant l'enzyme Sacl puis les clones P. pastoris GS115 ont été transformés par électroporation (Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Les clones His+/Mut+ ont été sélectionnés par des conditions de culture spécifiques. En effet, dans un premier temps, le milieu est dépourvu d'histidine, ce qui permet la sélection des clones His+. Ensuite, les clones transformés Mut+, contenant plusieurs copies du vecteur, sont sélectionnés en intégrant des concentrations croissantes de généticine (G418) (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) dans le milieu de culture YPD (yeast extract/peptone/dextrose) agar. Au total, 20 clones ont été sélectionnés et repris dans 10 ml d'une solution BMGY complémenté avec du glycérol. Le milieu BMGY, pH 6, est composé de 1% (w/v) d'extraits de levures, de 2% (w/v) de peptone, 1.34% (w/v) de « yeast nitrogen base », de 4 µg de D-Biotine, 100 mM de phosphate de potassium et de 1% (v/v) de glycérol. Une fois inoculées dans le milieu BMGY, les colonies sont placées en incubation pendant 48h, à 29°C, sous agitation (225 rpm). Après une centrifugation douce (2 min, 1 000g, T° ambiante), les culots sont doucement resuspendus dans un milieu dit de base minimum, le milieu BMM (1.34% w/v yeast nitrogen base, 4 µg/ml D-Biotine, 100 mM de phosphate de potassium, pH 6.0, 0.5% v/v Methanol), puis mis en incubation à 29°C, sous agitation (225 rpm), pendant 48h. Finalement, les cultures sont centrifugées à 12 000g et à 4°C, pendant 10 minutes. Les surnageants sont collectés, passés au travers d'un filtre ayant des pores de 8 µm de diamètre (Centricon YM-10, Millipore, Billerica, MA, USA), séchés sous vide puis testés par western blot après avoir été repris dans 50 µl d'eau mQ. Le clone ayant produit la protéine recombinante rHmC1q avec le meilleur rendement a été stocké dans du glycérol à -80°C.

I. <u>Production des anticorps polyclonaux anti-HmIL-16 et anti-</u> <u>HmC1q</u>

1. <u>Production des anticorps polyclonaux anti-HmIL-16 (AGRO-BIO, La Ferté Saint Aubin, France)</u>

Lors de la production de l'anticorps polyclonal anti-HmIL-16, deux lapins (SGW et SHM) ont été immunisés avec le peptide immunogène greffé à la KLH

(hémocyanine du mollusque *Megathura crenulata*). Le peptide immunogène correspond à la séquence de *Hm*IL-16 suivante : IEGGRASPYGDKPILI (figure 13A). Les sera polyclonaux ont été prélevés par saignée 49, 63 et 72 jours après injection du couple peptide-KLH. Six sera sont donc disponibles (SGW-49/SGW-63/SGW-72 et SHM-49/SHM-63/SHM-72). L'anticorps polyclonal anti-*Hm*IL-16 SGW-49, ayant été précédemment utilisé par l'équipe [5], cet anticorps a été employé dans les expériences décrites ci-dessous et sera, pour l'ensemble du manuscrit, dénommé l'anticorps polyclonal anti-*Hm*IL-16.

Production de l'anticorps polyclonal anti-HmC1q (AGRO-BIO, La Ferté Saint Aubin, France)

Après analyse de la séquence protéique de *Hm*C1q, la région peptidique immunogène a été déterminée. Il s'agit de la séquence de *Hm*C1q suivante : HTNYGDNYDPSTGVFT. Une fois le peptide immunogène synthétisé puis couplé à la KLH, le complexe a été injecté à deux lapins (SQD et SHT). Les sera polyclonaux ont été prélevés par saignée 49, 63 et 72 jours après injection du couple peptide-KLH. Six sera sont donc disponibles (SQD-49/SQD-63/SQD-72 et SHT-49/SHT-63/SHT-72). L'anticorps polyclonal anti-*Hm*C1q SQD-49, ayant été précédemment utilisé par l'équipe [1], cet anticorps a été employé dans les expériences décrites cidessous et sera, pour l'ensemble du manuscrit, dénommé l'anticorps polyclonal anti-*Hm*C1q.

Pour toutes les immuno-détections, afin de valider la spécificité de la reconnaissance antigène-anticorps, les expériences ont été réalisées en saturant les anticorps polyclonaux avec la KLH (50 µg de KLH pour 5 µl de sérum polyclonal).

II. <u>Méthodes de fractionnement et de purification</u>

A. Chromatographie liquide haute performance (HPLC)

Les surnageants *P. pastoris* transformés sont fractionnés par chromatographie liquide haute performance (Perkin série 200) sur une colonne de phase inverse C8 de 4 mm de diamètre (250 × 4.1 mm, Grace-Vydac, Columbia, MD, USA) dans un mélange acétonitrile (ACN)/eau contenant 0,1% d'acide trifluoroacétique (TFA).

L'élution des protéines s'effectue à l'aide d'un gradient linéaire d'ACN allant de 2 à 32 % en 60 minutes à un débit de 1 ml par minute à une température de 40°C. Les protéines sont détectées en sortie de colonne par mesure d'absorbance à 225 nm. Les fractions sont collectées manuellement, sont évaporées sous vide et stockées à -20°C.

B. Electrophorèse - SDS PAGE et transfert sur membrane

1. <u>L'électrophorèse – SDS PAGE</u>

Les protéines sont séparées en fonction de leur masse moléculaire apparente dans un gel d'acrylamide en présence de SDS (SDS PAGE) [252]. Le SDS conférant une charge globale négative aux protéines, celles-ci vont migrer vers la borne positive à travers les mailles du gel en fonction de leur masse moléculaire respective. Les échantillons sont repris dans une solution de Laemmli (Tris 120/ HCl 0,8N ; Glycérol 50% ; SDS 10% ; β-mercaptoéthanol 5 mM ; Bleu de Bromophénol 0,01%; Eau mQ dans un volume total de 5 ml). Le gel se divise en deux parties : un gel de concentration à 4% d'acrylamide et un gel de séparation à 12 % d'acrylamide. La migration s'est effectuée via un tampon cathode (0.6% Tris base, 2.5% taurine et 0.1% SDS) et un tampon anode (0.6% Tris base, 2.8% glycine et 0.1% SDS). Dans un premier temps, le champ électrique a été porté à 70 V pendant 15 minutes puis, dans un second temps, à 120 V pendant 45 minutes. Un marqueur de poids moléculaire permet d'estimer la taille des protéines. Les protéines séparées par migration dans un gel SDS PAGE peuvent être analysées soit par Western Blot (Immuno-empreinte), soit par coloration au Bleu de coomassie ou au nitrate d'argent.

2. <u>Le transfert sur membrane</u>

Après électrophorèse, les protéines du gel sont transférées sur membrane de nitrocellulose (Nitrocellulose Transfer Membrane Protran BA 83; Schleicher & Schuell Bioscience, Dassel, Allemagne) en milieu semi-sec (Transfert semi-sec, Bio-Rad). Le tampon de transfert est composé de 25 mM de Tris, 192 mM de Glycine, de 20% de méthanol. La migration s'effectue à 20V pendant 25 minutes.

C. Immuno-empreinte (Western Blot)

Après le transfert, la membrane est saturée dans un tampon bloquant (PBS 0,1 M/Tween 20 0,01%/Lait 5%) pendant 1h sous agitation et à température ambiante. La membrane est ensuite incubée pendant une nuit à 4°C en présence d'anticorps primaires dilués dans le tampon bloquant. La membrane est alors rincée trois fois 15 minutes dans le tampon bloquant puis incubée dans l'anticorps secondaire marqué à la peroxydase, dilué dans une solution PBS 0,1M/Tween 20 0,01%, pendant 1h à température ambiante. S'ensuivent deux rinçages de 15 minutes dans du PBS 0,1M/ Tween 20 0,01% et un rinçage final de 15 minutes dans du PBS 0,1M/ Tween 20 0,01% et un rinçage final de 15 minutes dans du PBS 0,1M. La détection des protéines immunomarquées est réalisée par chimioluminescence (réactif ECL Kit SuperSignal West Pico Chemoluminescent Substrate ; Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) suivie d'une impression sur un film photographique (Kodak X-Omat LS film ; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Les anticorps primaires sont référencés ci-dessous :

- Anticorps polyclonal anti-*Hm*IL-16 de lapin (Agro-Bio) saturé avec 50 µg de KLH (1/1000^{ème}).
- Anticorps polyclonal anti-IL-16 humaine de lapin (Abcam, Royaume Uni) (1/1000^{ème})
- Anticorps polyclonal anti-CD4 humain de lapin (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA) (1/1000^{ème})
- Anticorps monoclonal anti-CD4 humain de souris (Santa Cruz Biotechnology Inc.) (1/1000^{ème})
- Anticorps polyclonal anti-*Hm*C1q de lapin (Agro-Bio) saturé avec 50 µg de KLH (1/1000^{ème})
- Anticorps polyclonal anti-gC1qR humain (Abnova) de lapin (1/5000^{ème})
- Anticorps polyclonal anti-cC1qR humain de lapin (Santa Cruz Biotechnology Inc.) (1/1000^{ème})

Les anticorps polyclonaux produits chez le lapin sont tous détectés par des anticorps secondaires anti-IgG de lapin produits chez la chèvre dilués au 1/20000^{ème} (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA). L'anticorps monoclonal produit chez la souris est détecté par des anticorps secondaires anti-IgG de souris produits

chez la chèvre dilué au 1/30000^{ème} (Jackson Immunoresearch). Les immunoempreintes contrôles ont été réalisées dans les mêmes conditions, en employant uniquement les anticorps secondaires.

D. <u>Méthodes de purification par affinité</u>

1. <u>Purification du récepteur de HmlL-16 par co-</u> immunoprécipitation en employant les billes agarose A/G+

Les expériences de co-immunoprécipitation commencent par l'incubation de 500 µl de milieu conditionné avec 0.5 µl d'anticorps polyclonal anti-HmlL-16 (dilution 1/1000^{ème}) pendant une nuit à 4°C, sous agitation. Ensuite, 20 µl de billes d'agarose greffées avec des protéines A et G (Protein A/G PLUS-Agarose Immunoprecipitation Reagent; Santa Cruz Biotechnology Inc.) sont ajoutées. Les billes fixeront les fragments cristallisables (Fc) de l'anticorps par l'intermédiaire des protéines A et G. Après centrifugation (2 500g, 5 min, 4°C), les billes sont rincées trois fois avec 500 µl de tampon phosphate 0,1M. Ensuite, 800 µg de protéines totales (PT0h) sont incubées avec les complexes immuns une nuit, à 4°C, sous agitation. De même, trois cycles de rinçage /centrifugation (2 500g, 5 min, 4°C) sont effectués dans 1ml de tampon RIPA (Santa Cruz Biotechnology Inc.). Enfin, les complexes protéigues présents sur les billes sont dissociés dans 50 µl de tampon Laemmli par dénaturation à 95°C pendant 5 minutes. Les molécules sont séparées par SDS-PAGE puis analysées par western blot en employant l'anticorps monoclonal anti-CD4 humain (1/1000^{ème}) de souris. Un western blot contrôle est réalisé avec l'anticorps secondaire seul (1/30000^{ème}).

Purification du récepteur de *Hm*IL-16 par affinité en employant les billes magnétiques A+

Dans un premier temps, 50 µl de billes magnétiques, greffées à la protéine A (Protein A DynaBeads, Invitrogen Life Technologies), ont été mis en présence avec 10 µg d'anticorps polyclonal anti-CD4 humain pendant 6 heures à température ambiante. Dans cette expérience, les rinçages des complexes sont réalisés trois fois dans 200 µl de tampon phosphate 0,1M (pH 7,4). De plus, les anticorps peuvent être ou non fixés de façon covalente aux protéines A, présentes à la surface des billes magnétiques, grâce à une solution de bis(sulfosuccinimidyl) suberate (BS3, Thermo

Fisher Scientific Inc., Rockford, USA). La fixation covalente s'effectue en incubant, pendant 30 minutes à température ambiante, les complexes "billes-anticorps" rincés dans 250 µl de tampon phosphate de sodium 20 mM, 0,15M de chlorure de sodium (pH 7-9), contenant 5 mM de BS3. La réaction chimique est arrêtée en ajoutant 12.5 µl d'une solution de Tris HCl 1M (pH 7,5) et en laissant cette solution agir pendant 15 minutes à température ambiante. Après rinçages, le complexe est incubé, une nuit à 4°C, avec 800 µg de protéines totales (PT0h). Les complexes protéiques sont ensuite rincés puis sont mis en incubation, pendant 24h, à 4°C, sous agitation, avec le milieu conditionné (MC24h). Les complexes formés sont rincés puis sont élués par 25 µl de tampon urée 8M. Des expériences contrôles ont été réalisées simultanément. Le premier témoin consiste à ne faire interagir que les billes magnétiques avec l'anticorps polyclonal anti-CD4 humain. Le second met en incubation les billes magnétiques, l'anticorps polyclonal anti-CD4 humain et les extraits protéigues (PT0h). Le troisième met en incubation les billes magnétiques, l'anticorps polyclonal anti-CD4 humain et le milieu conditionné (MC24h) sans la présence des extraits protéiques (PT0h). Les éluâts obtenus sont séparés par SDS-PAGE puis analysés par western blot en employant l'anticorps polyclonal anti-IL-16 humaine. La révélation de ce western blot a été effectuée en utilisant des protéines A couplées avec la HRP (« Horseradish Peroxydase », Invitrogen Life Technologies) (1/25000^{ème}). Ici, les protéines A marquées ne reconnaissent que les immunoglobulines présentes à la surface de la membrane de nitrocellulose et non les anticorps dénaturés qui ont été greffés sur les billes.

3. <u>Purification des récepteurs de *Hm*C1q par une méthode de biotinylation du C1q</u>

Cent microgrammes de C1q humain recombinant (Prospecbio, Rehovot, Israel) sont biotinylés pendant 30 minutes, à température ambiante et sous agitation douce avec 2 mM de biotine (kit « sulfo-NHS-SS-biotin », Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA). Les molécules de biotine n'ayant pas réagi avec le C1q sont éliminées à l'aide d'une colonne de dessalage (colonne Zeba, Thermo Fisher Scientific). Ensuite, le C1q humain biotinylé (C1q-S-S-biotine) récupéré est mis en interaction avec une colonne de streptavidine de 1 ml (Thermo Fisher Scientific) préalablement équilibrée avec 5 ml de PBS 0,1M. L'interaction biotine-streptavidine s'effectue en 10 minutes à température ambiante. Après rinçage de la colonne avec

10 ml de PBS 0,1M, 800 μ g de protéines totales de cellules microgliales, préalablement dessalées au travers d'une colonne Zeba puis diluées dans 400 μ l de PBS 0,1M, sont ajoutées à la colonne de streptavidine. Les interactions protéiques se déroulent à 4°C, pendant 12h et sous agitation. La colonne est à nouveau rincée 10 fois avec 1 ml de PBS 0,1M puis les complexes C1q biotinylé/interactants sont élués par trois fois avec 1ml de tampon PBS 0,1M contenant 5% de β -mercaptoéthanol, à 30°C pendant 30 minutes. Les protéines éluées sont précipitées par 30 ml d'acétone/TCA 10%, à -20°C pendant 45 minutes avant d'être centrifugées à 13 000 g pendant 15 minutes à 4°C. Les précipités sont finalement lavés à l'acétone, séchés à l'air libre puis repris dans 25 μ l de tampon Laemmli. Les protéines des éluâts sont séparées par SDS-PAGE puis sont soit analysées par western blot en employant les anticorps polyclonaux anti-gC1qR humain, soit colorées pour leur étude et leur caractérisation par spectrométrie de masse, via une stratégie "Bottom Up" (cf. paragraphe VII).

Des expériences contrôles ont été utilisées. Dans la première, le C1q humain biotinylé a été mis en interaction avec la streptavidine sans ajout des extraits protéiques microgliaux. Dans la seconde, 800 µg d'extraits protéiques microgliaux ont été mis en incubation avec la streptavidine sans fixation préalable de C1q biotinylé.

III. <u>Recrutement des cellules microgliales</u>

A. Expériences de chimiotactisme

Les cellules microgliales de sangsue étant non-adhérentes, les tests de chimiotactisme ont été réalisés selon la méthode de Köhidai légèrement modifiée [253]. Un gel d'agarose 1%/gélose 0,5% est coulé dans une boîte de Pétri de 35 mm (Falcon 3005, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Deux puits ainsi que deux canaux parallèles sont creusés selon le schéma ci-dessous. Dans un premier temps, 50 µl de cellules microgliales dissociées, toujours préalablement dénombrées, sont déposées dans un puits de départ. Dans un second temps, une solution contenant les réactifs chimioattractants sont déposés dans le puits d'arrivée. Les réactifs chimioattractants peuvent correspondre à des molécules recombinantes

ou au milieu conditionné (MC24h). Dans ce dernier cas, la solution utilisée est toujours constituée de 8 µl de Milieu conditionné (MC24h) dans 42µl de L-15.

Enfin, un canal perpendiculaire aux deux précédents est creusé permettant leur jonction ce qui assure la communication entre les deux puits.

Chaque échantillon est testé trois fois. Après une heure d'incubation à température ambiante, les cellules microgliales ayant migré sont récupérées dans le puits d'arrivée et dénombrées au moyen d'une cellule de Malassez, sous microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany). Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules par rapport au nombre total de cellules déposées.



1. <u>Évaluation de l'activité chimioattractante de *Hm*IL-16 et implication de son récepteur</u>

Ces études ont utilisé plusieurs conditions expérimentales :

(1) Concernant la figure 27 : Des préparations identiques de cellules microgliales sont mises en incubation pendant 1h, avec 0 µg, 5 µg, 10 µg ou 20 µg de peptide de synthèse. Ce peptide de synthèse «106RRKSLQKETTAAGDS120», compétiteur de l'IL-16 humaine, a été fourni par le Pr. Cruikshank.

Ces cellules microgliales sont ensuite déposées dans le puits de départ de leur test respectif et la solution contenant 8 µl de Milieu conditionné (MC24h) dans 42µl de L-15 est déposée dans les puits d'arrivée.

Un témoin chimioattractant négatif a consisté à déposer 50 µl de L-15 dans le puits d'arrivée face à des cellules microgliales pré-incubées seules.

(2) Concernant les figures 27 et 30 : Des populations identiques de cellules microgliales sont mises en incubation pendant 1h avec l'anticorps monoclonal anti-CD4 humain (dilution $1/100^{eme}$). Un contrôle positif est réalisé en utilisant un pool de cellules microgliales n'ayant pas subi de traitement avec l'anticorps. Ces cellules microgliales sont alors déposées dans le puits de départ de leur test respectif et 50 µl de la solution contenant le MC24h ou l'IL-16 humaine (1 µg/mL de L-15, Peprotech) sont déposés dans les puits d'arrivée. Un témoin chimioattractant négatif a consisté à déposer 50 µl de L-15 dans le puits d'arrivée face à des cellules microgliales pré-incubées seules.

(3) Concernant la figure 31 : Des populations identiques de cellules microgliales sont mises en incubation pendant 1h avec l'anticorps polyclonal anti-CD4 humain (dilution 1/1000^{ème}). Des tests identiques sont réalisés en utilisant un pool de cellules microgliales n'ayant pas subi de traitement avec l'anticorps. Ces cellules microgliales sont alors déposées dans le puits de départ de leur test respectif et 50 µl de la solution contenant soit de l'IL-16 humaine (1 µg/mL de L-15, Peprotech), soit de l'IL-16 humaine mise en présence de CD4 humain soluble recombinant (0,1 µg/mL de L-15) sont déposés dans les puits d'arrivée. Un témoin chimioattractant négatif a consisté à déposer 50 µl de L-15 dans le puits d'arrivée face à des cellules microgliales pré-incubées seules. Un autre témoin a consisté à déposer l'IL-16 humaine (1 µg/mL de L-15, Peprotech) dans les puits d'arrivée face à des cellules microgliales ayant été préincubées pendant 1h avec des isotypes IgG de lapin.

2. Effets de HmC1q et de ses récepteurs

(1) Concernant la figure 35 : Le surnageant issu de la culture du clone *P. pastoris* transformé (contenant r*Hm*C1q) a été déposé en quantité croissante (0.1, 1, 3, 8 et 15 μ l dans le L-15 pour un volume total de 50 μ l) dans le puits d'arrivée face à des cellules microgliales de sangsue fraîchement dissociées placées dans le puits de départ. Des contrôles négatifs ont utilisé, dans les mêmes conditions, le surnageant issu de la culture d'un clone de *P. pastoris* non transformé.

(2) Concernant la figure 37 : Des populations identiques de cellules microgliales sont mises en incubation pendant 1h avec soit l'anticorps polyclonal anti-*Hm*C1q (dilution 1/250^{ème}), soit son sérum pré-immun (dilution 1/250^{ème}), soit l'anticorps polyclonal anti-gC1qR humain (dilution 1/1000^{ème}), soit les isotypes IgG de lapin (dilution 1/1000^{ème}). Des tests identiques sont réalisés en utilisant un pool de cellules

microgliales n'ayant pas subi de traitement avec un des sera. Ces cellules microgliales sont alors déposées dans le puits de départ de leur test respectif et 50 µl de la solution contenant soit le surnageant issu de la culture du clone *P. pastoris* transformé (contenant r*Hm*C1q) (8 µl dans 42 µl de L-15), soit le surnageant issu de la culture d'un clone de *P. pastoris* non transformé (8 µl dans 42 µl de L-15) sont déposés dans les puits d'arrivée. Des témoins négatifs additionnels ont consisté à déposer 50 µl de L-15 dans le puits d'arrivée face à des cellules microgliales pré-incubées avec ou sans les sera.

(3) Concernant la figure 38 : Des populations identiques de cellules microgliales sont mises en incubation pendant 1h avec soit l'anticorps polyclonal anti-cC1qR humain (dilution 1/500^{ème}), soit les isotypes IgG de lapin (dilution 1/500^{ème}). Des tests identiques sont réalisés en utilisant un pool de cellules microgliales n'ayant pas subi de traitement avec un des sera. Ces cellules microgliales sont alors déposées dans le puits de départ de leur test respectif et 50 µl de la solution contenant soit le surnageant issu de la culture du clone *P. pastoris* transformé (contenant r*Hm*C1q) (8 µl dans 42 µl de L-15), soit le surnageant issu de la culture d'un clone de *P. pastoris* non transformé (8 µl dans 42 µl de L-15) sont déposés dans les puits d'arrivée. Une condition supplémentaire a consisté à déposer le surnageant issu de la culture du clone *P. pastoris* transformé (8 µl dans 42 µl de L-15) en présence de cC1qR soluble (0,1 µg/mL de L-15) dans le puits d'arrivée face à des cellules microgliales seules.

B. Les expériences ex vivo

Des fragments de chaînes nerveuses, correspondant à 4 ganglions nerveux reliés par leurs connectifs (ganglions 2-5), ont été prélevés puis fixés séparément à l'aide d'aiguilles très fines dans des boîtes de pétri de 35mm, enduites de silicone (Sylgard 184, Dow Corning Corp., Midland, MI, USA) et contenant 1 mL de L-15. À l'aide de micropipettes (diamètre externe de 1.5 mm, Clark GC 150 F-10) présentant une résistance de 3 à 5 M Ω , 8 µl soit de PBS 0,1M, soit de surnageant issu de la culture du clone *P. pastoris* transformé, soit de celui du clone *P. pastoris* non transformé, soit de surnageant issu de la culture du clone *P. pastoris* transformé en présence de l'anticorps polyclonal anti-*Hm*C1q (dilution 1/5000^{ème}), soit de surnageant issu de la culture du clone *P. pastoris* transformé en présence de l'anticorps polyclonal anti-*Hm*C1q (dilution 1/5000^{ème}), soit de surnageant issu de la culture du clone *P. pastoris* transformé en présence de sérum

pré-immun de lapin (dilution 1/5000^{ème}). Chaque produit a été injecté au niveau des connectifs entre les ganglions 3 et 4. Les connectifs ont été lésés, au moyen de forceps très fins, immédiatement après les injections. Ensuite, les tissus ont été fixés 4h après la lésion, à l'aide d'une solution de paraformaldéhyde 4% (PAF 4% - PBS 0,1M), pH 7,4. Un contrôle négatif de migration microgliale a été effectué en fixant les tissus juste après (T0) l'injection de PBS. Afin de marquer les noyaux des cellules microgliales, les échantillons ont été mis en contact pendant 30 minutes avec du Hoechst 33342 dilué au 1/1000^{ème} (Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Les mouvements cellulaires, induits par les différents réactifs injectés, ont été observés sous microscope inverse de type Leica (DMIRE2, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

IV. Expériences d'hybridation in situ

A. Préparation des ribosondes

La séquence nucléotidique du transcrit hm*c1qbp*, utilisée pour la synthèse des sondes sens et anti-sens correspond au fragment 154-859 (Genbank accession number JN207836). La séquence nucléotidique du transcrit hm*cc1qr*, utilisée pour la synthèse des sondes sens et anti-sens correspond au fragment 760-1311 de la séquence ARNm présentée dans le manuscrit.

La préparation des ADNc nécessaires au clonage de chaque fragment est détaillée dans la section consacrée au matériel biologique (extraction des ARN totaux et synthèse des ADNc). Les ADNc sont amplifiés par PCR avec la GoTaq polymérase (1,25 unités, Promega[©]) en utilisant le tampon Green GoTaq Flexi 5x en présence de MgCl₂ 1,5 mM, de dNTP 10 mM et des amorces sens (5'-ctattcaggagaggaggagag-3' pour hm*c1qbp*; 5'-gattgggatgatgagatgg-3' pour hm*c1qr*) et antisens (5'-aaaactacgcaggtcctttagg-3' pour hm*c1qbp*; 5'- catgaacctgaaattacaaa-3' pour hm*cc1qr*). La PCR a été réalisée pendant 30 cycles (97°C-3 min ; 30 fois : 94°C-30 sec, 58°C-30 sec, 72°C-1 min30 ; 72°C-7 min). Après vérification des amplicons sur gel d'agarose 1,5%, les produits de PCR ont été insérés dans un plasmide pGEM-T easy (Promega[©]) avec son mélange réactionnel (2x Rapid Ligation Buffer T₄ DNA ligase, pGEM-T easy Vector, T₄ DNA ligase) 12h à 4°C. 2 µl

de produit de ligation sont ensuite utilisés pour transformer une lignée bactérienne *E. coli* JM109 (10⁸ cfu/µL, Promega[©]) par choc thermique (20 min sur glace, 45 sec à 42°C, 2 min sur glace). L'échantillon de bactéries transformées est alors étalé sur boîte de Pétri en présence d'ampicilline 0,3 mM, d'IPTG 0,5 mM et de X-Gal 0,2 mM. Les cultures sont incubées 12h à 37°C. Des colonies blanches sont ensuite sélectionnées puis remises en culture dans un milieu liquide LB/Ampicilline 0,3mM. La présence du fragment d'intérêt dans l'ADN plasmidique (vecteur pGEM-T easy) est contrôlée par PCR en suivant le protocole utilisé précédemment.

Pour chaque séquence nucléotidique, la linéarisation de l'ADN plasmidique (5µg) a été réalisée avec les enzymes de restriction Apa I (40u/µL, Roche©) ou Sac I (10u/µL, Roche©) à 30°C et 37°C respectivement durant 2h en présence des réactifs fournis dans le kit (BSA, tampon 10X, Roche©). La production des ribosondes sens et anti-sens a été réalisé par la transcription *in vitro* en utilisant soit la RNA polymérase SP6 (20 u/µL, Roche[©]) pour le plasmide linéarisé avec Apa 1, soit la RNA polymérase T7 (20 u/µL, Roche[©]) pour le plasmide digéré avec Sac 1. Dans les deux cas, la transcription a été effectuée en présence de dNTP 10 mM, d'UTP marqué à la biotine et des réactifs fournis par le kit Roche[©] (tampon 10X, RNasin 40 u/µL) (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Suisse). Après 2h à 37°C, la réaction est stoppée par ajout d'EDTA 0,33 M (pH8) au milieu réactionnel. La précipitation des sondes s'effectue en 1h à -80°C (ARNt, LiCl 7,5 M, éthanol 100%). Après centrifugation (13000 g, 30 min, 4°C), le culot est rincé avec l'éthanol 70° et séché à l'air libre sous hotte avant d'être repris dans de l'eau stérile

B. <u>Préparation et hybridation des tissus</u>

Afin de localiser les transcrits de *hmc1qbp* et de *hmcc1qr*, les chaînes nerveuses ont été prélevées, rincées 15 minutes dans trois bains successifs d'antibiotiques (pénicilline 100UI/mI ; streptomycine 100 μ g/mI ; gentamycine 100 μ g/mI) puis incubées dans un milieu de culture L-15. Elles sont ensuite fixées soit immédiatement soit 24h après le début de l'incubation au moyen d'une solution de paraformaldéhyde (4%), pendant 1h à 4°C.

Les échantillons sont réhydratés en passant dans un premier bain de méthanol (MetOH) 100% pendant 2 minutes, puis dans trois successifs MetOH-PBS

0,1M (MetOH 75%, 50% et enfin 25%) d'une durée de 2 minutes. Les échantillons sont rincés dans trois bains de PBS 0,1M puis dans trois bains de PBT (PBS 0,1M/Tween 20 0,1%). Les échantillons sont repris dans une solution PAF 4%, pH 9,5, pendant 25 minutes et sous agitation puis rincés 4 fois dans le tampon PBT pendant 5 minutes. Les échantillons sont ensuite incubés pendant 15 minutes avec la Protéinase K (10 µg/ml dans le tampon PBS 0,1M) puis également rincés dans trois bains de PBT pendant 5 minutes, sous agitation. Enfin, les échantillons sont à nouveau fixés au moyen de la solution PAF 4%, pH 9,5, pendant 25 minutes, sous agitation, puis rincés dans quatre bains de PBT pendant 5 minutes.

Les échantillons sont incubés 10 minutes dans un mélange PBT 50%/Hybe(-) 50%, agitation (Hybe(-), solution de pré-hybridation sous (pH 6-6,5), formamide50%/tampon SSC5X/Tween 20 0,1%). Avant l'hybridation, les échantillons sont incubés dans la solution de pré-hybridation pendant 3h à 60°C en renouvelant la solution une fois durant l'incubation. En parallèle, les ribosondes sont diluées au 1/30^{ème} dans 75 µl de tampon Hybe(+), solution d'hybridation (pH 6-6,5, formamide 50%/tampon SSC 5X/Tween 20 0,1%/0,5 mg/ml d'ADN de sperme de saumon/50 µg/ml d'héparine). Ensuite, les ribosondes sont dénaturées à 85°C pendant 3 minutes puis immédiatement placées sur la glace.

Pour l'hybridation, les échantillons sont placés dans la solution Hybe(+) contenant les ribosondes. Ils sont recouverts d'une lamelle prétraitée avec la RNaseZap[®] puis placés en incubation à 60°C pendant 12h, en chambre humide. La solution d'hybridation contenant les ribosondes est retirée (stockée à -20°C). Les échantillons sont rincés trois fois avec la solution Hybe(-) préchauffée pendant 5 minutes à 60°C. Après trois lavages de 20 minutes à 60°C dans cette solution, les échantillons sont incubés dans un tampon PBT 50%/Hybe(-) 50%, pendant 10 minutes à température ambiante et sous agitation. Ils sont rincés quatre fois dans le tampon PBS 0,1M/Glycine 0,1M pendant 5 minutes, à température ambiante sous agitation.

C. Immunomarquage des ribosondes

Les échantillons sont incubés dans un tampon de saturation (réactif bloquant Roche dilué au 1/5^{ème} dans le tampon PBT/Glycine 0,1M) pendant 30 minutes, à

température ambiante et sous agitation. Les anticorps primaires sont centrifugés à 10 000 g, pendant 5 minutes à 4°C puis ajoutés au tampon de saturation (dilués au 1/400^{ème}) pour incuber les échantillons pendant 12h à 4°C sous agitation. Les échantillons sont rincés huit fois dans le tampon PBT/Glycine 0,1M sous agitation (2 fois 5 minutes, 3 fois 20 minutes, 3 fois 45 minutes). Les anticorps secondaires sont centrifugés à 10 000 g, pendant 5 minutes à 4°C puis incubés sur les échantillons (dilués au 1/400^{ème} dans la solution de saturation) pendant 2h, à température ambiante, sous agitation et en chambre noire. Ils sont rincés quatre fois dans le tampon PBT/Glycine 0,1M, pendant 15 minutes, sous agitation et en chambre noire. Après les lavages, les échantillons sont traités, pendant 30 minutes à l'obscurité à 4°C avec le Hoechst 33342 (Life Technologies, Grand Island, NY, USA), dilué au 1/10^{ème} dans le tampon PBT. Les échantillons sont montés entre lame et lamelle dans le Glycergel (SigmaAldrich, St. Louis, MO, USA), puis sont observés au microscope confocal (Zeiss LSM780, Oberkochen, Germany).

V. Expériences d'immunohistochimie

A. <u>Préparation des échantillons et anticorps utilisés</u>

1. <u>Pour l'étude du récepteur de HmlL-16</u>

La réalisation de ces expériences a nécessité l'emploi de l'anticorps primaire, l'anticorps polyclonal anti-CD4 humain, produit chez le lapin (Santa Cruz Biotechnology Inc.) (1/500^{ème}) et de l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin, produit chez l'âne ("donkey anti-rabbit"), marqué au FITC (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) (1/2000^{ème})

D'une part, les chaînes nerveuses de sangsue ont été traitées immédiatement après avoir été disséquées et lésées au niveau des connectifs (T0h). D'autre part, les systèmes nerveux, disséqués et lésés au niveau des connectifs, ont été incubés pendant 24h dans du L-15 avant la mise en œuvre du protocole d'immunohistochimie (T24h).

2. <u>Pour l'étude de *Hm*C1qBP</u>

Les expériences d'immunohistochimie ont été effectuées en employant l'anticorps primaire suivant: l'anticorps polyclonal anti-gC1qR humain, produit chez le
lapin (Abnova) (1/250^{ème}). Il a été ensuite détecté au moyen de l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin, produit chez l'âne ("donkey anti-rabbit"), couplé à de l'Alexa fluor 488 (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) (1/2000^{ème})

Les expériences ont été réalisées sur des chaînes nerveuses, lésées au niveau des connectifs, immédiatement (T0h), après 6h (T6h) ou 24h (T24h) d'incubation dans du L-15.

3. Pour l'étude de HmcC1qR

Les expériences ont été effectuées en utilisant deux anticorps primaires simultanément: l'anticorps primaire polyclonal anti-cC1qR humain, produit chez le lapin (Santa Cruz Biotechnology Inc.) (1/500^{ème}) et l'anticorps primaire monoclonal anti-*Hm*gliarine, produit chez la souris (1/250^{ème}). Ces anticorps ont été détectés respectivement par l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin, produit chez l'âne ("donkey anti-rabbit"), conjugué à l'Alexa fluor 488 (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) (1/2000^{ème}) et l'anticorps secondaire anti-IgG de souris, également produit chez l'âne ("donkey anti-mouse"), conjugué au Texas Red (1/250^{ème}).

Les systèmes nerveux de sangsue disséqués ont été lésés au niveau des connectifs puis mis en incubation pendant 24h (T24h) ou 72h (T72h) dans du L-15.

B. L'immunodétection

Dans un premier temps, les systèmes nerveux sont fixés au moyen de 500 µl de solution PAF 4%-PBS 0,1M, pendant 1h à 4°C. Après trois rinçages de 15 minutes au PBS 0,1M, les échantillons sont perméabilisés via 500 µl de tampon PBS 0,1M – Triton 100X 1%, pendant 24h à température ambiante. Ensuite, les chaînes nerveuses sont incubées pendant 8h, à température ambiante, dans 500 µl de tampon de saturation. Le tampon de saturation se compose de Triton 100X 1%, de NDS 3% ("normal donkey serum"), et d'ovalbumine 1%, dilués dans du PBS 0,1M. De plus, les anticorps primaires et les anticorps secondaires sont dilués, séparément, dans une solution de PBS 0,1M contenant 1% de BSA (bovine serum albumin), 0,05% de Triton 100X, 1% de NDS et 1% d'ovalbumine. La solution contenant les anticorps primaires est nommée « solution AB1 » et celle contenant les anticorps primaires, via la « solution AB1 », pendant 12h à 4°C.

Après trois rinçages de 15 minutes au PBS 0,1M, les échantillons sont incubés dans la « solution AB2 » pendant 1h à température ambiante. Ensuite, après trois rinçages des échantillons au PBS 0,1M, les chaînes nerveuses sont mises dans une solution contenant du Hoechst 33342 (Life Technologies, Grand Island, NY, USA), dilution 1/1000^{ème}, pendant 30 minutes, à 4°C et en chambre noire pour éviter de dégrader prématurément les fluorochromes. Finalement, les échantillons sont montés entre lame et lamelle dans du Glycergel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), puis sont observés, à l'obscurité, au microscope confocal de type Zeiss LSM780 (Zeiss, Oberkochen, Germany).

VI. Les analyses par cytométrie en flux

A. Localisation du récepteur de HmlL-16

Les cellules microgliales, dissociées à partir de 4 chaînes nerveuses de sangsue, sont incubées dans du L-15 pendant 24h, à température ambiante. Elles sont ensuite mises en présence de l'anticorps monoclonal anti-CD4 humain marqué au FITC, produit chez la souris (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), dilués au 1/250^{ème}, pendant 30 minutes. Ces cellules sont ensuite lavées au L-15 puis centrifugées pendant 8 minutes, à 1 000g et à 4°C. Le culot cellulaire est repris dans 500 µl de L-15 puis analysé au FACS (« fluorescence-activated cell sorter » ; EPICS XL4-MCL, Beckman Coulter, Diagnostics division, Brea, CA, USA), équipé d'un laser à ions argon ayant une capacité d'excitation de 15 mW à la longueur d'ondes de 488 nm.

B. Localisation de HmC1qBP

Les cellules microgliales, obtenues suite à la dissection et à la dissociation de 8 SNC de sangsues adultes, sont réparties équitablement dans 3 tubes différents (environ 10⁶ cellules par tube). Elles subissent ensuite les traitements suivants :

• Les cellules nerveuses du premier tube sont mises en incubation pendant 24h, à température ambiante, dans du L-15.

• Les cellules du second tube sont incubées dans du L-15 pendant 24h, à température ambiante puis elles sont traitées avec l'anticorps monoclonal antigC1qR humain (60.11) marqué FITC, produit chez la souris (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), dilués au 1/250^{ème}, pendant 30 minutes. Ces cellules sont ensuite lavées au L-15 puis centrifugées pendant 8 minutes, à 1 000g et à 4°C. Le culot cellulaire est repris dans 500 µl de L-15 puis analysé au FACS (« fluorescence-activated cell sorter » ; EPICS XL4-MCL, Beckman Coulter, Diagnostics division, Brea, CA, USA), équipé d'un laser à ions argon ayant une capacité d'excitation de 15 mW à la longueur d'ondes de 488 nm.

• Les cellules de sangsue du troisième tube sont incubées, pendant 24h, dans du L-15 agrémenté de 8 µl de surnageant *P. pastoris* contenant r*Hm*C1q. Ensuite, ces cellules subissent le même traitement que les cellules du second tube.

VII. <u>Stratégies de caractérisation des protéines par spectrométrie</u> <u>de masse</u>

A. L'analyse par spectrométrie de masse

1. Matériel utilisé

L'appareil utilisé pour la mesure des masses est un ultraflex TOF/TOF (Brüker Daltonic) équipé d'une source laser (nitrogen laser MLN 202, LTB), d'une porte temporelle permettant la sélection d'un ion suivie d'une cellule de LIFT, d'un suppresseur d'ion métastable, d'un réflecteur et enfin d'un détecteur (schéma ci dessous).

L'appareil est contrôlé via le logiciel Flex Control, et les dépôts sont réalisés sur la plaque MALDI massive MTP. 384.



2. <u>Matrices utilisées</u>

- Acide α-cyano-4-hydroxy cinnamique (HCCA) (Sigma) : 5 mg/ml dilués dans une solution (ACN /eau) (7v/3v) acidifiée avec 0,1 % d'acide tri-fluoro-acétique (TFA).
- Acide 1, 5 diaminonaphtalène (1,5-DAN) (Sigma) : 20 mg/ml dilués dans une solution (ACN/eau) (v/v) acidifiée avec 0,1 % d'acide tri-fluoro-acétique (TFA).

3. <u>Calibrants</u>

La mesure du temps de vol de molécules de taille connue (Peptide calibration Standard ; Brüker ou Sérum Albumine Bovine ; Sigma) permet de calibrer L'appareil pour les analyses de peptides ou de protéines respectivement

4. L'analyse des spectres de masse

Les mesures des temps de vol sont analysées à l'aide des logiciels FlexAnalysis 3.0 et Biotools 3.1 de Brüker (Brüker Daltonic)., Ils permettent l'interrogation de banques de données comme NCBI, Swissprot, Genbank ou les banques EST de sangsue. Ces logiciels permettent également de confronter les mesures obtenues à des listes de masses issues d'une digestion théorique d'une protéine de séquence en acide aminée connue.

B. La stratégie « Bottom Up »

La stratégie « Bottom Up » consiste à digérer préalablement les protéines par la trypsine avant de les analyser par spectrométrie de masse.

Après séparation des protéines dans un gel SDS PAGE et coloration (au bleu de coomassie ou à l'argent), les bandes à caractériser sont excisées dans un environnement propre évitant ainsi l'introduction de divers contaminants, découpées en petits fragments et placées dans des tubes de 0,2 ou 0,5 ml. Les fragments sont rincés par trois fois 10 min à température ambiante dans 100 µl d'une solution de bicarbonate d'ammonium 25 mM/ ACN 50%. Les protéines sont alors réduites à 56°C dans 10mM d'une solution de Dithiothréitol (DTT) pendant une heure puis alkylées à température ambiante dans une solution de lodacétamide 55 mM pendant 45 min à l'obscurité. Les morceaux de gel sont rincés dans 100 µl de solution de

bicarbonate d'ammonium 25 mM, deshydratés par 100 µl d'une solution de bicarbonate d'ammonium 25 mM/ACN 50% puis recouvert par une solution de bicarbonate d'ammonium 25 mM contenant 20 µg/ml trypsine (Trypsin porcine, « Sequencing Grade Modified Trypsin », Promega). La digestion est réalisée à 37°C, pendant une nuit.

Les fragments peptidiques libérés sont récupérés avec le tampon et placés dans un nouveau tube. Le gel est rincé et « vortexé » deux fois avec 100 µl d'eau ultra pure et une fois avec une solution ACN 50%/TFA 5%. A chaque fois, le liquide de rinçage contenant les fragments peptidiques élués est récupéré et mélangé au précédant. L'échantillon obtenu est déshydraté sous vide. Les peptides sont alors remis en suspension dans 10 µl une solution ACN 50%/TFA 5%.

Un témoin de digestion trypsique est réalisé sur un fragment de gel ne contenant pas de protéines. Il permettra de reconnaître et d'éliminer les masses issues de l'autolyse de la trypsine ou divers contaminants accidentels.

L'analyse des échantillons

Pour la mesure des masses des différents peptides, 1 µl de chaque échantillon et 1 µl de calibrant sont déposés sur une plaque MALDI dans 1 µl de matrice HCCA. Après évaporation, la plaque MALDI est introduite dans le spectromètre de masse. Des tirs laser permettent de désorber, d'ioniser puis d'accélérer les fragments peptidiques de la matrice. Les temps de vols des ions dans les spectromètre jusqu' au détecteur sont proportionnels à leur charge et leur masse. Les mesures sont réalisées en mode « reflectron », en polarité positive. Le spectre obtenu pour chaque protéine est une liste des masses formant une « signature ou empreinte peptidique » caractérisant cette protéine. Il est possible d'interroger les banques de données avec ces listes de masses pour identifier la protéine probable. La probabilité d'obtention d'une identification de molécule peut être augmentée de manière significative par une fragmentation supplémentaire de peptides majoritaires sélectionnés un par un. Les listes de masses sont caractéristiques de la séquence en acides aminés de ces peptides majoritaires.

C. La stratégie « Top Down »

La stratégie «Top down » consiste à séquencer les protéines en solution directement sans passer par une digestion trypsique. Pour cette stratégie, une fragmentation ISD (In Source Decay) a été mise en place. Cette méthode permet de séquencer des protéines purifiées. La fragmentation s'effectue soit sur leur extrémité N- ou soit leur extrémité C-terminale. L'énergie du laser est poussée à son maximum afin d'accroître l'énergie transmise aux molécules. La conséquence est la fragmentation des molécules au sein de la source, d'où l'appellation de la fragmentation – ISD ou « In Source Decay » [254]. Pour la stratégie Top Down, après précipitation des protéines via une solution acétone/TCA 10% (w/v), les éluâts des expériences de purification du récepteur de *Hm*IL-16 sont repris 25 µl d'eau mQ/Acétonitrile 50% (v/v). Ensuite 1 µl d'éluât est mélangé sur la plaque MALDI à 1µl de matrice DAN. Après évaporation, la plaque est introduite dans l'appareil pour l'analyse. Un témoin BSA permet de vérifier que la fragmentation est effective. L'acquisition des spectres s'effectue en mode réflecteur en polarité positive.

RÉSULTATS

I. <u>Étude de HmIL-16 et de son récepteur : sur la piste d'un</u> <u>analogue potentiel du CD4 humain</u>

A. Caractérisation de la pro-HmIL-16

La séquence ARNm de la pro-HmlL-16 obtenue contient 2412 nucléotides encodant une séguence protéigue de 803 acides aminés (figure 24). La masse moléculaire théorique de la protéine, déduite à partir de la séquence nucléotidique, est de 87582 Da, et son point isoélectrique théorique est estimé à 4.82. En analysant la séquence protéigue de cette molécule par le logiciel SignalP 4.0, aucun peptide signal n'a été détecté. De plus, l'analyse par le logiciel BLAST-P montre que la pro-HmIL-16 ne possède qu'un seul domaine conservé de type PDZ à son extrémité Cterminale (figure 25). L'absence de domaine PDZ sur la partie N-terminale permet de différencier la pro-HmIL-16 des précurseurs de l'IL-16 humaine caractérisés chez l'Homme. En effet, la pro-IL-16 de 67 kDa et la pro-NIL-16 de 140 kDa, identifiées comme étant les précurseurs de la cytokine humaine, possèdent respectivement 2 et 4 domaines PDZ au niveau de leurs extrémités N-terminale (figure 25). Il est possible de remarquer que la séquence protéigue de la pro-*Hm*IL-16 contient de nombreux résidus d'acide aspartique (D) situés au centre de la molécule, et qu'elle possède notamment trois motifs « D-S » (acide aspartique-sérine) localisés près de son extrémité C-terminale : D594-S595, D608-S609, D623-S624 (figure 24, surlignés en bleu). Des molécules analogues aux caspases ayant été détectées dans les banques EST de sangsue, il est possible que la pro-HmlL-16 subisse une maturation par clivage enzymatique au niveau des sites « D-S ».

La séquence nucléotidique surlignée en rose sur la figure 24 a été choisie pour la production de la protéine recombinante *Hm*IL-16 (r*Hm*IL-16). Une fois traduite, elle contiendra les trois motifs « D-S » de la pro-*Hm*IL-16. Le choix du système de production s'est orienté vers *Escherichia coli* (*E. coli*). Dans les systèmes procaryotes, les modifications post-traductionnelles apportées sur les protéines recombinantes sont limitées. Suite à la production de r*Hm*IL-16, l'action de différentes caspases commerciales sera évaluée sur la forme recombinante, permettant ainsi l'étude des processus éventuels de maturation de la pro-*Hm*IL-16.

En outre, hormis le domaine PDZ présent sur la partie C-terminale de la molécule, la pro-*Hm*IL-16 ne possède aucun autre domaine conservé. Les homologies avec d'autres protéines appartenant à d'autres espèces animales, estimées entre 40% et 49% (tableau 4), ne reposent que sur l'existence de ce domaine PDZ à l'extrémité C-terminale de la pro-*Hm*IL-16. D'ailleurs, les homologies détectées semblent davantage concerner les molécules d'espèces invertébrées. En effet, ni les précurseurs de l'IL-16 ni la cytokine des vertébrés n'apparaissent à la suite des analyses BLAST-P menées sur le site NCBI, hormis celle du poisson lune, *Tetraodon nigroviridis* (tableau 4).

Cependant, l'extrémité C-terminale de la pro-HmlL-16 correspond à la séquence protéique de la cytokine de sangsue, détectée précédemment suite à l'analyse des banques de données EST de sangsue (figure 24, partie surlignée en gris clair ; figure 25). Les premières analyses de HmlL-16 ont montré que la cytokine de sangsue est plus courte que la forme active de l'IL-16 humaine. Néanmoins, la cytokine de sangsue et la cytokine humaine possèdent des motifs similaires comme les domaines GVGF/GLGF, la présence d'un résidu tryptophane (W) et une séquence RRKE/RRKS terminale (figure 13C et figure 24, encadrés), tous impliqués dans l'activité biologique [195, 204]. Ces motifs sont également localisés dans les domaines PDZ C-terminaux. De plus, en comparant la séquence de HmlL-16 (figure 24, partie surlignée en gris clair) avec celle de la forme active de l'IL-16 humaine, l'homologie entre ces deux molécules a été estimée à 62% (figures 12 et 25) [5]. Pris ensemble, ces données soulignent la proximité entre la forme active de l'IL-16 humaine et *Hm*IL-16. Cette donnée est importante car elle explique que les anticorps polyclonaux anti-HmIL-16 et anti-IL-16 humaine aient permis la détection de HmIL-16 dans le milieu ayant incubé des systèmes nerveux lésés de sangsue pendant 24h (milieu conditionné 24h ou MC24h) (figure 26). En effet, deux westerns blot, réalisés sur différents milieux conditionnés (MC6h, MC24h, MC72h), ont été effectués : un western blot réalisé avec l'anticorps polyclonal anti-HmlL-16 saturé avec 50 µg de KLH et un western blot effectué avec l'anticorps polyclonal anti-IL16 humaine (figure 26). Les anticorps polyclonaux anti-HmIL-16 et anti-IL-16 humaine étant tous deux produits chez le lapin, le contrôle a été effectué avec l'anticorps secondaire seul. Aucun signal n'ayant été visualisé sur ce western blot contrôle (figure 26), les deux

bandes observables à 80 kDa, dans le MC24h, sont donc spécifiques. Les pistes MC6h et MC72h sont négatives : ces milieux semblent ne pas contenir *Hm*IL-16.

atgagtgatgaggctccaaaatctcacaaagtctttaaaactctcaccttcgattttaaa 1 DEAPKSHK VFKTL D 61 S S F T S N N D S P T T P T I N L 121 attgccggaagtaaacccctcccgagagccctgcaaccaaaaacaaatcatcagggtgtgIAGSKPLPRALOPKTNHO G V 181 ${\tt tctgcgggatacaagcctctcttcacagggtatgggtctgtttcgaagaactccgaagac}$ KPLF G G S K N S 241 agccaggcacgtcgaagcagcatgatttgcacgaccacgttcaagtcccagtgttctctcARRSSMI 0 СТТТ FKS 0 301 agcaggccttccaccaccaaggttcagcggagcattcaactccactgaggcacaggaacR P S T T K G S A E H S T P L R H R N 361 tccgtgcaagttgagtgtccaacttctgttcgagacgtgcagagttcaaaaccaggcccg TS VR DV 0 C P OSSKP Ε 421 tcaccaactaccatccacgtttcaaagcacagtggagttgacaatggaagcattttcctc S P T T T H V S K H S G V D N G S T F I. 481 actttgggagatgtttttggaaagcgcgatccagtggaagaaatgagaaaatccgaggag gtggtcatgaggaatttgggaaggcattgcaaaggtgaggggggagaccagaccaagc V V M R N L G R H C K G E G R P D P P S 541 601 S R A F I S L Q G S N K O K 661 ${\tt tctgttgatgccacaaatcttgatctttcgtggagcagttcttacgggaaacagaaagtg}$ V D A T N L D L S W S S S Y G K O K S 721 tccaaagacggagtcattctcgcaggaccttctgaacatttcccaggcaccattcgcttg VIL AGPS EHFP 781 ttcctcaattcagaagttgagttggaaaagaattccaatggaagcaaagaaatagatcct L N S E V E L E K N S N G S K E I D P 841 tctccaatacaggtgttgacgacgaaacgaaaccaggtaactatcacacctgcaggagac V L T T K R N Q V T I T P A SPTO G D 901 cacaaaagctctcaccaaagcaaagcatcaacactcctggaagtctttcaggatactcca SHQS KASTLL V ${\tt cgtgctgcggtgcggagttcaggatggaaaaacatgaccactgcttccagtaaaacgaat}$ 961 57 RSSGWKNMTTAS AΑ C K 1021 ${\tt gtcacgaatgtgacacgcgaggttcctgctgacgaaggaaccaccgaagaatttaaaaca}$ VTRE VPADEGTTE Ν 1081 tcttctcatcctggttcaactctcaatgaatttaaggaatccgatcgtaaagacaggatt ΗP G S T L N EFK E S 1141 ${\tt tcgtcgaatgatgacgacgacgacgacgacggtggtgatgataatgatgaagcagatcgggat$ S S N D D D D D N G G D D N D E A D R D 1201 ggtgctgagtaccatgctgaaggagctgatgacgtcactcggagagatgaaatgaaccctA E Y H A E G A D D V T R R D E M N P 1261 ggaaagtatgaaccttgtcacgagaagatcgtctcaaaagaggatgaagtccgtgccaacYEPCHEKIVSKE DE VRAN 1321 gaggagtgtgatgatgatgacgaccgccaagaatgtagttgatggtgatgattataagDDDDDRKNV V D E C G D 1381 aatgtaattgacgatgttcataagaatgaaattgataatgccgatgacgaagtgggtgac N V I D D V H K N E I D N A D D E V G D 1441 gtcgttggtaaatgtgatgagacaattagacatgtcggtattaaggatgtcgatgatgac V G K C D E T I R H V G I K D V D 1501 gatgatgtcggccatgataatgatgtcgatgatgacgatgatgtcggccatgataatgat1561 gtcgatgatgacgatgatgtcggccatgataatgatatcgttggaaatgaggtcgaagtt G H D N D I V G N E V 1621 SFPESFDENGETTOAERS 1681 SIKGSMTSYGNQST V K S gaaattcacgaattaatcggaaaaaagaatttttcaggagga<mark>gattcacgattgttgacaaga</mark> E I H E L I G K K N F S E <mark>D S</mark> S L L T R gttgagcatgaatttggatcagacggcagtggctgcgggggagtctacaactccactttc 1741 1801 V E H E F G S D <mark>D S</mark> G C E E S T T P L F attgatgattcgcacgatcaaaagggagaagatgcgaagaacgacgacaaggaatcaac I D <mark>D S</mark> H D Q K G E D A K N D D K E S T 1861 1921 1981 2041 gtggaatgtttgccatcgaaagttgaaggaattcaacgttcaatcccacgtaattccac V E C L P S K V E G I Q R S I P R N S T 2101 <mark>taagaacateegggategaaagtteaaaggteagagatgaagttgtgaaetttgaeac</mark> L R T S G I E S S K V R D E V V N F D T 2161 .cggtgaagttggagaagggcttc gggttggat ccacggtgaagttggagaagggcttccttgggqttggattctgcatcgagggtgggag T T V K L E K G F L G V G F C I E G G R 2221 <mark>geeteaeeetaeggggacaaaeeaateetgataaaaagggttgteaggtgaegttee</mark> A S P Y G D K P I L I K R V V R G D V P 2281 L R A G D E L V S V N G K E V S S M T S 2341 <mark>ceceaggtgtggagtttaeteaaateaetteeaggtggagtgatggtgetggagttgag</mark> A Q V W S L L K S L P G G V M V L E L <mark>R</mark> 2401 RKE

Figure 24 : Caractérisation du précurseur de *Hm*IL-16, la pro-*Hm*IL-16 : séquence nucléotidique de l'ARNm et séquence protéique déduite.

• La séquence surlignée en gris clair représente la séquence de *Hm*IL-16 initialement déduite de l'analyse des banques EST de SNC de la figure 13.

• La séquence nucléotidique, surlignée en rose, représente la séquence choisie pour produire la recombinante, rHmIL-16.

• Les motifs « D-S », en bleu $(D_{594}-S_{595}, D_{608}-S_{609}, D_{623}-S_{624})$, représentent des sites de clivage potentiels pour une enzyme de type caspase.

• Les motifs "GVGF", "RRKE" et le résidu tryptophane "W" sont encadrés.



Figure 25 : Analyse de la séquence protéique de la pro-*Hm*IL-16 via le logiciel BLAST-P (NCBI) et comparaison avec les précurseurs de l'IL-16 humaine. Présence d'un unique domaine PDZ conservé à l'extrémité C-terminale de la pro-*Hm*IL-16. Les précurseurs de l'IL-16 humaine, la pro-IL-16 et la pro-NIL-16, contiennent respectivement 3 et 5 domaines PDZ. L'extrémité N-terminale de ces deux précurseurs de la cytokine humaine possède 2 et 4 domaines PDZ. Aucun domaine PDZ n'ayant été détecté sur son extrémité N-terminale, la pro-*Hm*IL-16 diverge donc de la pro-IL-16 et de la pro-NIL-16 identifiées chez l'Homme. D'ailleurs, aucun autre domaine conservé n'a été détecté par le logiciel sur la pro-*Hm*IL-16.

Accession number	Protein ID	Species	Homology
XP 003372219.1	PDZ domain protein	Trichinella spiralis (Trichine)	43%
XP 002407719.1	PDZ-containing protein	Ixodes scapularis (Tique)	49%
EFN78868.1	Interleukin-16	Harpegnathos saltator (Fourmi sauteuse)	40%
AAX36076.3	Interleukin-16	Tetraodon nigroviridis (Poisson lune)	44%

Tableau 4: Pourcentages d'homologie entre la pro-*Hm*IL-16 et les molécules répertoriées dans les banques de données (tableau obtenu via le logiciel BLAST-P, sur le site NCBI). Les homologies sont estimées entre 40 et 49%.



Figure 26 : Westerns blot de milieux (MC) ayant incubé les SNC lésés de sangsue sur des temps différents: 6h (MC6h), 24h (MC24h) et 72h (MC72h). À gauche, Western Blot réalisé avec l'anticorps anti-*Hm*IL-16 saturé (dilution $1/1000^{\text{ème}}$) avec 50 µg de KLH. Présence d'une bande à 90 kDa. Au centre, Western Blot réalisé avec l'anticorps polyclonal anti-IL-16 humaine (dilution $1/1000^{\text{ème}}$). Présence d'une bande à 90 kDa. À droite, le Western blot contrôle réalisé avec l'anticorps secondaire seul. Aucun signal détecté sur l'ensemble des MC testés. Les signaux observés à 90 kDa sont donc spécifiques.

Ainsi, *Hm*IL-16 semble être d'abord synthétisée sous la forme d'un précurseur, la pro-*Hm*IL-16, ayant un poids moléculaire théorique de 87 kDa (figure 24). L'extrémité C-terminale de ce précurseur contient un domaine PDZ hautement conservé, et elle présente une homologie de 62% avec la cytokine humaine (figure 25).

Or, le milieu conditionné (MC) et la forme active de l'IL-16 humaine recrutent les cellules microgliales de sangsue de manière dose-dépendante, avec un optimum observé pour la cytokine humaine à la concentration de 1µg/ml (figures 11, 14A, 14B) [5]. De plus, ce recrutement, induit par le MC, est inhibé lorsque la microglie de sangsue est pré-incubée soit avec l'anticorps anti-*Hm*IL-16 soit avec l'anticorps anti-*IL*-16 humaine (figure 14B). Cette donnée est importante car elle met en évidence l'analogie fonctionnelle qui existe entre *Hm*IL-16 et l'IL-16 humaine. Afin de comprendre comment *Hm*IL-16 recrute les cellules microgliales de sangsue, il est nécessaire de déterminer quelle est la séquence ou la partie fonctionnelle de la cytokine de sangsue.

B. <u>Étude du recrutement des cellules microgliales de sangsue</u> par HmIL-16 et l'IL-16 humaine

La séquence «106RRKSLQKETTAAGDS120», présente dans la forme active de l'IL-16 humaine, est impliquée dans la liaison de la cytokine sur son récepteur [255-257]. D'ailleurs, des expériences de mutagenèse dirigée ont montré que le motif « RRKS », et plus particulièrement l'arginine 107 (R107), semblent jouer un rôle fondamental dans la liaison de la cytokine humaine à son récepteur localisé à la surface de ces cellules cibles [195]. Les analyses précédemment menées ont démontré que le peptide de synthèse, homologue à la séquence «106RRKSLQKETTAAGDS120» de la cytokine humaine, est un inhibiteur compétitif de la forme active de l'IL-16 humaine et du milieu conditionné dans le recrutement des cellules cibles humaines (figure 17) [5, 195, 204]. Or HmlL-16 possède une séquence « RRKE » terminale, localisée pratiquement au même endroit que le motif « RRKS » dans la cytokine humaine (figure 24, encadrés). Enfin, la cytokine humaine recrute les cellules microgliales de sangsue de manière dose-dépendante, avec un optimum observé à la concentration de 1 µg/ml (figure 14A). Par conséguent, afin de définir les modalités d'action de HmlL-16 et de la cytokine humaine sur les cellules microgliales de sangsue, un peptide de synthèse homologue à la séguence «106RRKSLQKETTAAGDS120» de l'IL-16 humaine a été utilisé dans le test de chimiotactisme décrit ci-dessous.

Comme les cellules microgliales de sangsue sont non-adhérentes, les tests de chimiotactisme ont été réalisés en utilisant le protocole décrit par Köhidai [253]. Dans cette expérience, le milieu L-15 seul a été utilisé comme témoin négatif et le milieu conditionné, milieu ayant incubé les chaînes nerveuses lésées de sangsue, a été employé en tant que réactif chimioattractant. Le milieu conditionné (MC) recrute 25% de cellules microgliales (figure 27, piste « MC/ Microglia » vs piste « L-15/ Microglia »). Le peptide de synthèse, homologue à la séquence «106RRKSLQKETTAAGDS120», a été fourni par le Pr. Cruikshank. Les cellules microgliales ont été préincubées avec des quantités croissantes de peptides de synthèse (5 µg, 10 µg ou 20 µg). Ensuite l'activité chimioattractante du milieu conditionné a été mesurée sur ces cellules préincubées avec le peptide de synthèse. De manière très intéressante, la présence du peptide de synthèse inhibe significativement le recrutement des cellules microgliales médié par le milieu conditionné. En effet, les pourcentages de cellules recrutées passent de 25% (figure 27, piste « MC/ Microglia ») à 15,5%, 9,6% et 6,1% respectivement (figure 27, pistes « MC/ Microglia + 5 µg of peptides », « MC/ Microglia + 10 µg of peptides », MC/ Microglia + 20 µg of peptides »). Donc, plus la concentration en peptide augmente plus l'effet inhibiteur est important. De manière intéressante, la pré-incubation de la microglie de sangsue avec l'anticorps monoclonal anti-CD4 humain réduit également le recrutement des cellules microgliales médié par le milieu conditionné de manière significative (figure 27, « MC/ Microglia + Anti human CD4 antibodies »). En effet, le pourcentage de cellules microgliales recrutées par le milieu conditionné se réduit à 6% (figure 27, piste « MC/ Microglia » vs piste « MC/ Microglia + Anti human CD4 antibodies »).



Figure 27 : Inhibition du recrutement, médié par le milieu conditionné (CM pour conditioned medium), des cellules microgliales de sangsue. Le milieu conditionné de sangsue est utilisé comme chimioattractant sur des cellules microgliales qui ont été, soit pré-incubées seules, soit pré-incubées avec le peptide de synthèse ¹⁰⁶RRKSLQETTAAGDS₁₂₀ (5 μ g, 10 μ g et 20 μ g), soit pré-incubées avec l'anticorps monoclonal anti-CD4 humain (dilution 1/100^{ème}). Le contrôle négatif de migration a utilisé le milieu L-15 comme chimioattractant.

Le peptide de synthèse «106RRKSLQKETTAAGDS120» inhibe significativement le recrutement des cellules microgliales induit par le milieu conditionné (figure 27). Il s'agit donc là encore d'un inhibiteur compétitif de *Hm*IL-16 pour le recrutement des cellules microgliales de sangsue. Ces résultats suggèrent fortement que la reconnaissance entre HmlL-16 et son récepteur microglial est portée par une région similaire (figure 27). Chez l'Homme, des études ont montré que le motif RRKS de l'IL-16 est impliqué dans les mécanismes de reconnaissance entre la cytokine humaine et son récepteur [255-257]. Or HmlL-16 possède une séquence RRKE, située à l'extrémité C-terminale de son domaine PDZ (figure 24). De plus, le recrutement des cellules microgliales de sangsue, induit par le milieu conditionné (MC), est inhibé suite à la pré-incubation de ces cellules avec l'anticorps monoclonal anti-CD4 humain (figure 27). L'ensemble de ces résultats (figure 27), corrélés avec les résultats des expériences précédemment effectuées sur les cellules T CD4+ humaines (figure 17), mettent en évidence la présence probable de récepteurs, reconnus par l'IL-16 humaine et HmIL-16, à la surface des cellules microgliales de sangsue. Cela sous-entend notamment l'existence d'un récepteur probablement analogue au CD4 humain à la surface des cellules microgliales de sangsue.

C. <u>Sur la piste d'un récepteur analogue au CD4 humain à la</u> surface des cellules microgliales de sangsue

L'emploi de l'anticorps anti-CD4 humain permet d'inhiber le recrutement des cellules microgliales de sangsue médié par le milieu conditionné (figure 27). L'anticorps anti-CD4 humain semble donc reconnaître une protéine, potentiellement analogue au CD4 humain, impliquée dans l'activité chimioattractante de l'IL-16 humaine ou de *Hm*IL-16 sur les cellules microgliales de sangsue. Afin de confirmer cette hypothèse, plusieurs expériences ont été réalisées en employant des anticorps, monoclonal et polyclonal, anti-CD4 humain.

1. <u>Détection d'une protéine dans le SNC de la sangsue</u>

Dans un premier temps, un western blot a été réalisé, en employant l'anticorps polyclonal anti-CD4 humain, sur des protéines totales extraites de chaînes nerveuses de sangsue lésées (PT0h). Il est possible de visualiser un unique signal à 48-49 kDa (figure 28A, piste 1). La reconnaissance antigène-anticorps est spécifique

puisque le contrôle n'utilisant que l'anticorps secondaire, effectué sur le même échantillon, est négatif (figure 28A, piste 2). Une molécule apparentée au CD4 semble donc présente dans le SNC de la sangsue.

En outre, le résultat d'une expérience de cytométrie en flux montre que l'anticorps monoclonal anti-CD4 humain marqué au FITC (Isothiocyanate de fluorescéine) se fixe à la surface de 4,5% de cellules microgliales (figure 28B). Cependant, il est nécessaire de conforter ce résultat préliminaire. La même expérience doit être effectuée en y incluant l'expérience contrôle utilisant l'isotype contrôle de l'anticorps monoclonal anti-CD4 de souris marqué également FITC sur une population de cellules microgliales.



Figure 28 : Détection d'une protéine dans le SNC de la sangsue par l'anticorps anti-CD4 humain. (A) Western Blot réalisé avec l'anticorps polyclonal anti-CD4 humain (1/1000^{ème}) sur des extraits de protéines totales de 8 SNC de sangsue obtenus directement après dissection des chaînes nerveuses (PT0h). Un signal unique observé à 48-49 kDa (Piste 1). Le contrôle réalisé avec l'anticorps secondaire seul ne présente aucun signal (Piste 2). (B) Expérience de cytométrie en flux sur les cellules microgliales de sangsue avec l'emploi d'un anticorps monoclonal anti-CD4 humain FITC marquant 4,5% de cellules.

Par ailleurs, des expériences d'immunohistochimie ont été réalisées, en utilisant l'anticorps polyclonal anti-CD4 humain, sur des chaînes nerveuses de sangsue lésées. Les images prises au microscope confocal révèlent un immunomarquage au niveau des connectifs, immédiatement après la lésion (figure 29A, T0h). De plus, le signal anti-CD4 augmente progressivement au cours du temps pour atteindre un maximum à T24h au niveau de la zone de lésion (figure 29B,

T24h). Ce phénomène peut d'ailleurs être corrélé à l'accumulation des cellules microgliales, dont le noyau est marqué au Hoechst, au niveau du site de blessure. Un agrandissement du site de lésion permet de visualiser les cellules microgliales immunopositives (figure 29B", T24h). Les encarts A' et B' représentent des analyses immunohistochimiques contrôles, réalisées dans les mêmes conditions mais avec l'anticorps secondaire seul. L'absence de signal sur ces images prouve la spécificité de la reconnaissance antigène-anticorps dans ces expériences *ex vivo* (figures 29A' et 29B').



Figure 29 : (**A**) Analyse immunohistochimique effectuée sur un système nerveux lésé de sangsue en utilisant l'anticorps polyclonal anti-CD4 humain (dilution 1/500^{ème}), produit chez le lapin. L'observation a été réalisée immédiatement après lésion (T0h). L'image présentée en (**A'**) montre un système nerveux de sangsue lésé analysé avec l'anticorps secondaire seul. (**B**) Analyse immunohistochimique réalisée sur SNC lésé de sangsue, 24h après lésion (T24h), en utilisant l'anticorps polyclonal anti-CD4 humain (dilution 1/500^{ème}), produit chez le lapin. (**B'**) L'image présentée montre un système nerveux de sangsue lésé traité avec les mêmes conditions expérimentales mais avec l'anticorps secondaire seul. (**B''**) Grossissement d'une région du site lésé permettant de visualiser des cellules microgliales marquées avec l'anticorps polyclonal anti-CD4 humain. Les noyaux des cellules sont marqués au Hoechst (visualisables en blanc sur les images). Les images ont été prises au microscope confocal et les prises de vue sont faites au niveau de la zone de crush.

2. <u>Le recrutement microglial médié par *Hm*IL-16 et l'IL-16 humaine</u> <u>semble associé à la molécule apparentée au CD4</u>

En parallèle, d'autres expériences de chimiotactisme ont été réalisées sur les cellules microgliales de sangsue en employant les anticorps anti-CD4 humain. Les premières expériences de chimiotactisme, réalisées en utilisant du milieu conditionné de sangsue (MC ou CM) ou l'IL-16 humaine à 1µg/ml, confirment la capacité de recrutement de ces deux chimioattractants sur la microglie de sangsue. En effet, 20 à 25% de cellules sont recrutées par le MC (figure 30A, piste A2) et la cytokine humaine recrute 5 à 6% de cellules microgliales de sangsue (figure 30B, piste B2), ce qui est cohérent avec les analyses précédemment menées (figure 14A et 14B). Suite à la pré-incubation des cellules microgliales de sangsue avec l'anticorps monoclonal anti-CD4 humain, le recrutement induit par le MC est significativement limité puisque le pourcentage de cellules recrutées chute à 13,5% (figure 30A, piste A3). L'effet chimioattractant de l'IL-16 humaine est, quant à lui, complètement inhibé (figure 30B, piste B3) à la suite de la pré-incubation des cellules microgliales de sangsue avec l'anticorps monoclonal anti-CD4 humain. En effet, le nombre de cellules recrutées par la cytokine humaine est comparable à celui du contrôle négatif utilisant le L-15 comme chimioattractant (figure 30B, pistes B1 et B3).

De plus, lors d'un test de chimiotactisme complémentaire, le recrutement des cellules microgliales de sangsue induit par l'IL-16 humaine a été réduit de moitié en présence de CD4 soluble (figure 31). En effet, dans cette expérience, l'IL-16 humaine, utilisée à la concentration optimale de 1µg/ml, recrute plus de 6% de cellules microgliales alors que le témoin négatif (L-15) n'en attire qu'environ 1% (figure 31, piste « IL-16h/ Microglia » vs piste « L-15/ Microglia »). Le pourcentage de cellules recrutées diminue à environ 3% quand la cytokine humaine, toujours utilisée à la concentration de 1µg/ml, est mise en présence de 5 µg de CD4 soluble (figure 31, piste « IL-16h/ Microglia » vs piste « IL-16h+CD4s/ Microglia ». La quantité de CD4 soluble a été choisie de façon à reproduire les conditions expérimentales établies précédemment (figure 17C) [5]. De plus, la pré-incubation de la microglie de sangsue avec l'anticorps polyclonal anti-CD4 humain reproduit à nouveau cette réduction du nombre de cellules recrutées par l'IL-16 humaine (figure 31, piste « IL-16h/ Microglia + Anti human CD4 antibodies »). Il est à noter que l'emploi de l'isotype

contrôle sur les cellules microgliales de sangsue n'a aucune influence significative sur le recrutement induit par la cytokine humaine ce qui prouve l'action spécifique de l'anticorps (figure 31, piste « IL-16h/ Microglia + IgG antibodies (control)»). La molécule de sangsue reconnue spécifiquement par l'anticorps polyclonal anti-CD4 humain est par conséquent associée à l'activité chimioattractante exercée par *Hm*IL-16 et par l'IL-16 humaine.



Figure 30 : Tests de chimiotactisme réalisés sur les cellules microgliales de sangsue en employant comme chimioattractant, soit le milieu conditionné 24h (A2, A3), soit l'IL-16 humaine (B2, B3). Le L-15 est utilisé comme chimioattractant dans le témoin de contrôle négatif (A1, B1). Les cellules microgliales sont soit pré-incubées seules (A1, A2; B1, B2) soit pré-incubées avec l'anticorps monoclonal anti-CD4 humain (A3, B3).



Figure 31 : Recrutement des cellules microgliales de sangsue par la forme active de l'IL-16 humaine. Le L-15 comme chimioattractant sert de contrôle négatif. Les cellules sont soit pré-incubées seules (pistes Microglia), soit avec l'anticorps polyclonal anti-CD4 humain (piste Microglia + Anti human CD4 antibodies), ou de l'isotype contrôle (piste Microglia + IgG antibodies (control)). De plus, 5 μ g de CD4 soluble, mis en présence d'IL-16 humaine, inhibent significativement le recrutement des cellules T CD4+ humaines.

3. <u>Mise en évidence de l'interaction *Hm*IL-16/récepteur</u>

Si une molécule apparentée au CD4 humain est associée à l'action chimioattractante de *Hm*IL-16, il semble nécessaire de vérifier qu'elles soient capables d'interagir. Pour cela, des expériences de co-immunoprécipitation ont été réalisées. L'anticorps anti-*Hm*IL-16 a été incubé dans le milieu conditionné (MC) afin d'y coupler la cytokine native de sangsue. Ces complexes ont ensuite été greffés sur des billes d'agarose A/G+ par l'interaction entre les protéines A/G et les fragments Fc des immunoglobulines. Ces complexes immuns ont alors interagi avec des extraits protéiques de chaînes nerveuses de sangsue (PT0h). Enfin, les éluâts ont été analysés par western blot en employant l'anticorps monoclonal anti-CD4 humain.

Ce western blot met en évidence un signal unique à 48-49 kDa. De plus, il est spécifique puisque le western blot contrôle, également réalisé sur les éluâts de la coimmunoprécipitation avec l'anticorps secondaire seul est négatif (figure 32). Ce produit de 48-49 kDa avait été observé par western blot à partir d'extraits protéiques totaux de chaînes nerveuses de sangsue (PT0H), en utilisant le même anticorps (figure 28A). Il semble donc que *Hm*IL-16, présente dans le milieu conditionné de sangsue (MC), soit capable de se lier à une molécule réceptrice, reconnue par les immunoglobulines anti-CD4 humain.



Figure 32 : Expérience de co-immunoprécipitation réalisée en incubant des billes agarose A/G+ avec l'anticorps polyclonal anti-*Hm*IL-16, un milieu conditionné (CM), et des extraits de protéines totales de chaînes nerveuses de sangsue, réalisées immédiatement après les dissections (PT0h). Les complexes immuns ont été analysés par western blot en employant l'anticorps monoclonal anti-CD4 humain ($1/1000^{\text{ème}}$) de souris. L'anticorps secondaire seul permet de repérer les immunoglobulines ayant servies pour effectuer la co-immunoprécipitation. Sur ces westerns blot, il est possible de distinguer une protéine à environ 48-49 kDa (flèche rouge), reconnue spécifiquement par l'anticorps monoclonal anti-CD4 humain.

Cependant, aucune molécule homologue au CD4 humain n'a été détectée dans les banques EST de sangsue. Par conséquent, pour confirmer la présence d'une molécule apparentée au CD4 humain à la surface des cellules microgliales, il est nécessaire de caractériser par spectrométrie de masse cette protéine détectée par les anticorps anti-CD4 humain.

L'objectif étant de caractériser le récepteur d'*Hm*lL-16 et de vérifier la spécificité de l'interaction entre la protéine reconnue par l'anticorps anti-CD4 humain et *Hm*lL-16, une immunoprécipitation suivie d'une co-immunoprécipitation ont été réalisées en utilisant les billes magnétiques, l'anticorps polyclonal anti-CD4 humain, les extraits protéiques totaux (PT0h) et le milieu conditionné (MC24h). Deux expériences contrôles ont été effectuées en parallèle afin d'obtenir les séquences peptidiques correspondant aux immunoglobulines et aux protéines du MC24h interagissant potentiellement avec les protéines A ou avec les immunoglobulines présentes à la surface des billes (figure 33).

Afin de mettre en évidence l'interaction entre le récepteur de *Hm*IL-16 reconnu par les anticorps anti-CD4 humain et la cytokine de sangsue, un western blot

contrôle a été effectué sur l'ensemble des éluâts en employant l'anticorps polyclonal anti-IL-16 humaine. En effet, comme cela a déjà été démontré, l'anticorps anti-IL-16 humaine reconnait de façon spécifique *Hm*IL-16. Sur ce western blot, deux protéines ont été détectées (figure 33, flèches rouges). La première molécule visualisable possède un poids moléculaire de 80 kDa, ce qui est cohérent avec les analyses précédemment menées. Le second produit, situé à 55-60 kDa, également détecté par l'anticorps anti-IL-16 humaine, semble être également *Hm*IL-16 sous une autre forme.



Figure 33 : Expériences de co-immunoprécipitation réalisées avec un anticorps polyclonal anti-CD4 humain greffé sur les billes magnétiques (1). Sur cette construction s'ajoutent des extraits protéiques totaux (2), puis du MC24h (3). Une expérience contrôle consiste à incuber le MC24h sur les billes greffées avec l'anticorps en omettant l'incubation avec les extraits protéiques (4). Les éluâts issus des 4 conditions sont analysés par western blot en utilisant l'anticorps anti-IL-16 humaine. Sur la piste 3, les flèches rouges indiquent les protéines détectées (60 et 80 kDa).

D. Caractérisation du récepteur d'HmIL-16

1. <u>Co-immunoprécipitation et stratégie « Bottom Up »</u>

La digestion trypsique de la bande anti-CD4 positive (figure 32), résultant de la migration sur gel des éluâts de la co-immunoprécipitation, a abouti à l'obtention d'un profil peptidique dont les représentants très majoritaires sont les immunoglobulines de l'anticorps polyclonal anti-*Hm*IL-16, produit chez le lapin et ayant servi dans la co-immunoprécipitation. En effet, l'élution des produits de la co-immunoprécipitation n'est pas sélective ce qui explique que les anticorps polyclonaux soient élués en même temps que le complexe ligand-interactant. Les conditions dénaturantes de la migration sur gel SDS-PAGE ont permis la séparation des chaînes lourdes et légères constituant les anticorps. De plus, les complexes *Hm*IL-16/interactants étant minoritaires par rapport aux immunoglobulines, ils n'ont pas été mis en évidence dans les profils peptidiques.

En parallèle, en se basant sur la position du signal anti-CD4 positif obtenu par western blot à partir des extraits protéiques totaux (PT0h) de la figure 28A, des protéines de taille identique ont été excisées à partir des mêmes extraits séparés sur un gel de polyacrylamide coloré au bleu de Coomassie. Leurs produits de digestion trypsique ont été analysés par spectrométrie de masse sans pour autant parvenir à les identifier dans les banques de données.

Pour conclure, les premières analyses par MALDI-TOF/TOF, en employant une stratégie « Bottom Up », ont échoué à cause d'une concentration trop importante d'anticorps anti-*Hm*IL-16 dans la bande représentée sur le western blot de la figure 33 et à cause très probablement de la complexité du mélange protéique dans la bande présente sur la figure 28A.

2. Billes magnétiques et stratégie « Top Down »

Cette autre stratégie de purification a fait l'objet d'un long travail personnel de mise au point avant de pouvoir la mettre en œuvre dans la caractérisation des interactants de *Hm*IL-16. Cette méthode repose toujours sur le principe d'immuno-affinité : il s'agit d'une immunoprécipitation classique. L'objectif est de caractériser la

protéine détectée par les anticorps polyclonaux anti-CD4 humain. Dans un premier temps, ces anticorps ont été fixés de façon covalente aux protéines A, présentes à la surface des billes magnétiques, grâce à une solution de bis(sulfosuccinimidyl) suberate (BS3), un agent permettant de fixer les anticorps de manière covalente aux billes. Cette étape vise à éviter toute contamination des éluâts par les immunoglobulines. Dans un second temps, le complexe billes-anticorps a été mis en incubation avec des extraits protéiques PT0h. Après élution, la protéine reconnue par les immunoglobulines anti-CD4 humain a été analysée par MALDI-TOF/TOF via une stratégie « Top Down ». Les analyses par MALDI-TOF/TOF ont démontré une absence totale de protéine dans l'éluât. Deux expériences ont été réalisées en parallèle. La première, avec liaison covalente de l'anticorps sur les billes, a démontré que le réactif BS3 agit également sur le paratope des immunoglobulines, bloguant ainsi la reconnaissance antigénique. De ce fait, il n'est pas possible que la molécule apparentée au CD4 soit reconnue par l'anticorps. A l'inverse, sans cette étape de fixation covalente des anticorps sur les billes, la reconnaissance anticorps-antigène est possible mais engendre une co-élution des anticorps et de la protéine d'intérêt. Il est par conséquent beaucoup plus difficile de caractériser la molécule reconnue par les immunoglobulines anti-CD4 humain en raison de cette contamination.

Cependant, un autre procédé est envisagé et il sera détaillé dans la discussion.

II. Étude d'HmC1q et de ses récepteurs HmC1qBP et HmcC1qR

A. Effet chimioattractant de la forme recombinante rHmC1q

1. <u>Production de la forme recombinante r*Hm*C1q chez *Pichia* <u>pastoris</u></u>

La séquence de HmC1q décrite préalablement (figure 19) a tout d'abord été insérée dans le plasmide pPIC3.5 K. Après l'internalisation du plasmide recombinant dans la levure Pichia pastoris, la protéine recombinante rHmC1g a été produite sous le contrôle du promoteur AOX1 activé par le méthanol puis sécrété grâce à la présence de son peptide signal. La sélection du clone positif s'est effectuée en analysant par western blot les surnageants de culture des différents clones P. pastoris transformés en utilisant l'anticorps polyclonal spécifique anti-HmC1q (figure 34A). Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre rHmC1g et la forme native sécrétée dans le milieu conditionné (figure 34A, pistes « Positive clone » et « Control »). Les surnageants des clones P. pastoris non transformés ont été analysés par western blot en utilisant le même anticorps et n'ont présenté aucun signal. Les trois bandes sur la piste « Positive clone » suggèrent la présence de petites différences, probablement liées aux modifications post-traductionnelles de la protéine recombinante. Cependant, la bande la plus intense possède le même poids moléculaire que la molécule native, HmC1q. La protéine recombinante, rHmC1q, a été ensuite purifiée par chromatographie en phase inverse. La protéine recombinante, rHmC1q, est éluée à 10% d'acétonitrile (ACN) et l'analyse par western blot de la fraction éluée révèle la présence d'une seule bande à 33 kDa. Cette masse moléculaire est identique à celle de la protéine native, HmC1q (figure 34B). La spécificité de la reconnaissance a également été vérifiée en effectuant un western blot en employant le sérum pré-immun de l'anticorps anti-HmC1g. Aucun signal n'étant visible sur ce contrôle (résultat non présenté), l'interaction entre les immunoglobulines anti-*Hm*C1q et r*Hm*C1q est spécifique.



Figure 34 : Production de la forme recombinante d'HmC1q (rHmC1q) dans un système eucaryote, chez *Pichia pastoris*. (A) Immunodétection de rHmC1q par western blot en employant l'anticorps polyclonal anti-HmC1q. Le profil obtenu dans la culture de *P. pastoris* transformée (« positive clone ») est comparé à celui du surnageant de culture de *P. pastoris* non transformée (« negative clone »), mais aussi à celui réalisé sur le milieu conditionné (MC) en utilisant le même anticorps permettant de visualiser la forme native d'HmC1q (« control »). (B) Chromatogramme, obtenu par RP-HPLC, réalisé en injectant les protéines du clone *P. pastoris* immunopositif sur une colonne C8 qui sont ensuite éluées par un gradient linéaire d'acétonitrile (ACN). La molécule rHmC1q est éluée à 10% d'ACN puis a été détectée par western blot en employant l'anticorps polyclonal anti-HmC1q (encart).

2. <u>Activité chimioattractante de rHmC1q</u>

Il a été précédemment observé que le milieu conditionné (MC) recrute les cellules microgliales et que la pré-incubation de la microglie avec l'anticorps polyclonal spécifique anti-HmC1q réduit significativement ce recrutement [1] (figure 23). Par conséquent, il est établi que la forme native HmC1q, présente dans le MC, possède une activité chimioattractante sur les cellules microgliales de sangsue. Cependant, le MC est un milieu complexe, contenant plusieurs facteurs chimioattractants. Ainsi, pour mesurer plus précisément l'activité chimioattractante spécifique de HmC1q, le milieu de culture des clones P. pastoris transformés contenant rHmC1q (surnageant rHmC1q) a été utilisé dans l'expérience de chimiotactisme, décrite ci-dessous, menée sur les cellules microgliales de sangsue (figure 35). Dans ce test, en parallèle, l'activité du surnageant contrôle, provenant des clones non transformés P. pastoris, a été évaluée de façon analogue. Des volumes croissants (0.1, 1, 3, 8 et 15 µl) des deux surnageants ont été dilués dans du L-15 et ces deux gammes de dilution ont été employées. Comparé au surnageant P. pastoris contrôle, le surnageant rHmC1q semble recruter les cellules microgliales de sangsue de façon significative et dose-dépendante. Une activité optimale a été observée en utilisant 8 µl de surnageant HmC1g positif. Le nombre de cellules recrutées diminue si cet échantillon est utilisé en plus grande quantité (15 µl) suggérant une diffusion importante de la molécule vers le puits de dépôt des cellules cibles et empêchant ainsi le déplacement par chimiotactisme de certaines d'entre elles vers le puits d'arrivée. Cet effet dose-dépendant est caractéristique des molécules à propriétés chimioattractantes.



Figure 35 : Effets chimioattractants de r*Hm*C1q sur les cellules microgliales de sangsue. L'effet chimioattractant du surnageant *P. pastoris* contenant r*Hm*C1q est comparé à celui médié par le surnageant *P. pastoris* contrôle (qui ne contient pas la recombinante). Des volumes similaires, de chacun des surnageants, ont été dilués dans du L-15 (0.1, 1, 3, 8 et 15 μ l). Le diagramme illustre l'activité chimioattractante dose-dépendante de r*Hm*C1q. Les astérisques précisent que les différences de migration sont significatives (*p*<0.01).

De manière intéressante, les résultats du test de chimiotactisme sont corroborés par les expériences *ex vivo*, réalisées sur des fragments de chaînes nerveuses de sangsue lésées (figure 36). Ces expériences reposent sur l'injection du surnageant *P. pastoris* contenant *rHm*C1q ou du surnageant contrôle au niveau du site de lésion (c et d). Deux injections de PBS ont été pratiquées afin de visualiser le recrutement normal des cellules microgliales en conditions physiologiques immédiatement et dans les 4 heures qui suivent la lésion (a et b). Les injections de PBS servent également de témoin pour évaluer l'activité des deux surnageants *P. pastoris*. Les cellules microgliales sont marquées au Hoechst afin de visualiser leur migration et leur accumulation au niveau de la lésion dans un délai de 4 heures. Les résultats montrent que le nombre de cellules recrutées à la lésion augmente au cours du temps (a vs. b). Ils montrent également que leur nombre semble similaire entre les deux conditions contrôles, PBS et surnageant *P. pastoris* témoin, réalisées 4

heures après la lésion (b vs. d). Cependant, il est possible de visualiser un marquage Hoechst plus intense au niveau de la lésion suite à l'injection du surnageant *P. pastoris* contenant r*Hm*C1q (c vs. b; c vs. d). Par conséquent, comparés aux injections de PBS ou de surnageant *P. pastoris* contrôle, l'injection du surnageant r*Hm*C1q augmente significativement le recrutement de la microglie vers la zone lésée. Par ailleurs, l'injection, simultanément au phénomène de lésion, de l'anticorps polyclonal anti-*Hm*C1q, produit chez le lapin, réduit significativement le recrutement microglial médié par r*Hm*C1q (f vs. c). Cet effet inhibiteur est spécifique car l'injection du sérum pré-immun de lapin n'a aucun effet négatif significatif sur le recrutement induit par r*Hm*C1q (c vs. e).



Figure 36 : Effets chimioattractants de r*Hm*C1q sur les cellules microgliales de sangsue dans des expériences *ex vivo*. Le marquage nucléaire au Hoechst permet de visualiser la migration des cellules microgliales immédiatement après la lésion (**a**) et leur accumulation au niveau de la zone lésée après 4h (**b**), tous deux suite à l'injection de PBS (contrôles). L'injection de r*Hm*C1q permet d'augmenter significativement ce recrutement, 4h après la lésion (**c**). L'injection de surnageant *P. pastoris* contrôle n'augmente pas l'accumulation des cellules microgliales au niveau de la lésion (**d**). Par contre, l'injection concomitante de l'anticorps polyclonal anti-*Hm*C1q, produit chez le lapin, et de r*Hm*C1q réduit significativement la migration et l'accumulation de la microglie au niveau du site lésé (**f**). L'action de l'anticorps est spécifique puisque l'injection du sérum pré-immun de lapin ne bloque pas l'effet de r*Hm*C1q et permet le recrutement et l'accumulation de la microglie au niveau du site lésé (**e**).

L'ensemble de ces résultats confirme la capacité chimioattractante de *Hm*C1q sur les cellules microgliales de sangsue. En effet, le recrutement microglial médié par la protéine recombinante est non seulement spécifique (f vs. e) mais aussi dosedépendant (figure 35). Par ailleurs, le C1q humain semble recruter les cellules microgliales de sangsue de manière identique à r*Hm*C1q [1]. Cette donnée est particulièrement importante car elle suggère l'existence de récepteurs reconnus par la cytokine humaine à la surface des cellules microgliales de sangsue. Or, chez l'Homme, deux récepteurs impliqués dans les phénomènes de migration cellulaire ont été caractérisés. Il s'agit du gC1qR (alias C1qBP) et du cC1qR [247, 251]. Par conséquent, il est probable que *Hm*C1q et le C1q humain exercent leur activité chimioattractante sur les cellules microgliales de sangsue en se liant à des récepteurs apparentés.

B. Mise en évidence des récepteurs : HmC1qBP et HmcC1qR

1. <u>Impact des anticorps polyclonaux anti-gC1qR et anti-cC1qR</u> <u>humains sur le recrutement des cellules microgliales de</u> <u>sangsue</u>

Dans un souci de cohérence, les surnageants P. pastoris contrôle et rHmC1q positif ont été utilisés à la dilution optimale, c'est-à-dire, 8 µl de surnageant dilué dans du L-15 pour un volume final de 50 µl. Deux témoins négatifs ont été utilisés : le L-15 et le surnageant d'un clone P. pastoris non transformé. Comparé au surnageant rHmC1q (figure 37), les deux contrôles négatifs (L-15 et surnageant contrôle P. pastoris) ne recrutent pas les cellules. Par conséquent, ces résultats montrent une fois de plus que des cellules microgliales de sangsue peuvent migrer sous l'effet de rHmC1q. Par ailleurs, la pré-incubation des cellules microgliales avec l'anticorps polyclonal anti-HmC1q, produit chez le lapin, inhibe le recrutement de la microglie médié par la protéine recombinante de façon significative alors que l'emploi du sérum pré-immun de lapin n'a aucun effet négatif sur le recrutement médié par rHmC1q. Dans cette analyse, la condition expérimentale la plus intéressante porte sur le nombre de cellules recrutées par rHmC1q lorsque les cellules microgliales sont préincubées avec l'anticorps polyclonal anti-gC1qR humain. En effet, ce traitement spécifique déclenche une baisse significative du nombre de cellules accumulées. L'incubation des cellules avec l'isotype contrôle n'a aucun effet significatif sur le recrutement des cellules microgliales de sangsue induit par la recombinante. Ce résultat suggère fortement l'existence d'un récepteur analogue au gC1qR humain présent à la surface des cellules microgliales de sangsue.



Figure 37 : Effets inhibiteurs des anticorps anti-HmC1q et anti-gC1qR humain sur le recrutement de cellules microgliales de sangsue médié par rHmC1q. Le nombre de cellules microgliales recrutées a été évalué en présence soit de L-15, soit du surnageant *P. pastoris* contrôle, soit de la recombinante, rHmC1q comme chimioattractants. 8 µl de chaque surnageant ont été dilués dans le L-15. La pré-incubation des cellules microgliales a été réalisée avec soit l'anticorps polyclonal anti-HmC1q [barres d'histogramme hachurées en noir], soit l'anticorps polyclonal anti-G1q humain [barres d'histogramme avec les pointillés noirs]. Les contrôles négatifs ont été réalisés avec le sérum pré-immun du lapin [barres d'histogramme hachurées en gris clair], pour vérifier la spécificité de l'anticorps anti-HmC1q, et avec les IgG isotypes de lapin [barres d'histogramme avec les pointillés gris clair], afin de valider la spécificité des anticorps anti-gC1qR humain. Les astérisques précisent que les différences de migration sont significatives (p<0.01).

Un test de chimiotactisme supplémentaire a été effectué afin de déterminer l'influence de l'anticorps anti-cC1qR humain et du cC1qR soluble sur le recrutement de la microglie médié par la recombinante (figure 38). Le surnageant des clones transformés recrute près de 12% des cellules microgliales. Ce recrutement, comparé au pourcentage de cellules recrutées par le surnageant contrôle, est significatif. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus dans l'expérience précédente (figure 37) puisque si nous rapportons la migration contrôle (surnageant contrôle de *P. pastoris* non transformée) à 100%, le recrutement médié par le surnageant *P. pastoris* contenant r*Hm*C1q est de près de 600%. Le L-15 n'ayant aucun effet chimioattractant sur les cellules (figure 37), ce milieu n'a pas été employé à nouveau comme témoin négatif dans ce test (figure 38). Le recrutement réduit quand la

molécule cC1gR soluble est ajoutée au surnageant P. pastoris contenant rHmC1g. En effet, le pourcentage de cellules recrutées par rHmC1q est réduit à environ 4% (200% du contrôle de la migration contre 600% pour rHmC1g) quand 5 µg de cC1gR soluble sont ajoutés au milieu contenant les 8 µl de surnageant des clones transformés (figure 38, piste « rHmC1g supernatant/ Microglia alone» vs piste «rHmC1q supernatant + soluble cC1qR/ Microglia alone»). En outre, la préincubation de la microglie de sangsue avec l'anticorps polyclonal anti-cC1qR humain inhibe également le recrutement induit par le surnageant rHmC1q (figure 38, piste « rHmC1q supernatant/ Microglia + Anti human cC1qR antibodies»). Cette baisse du nombre de cellules attirées à près de 4% (200% du contrôle de la migration contre 600% pour rHmC1q) est spécifique et significative puisque l'emploi de l'isotype contrôle sur les cellules microgliales de sangsue ne diminue pas le recrutement de la microglie médié par rHmC1q (figure 38, piste « rHmC1q supernatant/ Microglia + IgG antibodies (control)»). Ainsi, le cC1qR soluble et l'anticorps polyclonal anti-cC1qR humain inhibent le recrutement microglial médié par la protéine recombinante et l'effet inhibiteur de l'anticorps semble spécifique. Ces données suggèrent donc l'existence d'un récepteur analogue au cC1gR humain à la surface des cellules microgliales de sangsue.



Figure 38 : Effets inhibiteurs du cC1qR soluble (5 μ g) et de l'anticorps polyclonal anti-cC1qR humain sur le recrutement des cellules microgliales de sangsue médié par r*Hm*C1q. Le surnageant de culture de *P. pastoris* non transformée sert de témoin de migration (contrôle négatif). Le recrutement de la microglie induit par r*Hm*C1q a été évalué et sert de témoin contrôle positif (emploi de 8 μ l de surnageant des clones transformés *P. pastoris*). La piste « r*Hm*C1q supernatant + soluble cC1qR » représente le recrutement de la microglie induit par la protéine recombinante en présence de cC1qR soluble. Ensuite, les cellules microgliales ont été préincubées avec soit l'anticorps polyclonal anti-cC1qR humain (piste « r*Hm*C1q / Microglia + Anti human cC1qR antibodies »), soit l'anticorps isotype contrôle (piste « r*Hm*C1q / Microglia + IgG antibodies (control) ». Comparé aux isotypes contrôles, l'anticorps anti-cC1qR humain réduit significativement le recrutement des cellules microgliales induit par r*Hm*C1q.

Il semble donc que *Hm*C1q agisse comme une chimiokine, recrutant les cellules microgliales de façon dose-dépendante. En présence de cC1qR soluble ou en pré-incubant les cellules microgliales de sangsue avec les anticorps polyclonaux anti-gC1qR et anti-cC1qR humains, l'activité chimioattractante de la protéine recombinante est fortement altérée. Il est donc probable que des protéines, présentes dans le SNC de la sangsue et homologues aux g- ou c-C1qR humains, soient impliquées dans le recrutement de la microglie induit par *Hm*C1q.

De manière intéressante, en analysant la banque normalisée d'EST construite à partir d'ARN totaux de système nerveux de sangsues adultes, deux molécules homologues aux formes humaines ont été identifiées et ont fait l'objet d'analyses.

2. <u>Caractérisation de molécules analogues au gC1qR et cC1qR</u> <u>humains</u>

a. Identification de HmC1qBP

La séquence ARNm présente dans la banque de système nerveux de sangsue contient 933 nucléotides encodant une protéine de 289 acides aminés (figure 39). L'analyse menée via le logiciel BLAST-P montre que la séguence protéique déduite de la séquence ARNm possède des homologies, comprises entre 47 et 55%, avec des protéines de type gC1qR (alias C1qBP) identifiées chez d'autres modèles (tableau 5). De plus, le logiciel n'a détecté que des protéines C1qBP et ce, quelque soit le degré d'homologies. Par conséquent, la molécule de sangsue a été nommée HmC1gBP (Genbank JN207836). La masse moléculaire théorique a été estimée à 32973 Da. De façon similaire aux récepteurs C1qBP caractérisés chez les mammifères, la protéine HmC1qBP possède un domaine conservé MAM33 (figure 39). HmC1qBP contient également une forme mature comme cela a été décrit pour le gC1gR humain [251]. Par ailleurs, le logiciel TMHMM Server V.2.0 n'a pas détecté l'existence d'un domaine transmembranaire. En outre, les alignements multiples, réalisés entre les séquences protéigues d'HmC1gBP, du gC1gR humain et de la souris (figure 40) mettent en relief les similitudes mais aussi les divergences qui existent entre ces protéines. En effet, de manière intéressante, sept des neuf résidus essentiels à la conformation et à l'interaction ligand-récepteur du gC1qR humain (Glu-89, Arg-122, Lys-123, Leu-231, Asp-232, Arg-246, Gly-247, Glu-264 et Tyr-268) sont conservés dans la séquence d'HmC1qBP (Glu-104, Arg-136, Asp-240, Arg-254, Gly-255, Glu-272 et Tyr-276) (figures 39 et 40) [258]. Seuls les résidus Lys-123 et Leu-231 présents dans la séquence protéique du gC1gR humain ne sont pas conservés dans la séquence d'HmC1gBP (figure 40).
1	atgcattctttgcactttaaaagtgagagctttccgtgttcgaggttattcctcgcagtttctcgtgttgta																								
	м	н	s	L	н	F	к	s	Е	s	F	Р	С	s	R	L	F	L	Α	v	s	R	v	v	24
73	cgt	tca	gag	cta	gtc	tat	cgt	cac	tta	ttc	tca	aac	atg	tct	aga	ttt	ctg	atc	aga	tca	gct	gca	aat	aac	
	R	s	Е	L	v	Y	R	н	L	F	s	N	м	s	R	F	L	I	R	s	Α	A	N	N	48
145	ctte	ggc	aag	cta	ttc	agg	aga	gga	gga	agt	gtt	tca	ttg	aaa	tca	gaa	ggc	tgt	ctc	gga	gca	gcg	tgt	gaa	
	L	G	к	L	F	R	R	G	G	s	v	s	L	к	s	Е	G	С	L	G	A	A	С	Е	72
217	aat	ttg	atg	aga	tgc	acc	tcg	tcc	atg	acg	caa	cct	ctc	agc	aga	aaa	ttt	tca	aca	aaa	gtt	gag	aag	gac	
	N	L	м	R	č	т	ຣ	s	м	т	Q	Р	L	s	R	к	F	s	т	к	v	E	ĸ	D	96
289	ctc	gcc	aaa	ttc	ttg	gat	gag	gaa	atg	aag	aat	gag	gag	gag	ttg	gtg	gac	gat	gtt	cca	caa	aaa	atc	gga	
	L	Α	к	F	L	D	Е	10	М	к	N	Е	Е	Е	L	v	D	D	v	Р	Q	к	I	G	120
361	gaa	tac	aaa	gtt	caa	aat	ctc	aac	gac	gcc	aat	cca	gaa	ttg	acc	aga	acg	ttt	cgc	aat	gaa	gta	ata	act	
	E	Y	к	v	Q	N	L	N	D	Α	N	Р	Е	L	т	R	т	F	R	N	Е	v	I	т	144
433	433 gtcagtatcaacatcaatggaagtcttgtcacagagggacaaatggaaggtgagcaaaatcaagaggaagcc																								
	v	S	I	N	I	N	G	S	L	v	Т	Е	G	Q	М	Е	G	Е	Q	N	Q	Е	Е	A	168
505	aate	gag	gag	gaa	caa	ggc	gac	ttg	gtc	tcc	aag	cct	acc	ttc	acc	gtt	gag	atc	aac	aaa	gga	gca	gac	aga	
	N	Е	Е	Е	Q	G	D	L	v	S	K	Р	т	F	т	v	Е	I	N	K	G	A	D	R	192
577	aac	ctt	ttc	att	gag	atg	act	tac	ctc	ggg	ggc	gat	gac	att	aca	ccc	gaa	gga	agg	act	tac	gac	atc	caa	
	N	L	F	I	Е	М	т	Y	L	G	G	D	D	I	Т	Р	Е	G	R	т	Y	D	I	Q	216
649	atg	ttt	gcc	ttg	gtg	aag	aac	ggt	gaa	cgc	ctc	aca	gcc	aac	gac	tac	ttg	tgc	gat	gtt	gac	gtt	atg	gat	
	м	F	Α	L	v	к	N	G	Е	R	L	т	A	N	D	Y	L	С	D	v	D	v	М	D	240
721	gaga	aat	ctg	tat	gga	tac	ctg	atg	gaa	atg	ctg	gaa	gag	aga	ggc	atc	gat	caa	aaa	ttc	gtt	gag	gag	ctg	
	E	N	L	Y	G	Y	L	М	Е	М	L	Е	Е	R	G	I	D	Q	к	F	v	Е	Е	L	264
793	cage	gag	tgg	tcg	acc	aat	tac	Gag	aag	age	aag	tac	atc	caa	gtc	cta	aag	gac	ctg	cgt	agt	ttt	gtc	tct	
	Q	Е	W	S	т	N	Y	Б	к	S	к	Y	I	Q	v	L	K	D	L	R	S	F	v	s	288
865	cat	taa	atg	cga	ctg	gac	tga	gaa	tta	tct	gtt	tga	agt	gtt	tga	taa	taa	agg	aat	ggc	taa	tta	at		
	H																								289

Figure 39 : Caractérisation d'une protéine homologue au gC1qR (C1qBP) humain, *Hm*C1qBP. Séquences nucléotidiques et protéiques numérotées respectivement à gauche et à droite. La région surlignée en gris correspond au domaine conservé MAM33 (Leu-101 à Val-287). Les résidus surlignés en noir correspondent aux acides aminés considérés comme essentiels à la conformation de la protéine et à l'interaction ligand-récepteur chez l'Homme et chez le modèle murin.

Accession number	Protein ID	Species	Homology
XP_002400595.1	glycoprotein gC1qBP, putative	Ixodes scapularis	55%
		(Tique)	
NP_001017858.1	complement component 1, q	Danio rerio	52%
	subcomponent binding protein	(Poisson zèbre)	
ACO07818.1	Complement component 1Q	Oncorhynchus mykiss	52%
	subcomponent-binding protein	(Truite)	
ACI67786.1	Complement component 1Q	Salmo salar	52%
	subcomponent-binding protein	(Saumon)	
NP_031599.2	complement component 1Q	Mus musculus	47%
	subcomponent-binding protein	(Souris)	
NP_062132.2	complement component 1, q	Rattus norvegicus	47%
	subcomponent binding protein	(Rat)	

Tableau 5 : Pourcentages d'homologie entre *Hm*C1qBP et les molécules répertoriées dans les banques de données (tableau obtenu via le logiciel BLAST-P, NCBI). Les homologies sont comprises entre 47 et 55%.

	1 80
Human	MLPLLR <mark>C</mark> VPRV L GSSVAGLRAAAPASPFRQLLQPAP <mark>R</mark> LCTRPF <mark>GLL</mark> SV <mark>RAGSERRPGLL</mark> RPRGPCACG <mark>C</mark> GCG
Mouse	MLPLLR <mark>C</mark> VPRS <mark>L</mark> GAA-SGLRTAIPAQPLRHLLQPAP <mark>R</mark> PCLRPF <mark>GLL</mark> SV <mark>RAGS</mark> ARRSGLLQPPVPCACG <mark>C</mark> G
Leech	MHSLHFKSESFPCSRLFLAVSRVVRSELVYRHLFSNMSRFLIRSAANNLGKLFRRGGSVSLKSEGCLGAACENLMRCTSS
	81 160
Human	SLHTDGDKAFVDFLSDEIKEERKIQKHKTLPKMSGGWELE-LNGTEAKLVRKVAGEKITVTFNINNSIPPTFD
Mouse	ALHTEGDKAFVEFLTDEIKEEKKIQKHKSLPKMSGDWELE-VNGTEAKLLRKVAGEKITVTFNINNSIPPTFD
Leech	MTQPLSRKFSTKVEKDLAKFLDEEMKNEEELVDDVPQKIGEYKVQNLNDANPELTRTFRNEVITVSININGSLVTEGQ
	161 240
Human	GEEEPSQGQKVEEQEPELTSTPNFVVEVIKNDDGKKALVLDCHYPEDEVGQEDEAESDIFSIREVSFQSTGESEWKDTNY
Mouse	GEEEPSQGQKAEEQEPERTSTPNFVVEVTKTD-GKKTLVLDCHYPEDEIGHEDEAESDIFSIKEVSFQATGDSEWRDTNY
Leech	MEGEQNQEEANEEEQGDLVSKPTFTVEINKGADRNLFIEMTYLGGDDITPEGRTYDIQMFALVKNGE-RLTANDY
	241 298
Human	TLNTDSLDWALYDHLMDFLADRGVDNTFADELVELSTALEHQEYITFLEDLKSFVKSQ
Mouse	TLNTDSLDWALYDHLMDFLADRGVDNTFADELVELSTALEHQEYITFLEDLKSFVKNQ
Leech	LCDVDVMDENLYGYLMEMLEERGIDQKFVEELQEWSTNYEKSKYIQVLKDLRSFVSH

Figure 40 : Alignement multiple montrant les motifs communs avec les séquences homologues. Les degrés de conservation (moyen et haut), entre le gC1qR humain (NP_001203), le C1qBP de la souris (NP_031599) et HmC1qBP (Genbank accession number JN207836), sont représentés en rouge. Les astérisques et les barres indiquent l'emplacement de 9 résidus particulièrement importants (résidus surlignés en noirs dans la figure 39).

b. Caractérisation d'HmcC1qR

La séquence ARNm détectée dans les banques d'ADNc de système nerveux de sangsue est constituée de 1311 nucléotides encodant une protéine de 437 acides aminés. Le poids moléculaire de celle-ci est estimé à 50945.76 Da et son point isoélectrique est estimé à 5.49. L'analyse de la séquence protéique par le logiciel BLAST-P a permis de détecter un domaine calréticuline très conservé (figure 41). De plus, la séquence protéique possède de très fortes homologies avec la calréticuline (alias cC1gR) caractérisée chez d'autres modèles vertébrés et invertébrés. En effet, les pourcentages d'homologies sont généralement compris entre 69 et 80% (tableau 6). Par conséquent, la protéine obtenue a été nommée HmcC1qR. L'analyse de la séquence protéique via le logiciel SignalP 4.0 a prédit la présence d'un peptide signal localisé sur les 19 premiers résidus acides aminés. Par ailleurs, le logiciel TMHMM Server V.2.0 ne détecte pas la présence d'un domaine transmembranaire. HmcC1gR possède un domaine riche en proline, localisé au milieu de sa séguence (figure 41). Cette région semble également contenir un ou deux domaine(s) de localisation nucléaire (NLS ou « nuclear localization signal »). L'ensemble des ces données corrélé à la littérature portant sur la structure du cC1qR humain [225, 247], souligne et renforce l'homologie entre HmcC1qR et le cC1qR humain, c'est-à-dire l'absence d'un domaine transmembranaire et l'existence d'un peptide signal, d'un domaine riche en proline contenant probablement au moins un signal de localisation nucléaire. L'homologie prononcée entre ces deux protéines peut être visualisée par l'alignement des séquences d'*Hm*cC1qR, des cC1qR humain et murin (figure 42). En effet, la présence de nombreux résidus en rouge, notamment au niveau du domaine Calréticuline, montre la forte conservation de cette structure au cours de l'évolution.

1	atggggaaggttgcgtttgtagcactttttgctatggtttttgctttggcttgttcggag	20
61	ccgactgtttattttaaagaggagtttgacgatggctggaggagccgttgggtagattcg	20
121	P T V Y F K E E F D D G W R S R W V D S actgccaagggatcagatcaaggcctttttgaagtcaaagctggaaagttttacaacgac	40
1 9 1	TAKGSDQGLFEVKAGKFYND	60
101	L E H D K G L K T T Q D A K F Y G I S A	80
241	aagtttgacaagccctttactaatgatggtaaaacgttggtgatccaattcactgtgaag K F D K P F T N D G K T L V I Q F T V K	100
301	catgaacaagaaattgattgtggtggaggatacgtgaaaatatttccaagtgacttggac	120
361	cagaagcaaatgcatggtgactcaccttactacatcatgtttggtcctgacatatgtggg	120
421	Q K Q M H G D S P Y Y I M F G P D I C G tacagcacaaagaaggttcatgtcatcttcaactacaaagggaagaacctcttgacaaag	140
481	Y S T K K V H V I F N Y K G K N L L T K	160
	K E I R C K D D V L T H L Y T L V I R <u>P</u>	180
541	D N T Y E V K I D N K K E E S G T L E D	200
601	gattgggatttettggageeeaaaaceateaaggateetgaageeaaeetgaagae	220
661	tgggatgaaagagaaaacattgatgatcccaatgacaagaagcctgaagattgggacaag	2.4.0
721	cccgagcacattcctgattctactgccacaaagcctgaggattgggatgatgagatggat	240
781	P E H I P D S T A T K P E D W D D E M D qqaqaqtqqqaaccaccaatqqtaqacaaccctqaatacaaaqqtqaatqqaaqccaaaa	260
8/11	G E W E <u>P</u> P M V D N P E Y K G E W K P K	280
011	$Q I \underline{P} N \underline{P} S Y K G K W V H P E I S N \underline{P} S$	300
901	Y V P D D K L Y K Y T D I G A I G F D L	320
961	tggcaggttaagtctggtacaatctttgacaatgtcttgatcactgatgatgaggcttat	340
1021	gctgagaaagttggtgaagaacatggggcattactaaggttggggaacagaaaatgaaa	0.00
1081	A E K V G E E T W G I T K V <mark>G E Q K M K</mark> gataaggctgatgaagaggaggccaagttgagagaggaagaagccaaaaacaagaagctg	360
1141	D K A D E E E A K L R E E E A K N K K L	380
1001	K K N L N L T K M K K T K T M M K M T G	400
TSAT	aggaggaagaagaggaacattcggacgaccctaaggacaaacatgatcctggagagttat R R K K R N I R T T L R T N M I L E S Y	420
1261	aggaagatgatgattcaaaacttgtacaatatttgtaatttcaggttcatg R K M M I Q N L Y N I C N F R F M	437
	-	
1		437
	Calreticulin	

Figure 41 : Caractérisation d'une protéine homologue au cC1qR humain, *Hm*cC1qR. Séquences nucléotidiques et protéiques numérotées respectivement à gauche et à droite. La région surlignée en gris correspond au domaine conservé Calréticuline (Val-23 à Ile-335) obtenu via le logiciel BLAST-P (NCBI). Ce domaine est également représenté par l'encadré rouge du schéma. Les deux séquences surlignées en gris foncés représentent deux sites potentiels NLS (Nuclear Localization Signal) obtenus via le logiciel « cNLS Mapper ».

Accession number	Protein ID	Species	Homology
ABI74618.1	calreticulin	Eisenia fetida	80%
		(Ver du fumier)	
NP_001191523.1	calreticulin precursor	Aplysia californica	75%
		(Lièvre de mer)	
NP_004334.1	calreticulin precursor	Homo sapiens	72%
		(Homme)	
NP_031617.1	calreticulin precursor	Mus musculus	72%
		(Souris)	
AFE66085.1	calreticulin precursor	Macaca mulatta	71%
		(Macaque)	
AAS49610.1	calreticulin	Galus galus	69%
		(Poule)	

Tableau 6 : Pourcentages d'homologie entre *Hm*cC1qR et les molécules répertoriées dans les banques de données (tableau obtenu via le logiciel BLAST-P, NCBI). Très fortes homologies, entre 69 et 80%, en lien avec la présence d'un domaine Calréticuline conservé. *Hm*cC1qR possède 72% d'homologie avec la molécule humaine.



Figure 42 : Alignement multiple montrant les motifs communs avec les séquences homologues. Les degrés de conservation hauts et moyens entre *Hm*cC1qR, le cC1qR humain (NP_004334.1) et le cC1qR de la souris (AAH03453) sont représentés respectivement en rouge et en bleu.

L'ensemble des résultats montre que les anticorps anti-gC1qR et anti-cC1qR humains inhibent significativement le recrutement des cellules microgliales induit par r*Hm*C1q. Il est donc fort probable que les récepteurs homologues aux gC1qR et cC1qR humains soient présents dans la microglie de sangsue.

3. Localisation d'HmC1qBP et d'HmcC1qR

a. <u>Production et localisation d'HmC1qBP</u>

Dans un premier temps, afin de préciser les cellules exprimant le gène hm*c1qbp* dans le système nerveux central de la sangsue, une expérience d'hybridation *in situ* a été effectuée sur des chaînes nerveuses lésées (figure 43), immédiatement après leur dissection (T0h). Les transcrits ont été principalement détectés dans les cellules microgliales localisées dans les ganglions (A). Le signal observé est spécifique puisque cette même expérience réalisée dans les mêmes conditions avec la ribosonde sens contrôle ne présente aucune fluorescence, hormis une auto-fluorescence légère (A').



mRNA localization

Figure 43 : (A) Expérience d'hybridation *in situ* réalisée sur des chaînes nerveuses immédiatement après la dissection (T0h). Localisation des transcrits au niveau de cellules microgliales situées dans un ganglion. (A') L'expérience contrôle a été effectuée dans les mêmes conditions avec la ribosonde sens et ne montre aucun signal significatif.

Ensuite, des expériences d'immunohistochimie ont été effectuées en utilisant l'anticorps polyclonal anti-gC1qR humain (produit chez le lapin) sur des chaînes nerveuses lésées puis fixées, soit immédiatement (T0), soit 6 heures (T6h), soit 24 heures (T24h) après la lésion expérimentale (figure 44). Le noyau des cellules

microgliales étant marqué au Hoechst (en blanc sur les images), il est possible de suivre la migration et l'accumulation de la microglie au niveau du site lésé. Immédiatement après la lésion (T0), aucun signal fluorescent ni aucune accumulation de cellules microgliales ne sont observables au niveau de la lésion (A). Cependant, 6 heures après la lésion, l'immunofluorescence est présente au niveau de la blessure (B) et ce signal peut être corrélé à l'accumulation des cellules microgliales. En effet, l'immunomarquage s'intensifie significativement entre les images prises à T6h et T24h (B et D). Or, le nombre de cellules microgliales recrutées et accumulées au niveau du site lésé augmente également dans ce laps de temps (B et D). Par ailleurs, les connectifs lésés ont été explorés à T6h en employant notamment un plus fort grossissement lors des acquisitions au microscope confocal. Cela a permis de mettre en évidence des cellules microgliales immunomarquées en cours de déplacement vers la lésion (C).



Figure 44 : Analyses immunohistochimiques utilisant l'anticorps polyclonal anti-gC1qR humain, produit chez le lapin. Les observations sont réalisées au microscope confocal immédiatement (A, A'), 6 heures (B, B' et C) et 24 heures (D et D') après la lésion. Le noyau des cellules microgliales est marqué au Hoechst (visualisables en blanc sur les images). (A) Aucun signal C1qBP n'est observé au niveau de la zone de lésion. Ceci est corrélé avec l'absence d'accumulation de cellules microgliales visibles. (B) Six heures après la lésion, les cellules microgliales commencent à s'accumuler sur le site lésé et un marquage fluorescent anti-gC1qR est observable. (C) Toujours 6 heures post-lésion, quelques cellules microgliales sont immunopositives (en vert) parmi une population microgliale globale (marquage nucléaire en blanc). (D) Vingt-quatre heures après la lésion, le nombre de cellules microgliales accumulées à la blessure a augmenté proportionnellement au marquage anti-gC1qR. (A', B' et D') Aucun signal n'est observé en employant l'anticorps secondaire.

De plus, seules quelques-unes de ces cellules microgliales sont immunopositives pour C1qBP à T6h (C), ce qui suggère fortement l'existence d'une sous-population microgliale réactive à *Hm*C1q. Comme l'immunofluorescence augmente progressivement au cours du temps (B et D), il est également possible de supposer la présence de différents états d'activation microgliale. Les contrôles négatifs, réalisés en parallèle et dans les mêmes conditions que les précédentes expériences en employant l'anticorps secondaire seul, ne montrent aucun signal immuno-fluorescent (A', B' et D'). Par conséquent, cette reconnaissance spécifique et dynamique suggère fortement l'implication d'*Hm*C1qBP dans le recrutement des cellules microgliales vers le site de lésion.

En parallèle, plusieurs analyses par cytométrie en flux ont été réalisées afin de confirmer la présence d'HmC1qBP à la surface des cellules microgliales (figure 45). Dans un premier temps, les paramètres correspondant aux cellules microgliales, ayant été incubées dans du L-15, ont été définis (A, graphique de droite). Cela a permis de déterminer la fenêtre de sélection de ces cellules et de mettre en évidence une fluorescence dite de base. Ensuite, les cellules microgliales ont été incubées dans du L-15 puis avec l'anticorps monoclonal anti-gC1gR humain pendant 30 minutes. Dans ces conditions, 46.26% de cellules microgliales sont immunopositives (B, graphique de gauche et de droite - marguage en rouge). L'anticorps reconnaît donc une protéine présente dans des cellules microgliales (A et B, graphiques de droite). La pré-incubation des cellules microgliales dans du L-15 en présence de rHmC1q, avant d'être incubées avec l'anticorps monoclonal anti-gC1qR humain, réduit la population de cellules immunopositives à 5.90% (C, graphiques de gauche et de droite). Le graphique, présenté en figure D, montre clairement la différence dans le nombre de cellules microgliales immunopositives entre les deux conditions testées, c'est-à-dire entre les cellules traitées simplement avec l'anticorps monoclonal anti-gC1gR humain (B) et les cellules pré-incubées avec rHmC1g avant d'être mises en contact avec le même anticorps (C). Ce résultat montre que rHmC1q entre en compétition avec l'anticorps monoclonal anti-gC1qR humain dans la reconnaissance d'*Hm*C1qBP et suggère ainsi que *Hm*C1q soit un ligand naturel de *Hm*C1qBP.



Figure 45 : Analyses des cellules nerveuses de sangsue par cytométrie en flux, en employant l'anticorps anti-gC1qR humain. (A) A droite, le graphique représente la fenêtre de sélection correspondant aux cellules microgliales incubées dans du L-15 sans traitement particulier (selon les paramètres 'FSC-forward scatter' et 'SSC-side scatter' qui permettent d'obtenir respectivement la taille et la structure des cellules). (B) A droite, le graphique représente la même fenêtre de sélection correspondant aux cellules microgliales incubées dans du L-15 puis avec l'anticorps monoclonal anti-gC1qR humain. (C) A droite, le graphique représente la fenêtre de sélection des cellules microgliales incubées dans du L-15 en présence de 8 μ l de surnageant *P. pastoris* contenant r*Hm*C1q, puis incubées avec l'anticorps monoclonal anti-gC1qR humain. (D) Histogramme de cytométrie en flux représentant la différence de fluorescence entre les graphiques B et C.

b. <u>Production et localisation d'HmcC1qR</u>

Comme pour l'étude d'*Hm*C1qBP, dans un premier temps, des expériences d'hybridation *in situ* ont été effectués sur des chaînes nerveuses lésées afin de déterminer les cellules exprimant le gène hm*cc1qr* (figure 46). Les transcrits ont été principalement détectés dans quelques cellules microgliales éparses, localisées dans les connectifs, et ceci 24 heures après la lésion (A). Le signal observé est spécifique puisque cette même expérience réalisée dans les mêmes conditions avec la ribosonde sens ne présente aucune fluorescence (A'). Il est limité à quelques cellules microgliales pourtant visibles dans leur totalité grâce à leur marquage nucléaire (Hoechst). Cela suggère que seules quelques cellules microgliales expriment le gène dans les conditions de l'expérience. Il sera nécessaire de contrôler la distribution de la protéine correspondante afin de vérifier si une sous-population microgliale est à même d'utiliser *Hm*cC1qR.



Figure 46 : (A) Expérience d'hybridation *in situ* réalisée avec la ribosonde antisens sur des chaînes nerveuses 24 heures après leur dissection et leur lésion (T24h). Les transcrits sont localisés au niveau de quelques cellules microgliales (dont une est visible sur l'image, en vert) parmi une population microgliale (visible par marquage nucléaire au Hoechst, en bleu) située dans un connectif. **(A')** Le contrôle négatif utilisant la ribosonde sens dans les mêmes conditions ne présente pas de signal. Seul le marquage nucléaire (Hoechst, en bleu) y est visible.

Aussi, afin de conforter cette hypothèse et localiser la protéine *Hm*cC1qR dans le SNC de la sangsue, des expériences d'immunomarquage ont été réalisées sur des chaînes nerveuses lésées en utilisant l'anticorps polyclonal anti-cC1qR humain, produit chez le lapin (figure 47). Les images prises au microscope confocal montrent un signal immuno-fluorescent ponctiforme, localisé dans certaines cellules microgliales, 24 et 72 heures après la lésion des connectifs (A et B). En effet, le marquage anti-gliarine, utilisé ici comme un marquage microglial général (en rouge), permet de visualiser l'ensemble des cellules microgliales. Notre analyse montre que les cellules microgliales qui présentent un signal immunopositif pour cC1qR (en vert) sont en faible nombre et dispersées au sein du SNC (à la fois dans les ganglions et dans les connectifs), que cela soit 24 ou 72 heures après la lésion. Ainsi, la présence de *Hm*cC1qR semble caractéristique d'une sous-population de cellules microgliales.



Figure 47 : (A) Analyse immunohistochimique sur une chaîne nerveuse de sangsue lésée (T24h) utilisant l'anticorps polyclonal anti-cC1qR humain produit chez le lapin (en vert) et l'anticorps monoclonal anti-*Hm*gliarine produit chez la souris (en rouge). Le noyau des cellules est rendu visible par un marquage avec le Hoechst (bleu). **(A')** L'utilisation des anticorps secondaires seuls (anti-lapin et anti-souris respectivement) ne présente aucun signal immunopositif. Les cellules sont cependant marquées au niveau du noyau (bleu). **(B)** Analyse immunohistochimique sur chaîne nerveuse de sangsue lésée (T72h) utilisant l'anticorps polyclonal anti-cC1qR humain produit chez le lapin (en vert) et l'anticorps monoclonal anti-*Hm*gliarine, produit chez la souris (en rouge). De même, le noyau des cellules est visualisable via un marquage avec le Hoechst (bleu). **(B')** L'utilisation des anticorps secondaires seuls (anti-lapin et anti-souris respectivement) ne présente aucun signal immunopositif. Les cellules est visualisable via un marquage avec le Hoechst (bleu). **(B')** L'utilisation des anticorps secondaires seuls (anti-lapin et anti-souris respectivement) ne présente aucun signal immunopositif. Les cellules est visualisable via un marquage avec le Hoechst (bleu). **(B')** L'utilisation des anticorps secondaires seuls (anti-lapin et anti-souris respectivement) ne présente aucun signal immunopositif. Les cellules sont cependant marquées au niveau du noyau (bleu).

C. <u>Mise en évidence des interactions C1q et HmC1qBP ou</u> <u>HmcC1qR</u>

Afin de mettre en évidence les interactions C1g et HmC1gBP ou HmcC1gR, des expériences de purification des récepteurs par affinité ont été réalisées (figure 48). Le C1g humain biotinylé a été fixé sur une colonne de streptavidine. Ensuite, des extraits de protéines totales de cellules microgliales de sangsue, obtenues après dissection des chaînes nerveuses et dissociations des cellules nerveuses (LMCPE T0h) ont été déposés sur la colonne. Après incubation et rinçage, les protéines interagissant avec le C1q ont été éluées pour être analysées (1 et 1'). Afin de prouver la spécificité de l'interaction C1q-récepteurs, deux expériences contrôles ont été réalisées en parallèle. Le premier témoin permet de déterminer s'il existe une interaction aspécifique entre les récepteurs détectés et la streptavidine (2 et 2'). Le second témoin permet de s'assurer que le C1q biotinylé utilisé n'est pas contaminé par les produits éventuellement immuno-détectés (3 et 3') prouvant ainsi l'origine microgliale des protéines détectées. Après élution, les échantillons ont été analysés par westerns blot en utilisant les anticorps polyclonaux anti-gC1gR (1, 2, 3) et anticC1qR humains (1', 2', 3'). Sur la piste 1, il est possible d'observer une bande spécifique à 33 kDa, la masse attendue de HmC1gBP. Sur la piste 1', une bande spécifique à 50 kDa, poids moléculaire théorique de *Hm*cC1qR, est visualisable. L'absence de signal dans les pistes 2 et 2' montre que ces molécules ne peuvent pas interagir seules avec la streptavidine. L'absence de signal dans les pistes 3 et 3' montre que ces produits ne peuvent avoir qu'une origine microgliale. Aucun signal n'a été détecté sur le Western blot réalisé en n'utilisant que l'anticorps secondaire seul (image non présentée). Ainsi, ces expériences mettent en évidence la spécificité des interactions entre C1q et HmC1qBP, et entre C1q et HmcC1qR.

Une approche expérimentale utilisant la spectrométrie de masse via une stratégie « Bottom Up » a alors été choisie afin de caractériser les molécules contenues dans les complexes moléculaires. Les éluâts contenant les récepteurs ont été séparés par SDS PAGE (figure 49). Une fois colorées, les protéines dont la taille correspond à celles de *Hm*C1qBP et *Hm*cC1qR ont été respectivement excisées (flèches rouges). Après décoloration et digestion trypsique, les deux échantillons ont fait l'objet d'analyses par MALDI-TOF/TOF. Cependant, les spectres obtenus,

quasiment identiques, ont traduit la présence du C1q humain. L'emploi du C1q en grande quantité représente ici un facteur limitant dans les stratégies de caractérisation car il masque la présence d'autres produits dont la quantité reste probablement très faible. C'est pourquoi, pour caractériser *Hm*C1qBP et *Hm*cC1qR, la stratégie de purification par les billes magnétiques et les anticorps semble être la meilleure solution (figure 33). Par ailleurs, le gel SDS PAGE présente également de nombreuses autres protéines, interagissant potentiellement avec le C1q (figure 49). De manière intéressante, ces molécules ne sont pas présentes dans les gels SDS PAGE des éluâts contrôles (résultats non présentés). Ainsi, ces protéines peuvent être soit d'autres interactants de *Hm*C1q, soit des protéines purifiées en même temps que l'un des récepteurs grâce à leur interaction.



Figure 48: Mise en évidence des interactions C1q et *Hm*C1qBP ou C1q et *Hm*C1qR. Dans cette expérience, 100 μ g de C1q humain sont biotinylés (C1q-SS-biotine) puis fixés sur colonne streptavidine via l'interaction biotine/streptavidine. Ensuite, 800 μ g de protéines totales extraites de cellules microgliales de sangsue, (LMCPE T0h), ont été ajoutés. Après une incubation de 12h, les protéines interagissant avec le C1q sont éluées via une solution de β -mercaptoéthanol qui clive les ponts disulfures entre la biotine et le C1q. Une fois précipités, les éluâts sont analysés par western blot en employant les anticorps polyclonaux anti-gC1qR et anti-cC1qR humains. Un signal positif anti-gC1qR est observé à 33 kDa, et un signal positif anti-cC1qR est observé à 50 kDa (Pistes 1 et 1'). Deux contrôles ont été menés. Le premier contrôle consiste à mettre en incubation les LMCPE T0h avec la streptavidine seule pendant 12h (Pistes 2 et 2'). Le second contrôle consiste à n'éluer que le C1q humain biotinylé (Pistes 3 et 3').



Figure 49 : Séparation des protéines de l'éluât colorées à l'argent après migration sur gel SDS PAGE. Les bandes localisées à 33 kDa et à 51 kDa (masses attendues des récepteurs *Hm*C1qBP et *Hm*cC1qR respectivement) ont été excisées afin d'être analysées par spectrométrie de masse, par une stratégie « Bottom Up ».

En conclusion, l'ensemble des résultats obtenus montre à l'évidence l'existence de deux récepteurs pour *Hm*C1q à la surface des cellules microgliales de sangsue, *Hm*C1qBP et *Hm*cC1qR. Ces deux récepteurs sont impliqués dans le recrutement des cellules microgliales médié par *Hm*C1q *in vitro*. Il est très probable que ces mécanismes puissent exister dans le recrutement microglial déclenché à la suite d'une lésion du système nerveux de la sangsue. Des expériences de migration microgliale basées sur notre modèle de chaines nerveuses lésées *ex vivo* (figure 36) aideront à préciser de tels mécanismes.

DISCUSSION

Le terme « activation microgliale » inclut la prolifération et le recrutement de la microglie vers le(s) site(s) endommagé(s) ou menacé(s), le développement de leur activité phagocytaire et la production de protéines pro- et anti-inflammatoires [9, 10, 16, 24]. Sans être morphologiquement différentes les unes des autres, chaque sous-population microgliale, ayant des origines différentes ou une localisation particulière dans le SNC, aurait donc une fonction spécifique dans la réponse immunitaire, ce qui complique l'étude des pathologies du système nerveux central chez les vertébrés. Par conséquent, l'infiltration de cellules immunitaires périphérique au sein du SNC peut être soit bénéfique soit délétère. Cela dépend essentiellement du degré d'activation des cellules microgliales, du type de cellules immunitaires recrutées et du contexte neuro-inflammatoire.

Les cellules microgliales de la sangsue possèdent de nombreuses caractéristiques communes avec la microglie des vertébrés. Avant une morphologie stellaire en conditions physiologiques, les cellules microgliales de sangsue deviennent amiboïdes, mobiles et développent une activité de phagocytose lorsqu'elles sont alertées [259-263]. La sangsue présente la capacité de régénérer efficacement son système nerveux central à la suite d'une lésion. Les premiers travaux ont essentiellement porté sur les phénomènes de repousse axonale et de reconnexion synaptique [32, 37, 38, 41]. Les chercheurs ont porté leur attention sur le rôle de la microglie dans le phénomène de réparation nerveuse. En effet, contrairement aux mammifères, le recrutement de la microglie au niveau de la lésion induit la réparation du système nerveux [8, 47, 107]. D'ailleurs, de récents travaux ont démontré que ce phénomène est essentiel à la restauration des axones et des fonctions neuronales [8, 47, 263]. De plus, malgré la localisation de sa chaine nerveuse dans le sinus sanguin ventral, il ne semble y avoir qu'une infiltration limitée de cellules sanguines dans son SNC [48]. Cette particularité représente un avantage significatif comparé à la complexité structurale du SNC des vertébrés chez qui l'appareil vasculaire est particulièrement ramifié à l'intérieur du tissu. Aussi, du fait de son organisation anatomique, la chaîne nerveuse de la sangsue H. medicinalis est un tissu accessible et facile à prélever sans le sinus sanguin ventral. Cette possibilité de distinguer les deux tissus permet de s'affranchir des cellules sanguines et d'étudier plus spécifiquement l'activation et le recrutement des cellules microgliales résidentes dans diverses conditions expérimentales in vitro et ex vivo. Afin de comprendre les mécanismes moléculaires intervenant dans le recrutement de la microglie de sangsue, les premiers tests de chimiotactisme, réalisés au sein du laboratoire, ont permis de montrer l'activité chimioattractante du milieu ayant incubé des chaînes nerveuses de sangsue lésées pendant 24h (MC24h ou milieu conditionné 24h) (figure 11). Suite à l'analyse de ce milieu, plusieurs facteurs chimioattractants ont été détectés dont deux cytokines homologues à l'IL-16 et au C1q humains. Par conséquent, ces protéines ont été nommées *Hm*IL-16 [5] (figure 13) et *Hm*C1q [1] (figure 19).

Les travaux de thèse ont permis de :

- (1) caractériser et étudier la structure de la pro-*Hm*IL-16. Ainsi, les analogies et les différences entre les précurseurs de la cytokine humaine et le précurseur d'*Hm*IL-16 ont été mises en relief.
- (2) mettre en évidence un récepteur potentiellement analogue au CD4 humain à la surface des cellules microgliales de sangsue. Ce récepteur semble être impliqué dans le recrutement de la microglie de sangsue médié par la cytokine humaine ou par *Hm*IL-16 et les mêmes mécanismes de reconnaissance semblent être impliqués.
- (3) étudier la capacité chimioattractante de *Hm*C1q et caractériser deux de ses récepteurs, *Hm*C1qBP et *Hm*cC1qR à la surface des cellules microgliales de sangsue.

L'ensemble des résultats est discuté ci-dessous et différentes perspectives de travail sont avancées.

I. <u>Caractérisation et étude de la pro-HmIL-16</u>

Chez les vertébrés, du fait de son activité chimioattractante, l'interleukine-16 (IL-16) est une cytokine potentiellement impliquée dans le recrutement des cellules microgliales et des cellules immunitaires au sein du parenchyme cérébral [6, 211, 214, 215]. La forme active de l'IL-16, c'est-à-dire la cytokine, est attribuée à l'extrémité C-terminale de deux protéines précurseurs : la prolL-16 de 67 kDa, synthétisée par les cellules hématopoïétiques [264-268] ainsi que par les cellules microgliales [269-274], et la nprolL-16 (ou NIL-16) de 140 kDa, produite par les

neurones [6, 201, 202]. L'action de la caspase 3 permet la maturation par clivage enzymatique des précurseurs [190]. Cela entraîne la formation de deux sousproduits qui sont les prodomaines (ou extrémités N-terminales) et la cytokine (ou extrémité C-terminale ou forme active de l'IL-16) [275-278]. L'extrémité C-terminale des deux précurseurs est strictement identique et contient un domaine PDZ très conservé impliqué dans la conformation et la multimérisation de la cytokine [212, 279, 280]. Une fois sécrétée dans le milieu extracellulaire, la forme active de l'IL-16 se multimérise afin d'exercer une activité chimioattractante optimale sur ces cellules cibles [189, 211].

Dans le système immunitaire périphérique, l'étude de la fonction biologique de l'IL-16 active a permis d'identifier le ligand naturel de la molécule, le récepteur CD4. Ce récepteur est une glycoprotéine transmembranaire d'environ 55 kDa composée de quatre domaines immunoglobulines numérotées de D1 à D4. La cytokine se lie sur le domaine D4 du CD4 via la séquence peptidique «106RRKSLQKETTAAGDS120» située à l'extrémité C-terminale de son domaine PDZ [6, 194, 195, 204]. Néanmoins, le récepteur de la cytokine dans le système nerveux n'est pas encore clairement identifié. La npro-IL-16 (ou NIL-16) semble être plus particulièrement produite dans les neurones du cérébellum et de l'hippocampe, après la neurogenèse et dans des cerveaux adultes [201]. Des études suggèrent l'existence d'autres types de récepteurs pour l'IL-16 humaine. En effet, la cytokine a également été détectée dans des cerveaux de fœtus humains à des stades de développement précoces. Or aux stades précoces de neurogenèse, aucune expression de CD4 n'a été mise en évidence [281], ce qui suggère l'existence d'un ou de plusieurs autres récepteurs à la surface des cellules microgliales et progénitrices.

Concernant la production d'IL-16 dans le système nerveux, une accumulation de cellules microgliales positives en IL-16 a été observée dans les régions cérébrales au stade embryonnaire et le taux de la cytokine semble être corrélé au nombre de cellules progénitrices infiltrantes. Ces cellules sont à l'origine des cellules microgliales résidentes dans le système nerveux adulte [27, 28, 75, 76].

A l'état adulte, l'IL-16 semble être impliquée dans les maladies neurodégénératives comme la sclérose en plaque. La production de la cytokine est renforcée dans le cerveau des patients atteints [212] et elle semble jouer un rôle dans la régulation de l'inflammation au sein des axones endommagés [213, 282]. De plus, le taux d'IL-16 est élevé dans les systèmes nerveux des souris atteintes d'encéphalite autoimmune expérimentale (EAE). Ce taux élevé est corrélé au taux de lymphocytes T CD4+ infiltrants [215]. La forme active de l'IL-16 semble être ici en partie d'origine lymphocytaire et microgliale [216, 217]. La cytokine est aussi connue pour agir de manière autocrine/paracrine [218, 219]. Dans ce contexte, de nombreuses questions restent à élucider. L'IL-16 est-elle synthétisée de prime abord par les cellules microgliales activées ou l'est-elle par les cellules immunitaires infiltrées ? La cytokine est-elle libérée par les neurones endommagés afin de recruter les cellules microgliales ? Si oui, quel est ou quels sont les récepteurs microgliaux ? Quelle est l'importance de la cytokine dans l'activation des cellules microgliales ?

Grâce aux travaux précédemment menés au sein du laboratoire, une molécule homologue à l'IL-16 humaine a été identifiée et nommée HmIL-16. La séquence partielle de cette protéine contient un domaine PDZ fortement conservé présentant de nombreux motifs analogues au domaine PDZ présent dans la séguence de la cytokine humaine (figure 13). En effet, comme l'IL-16 mammalienne, HmIL-16 contient le motif GVGF et le résidu tryptophane (W) connus pour être indispensables à la conformation de la cytokine humaine. De même, le résidu Arg107 (R107), essentiel à l'activité chimioattractante de la cytokine humaine, est conservé dans la molécule de sangsue et, de manière générale, le pourcentage d'homologie entre les deux cytokines a été estimé à 62% (figures 13, 24 et 25). Ces données sont importantes car elles corroborent l'analogie fonctionnelle particulièrement précédemment mise en évidence entre HmlL-16 et l'IL-16 humaine [5]. De plus, l'homologie entre ces deux molécules permet la détection d'HmlL-16, dans le milieu conditionné par l'incubation de systèmes nerveux lésés pendant 24h (MC24h), soit par l'anticorps polyclonal anti-HmIL-16, soit par l'anticorps anti-IL-16 humaine, de façon spécifique (figure 26). Comme la cytokine humaine, HmlL-16 serait synthétisée dans le corps cellulaire des neurones et dans les cellules microgliales activées (figures 15 et 16). HmlL-16 est d'ailleurs libérée dans le milieu extracellulaire dans la zone des extrémités axonales lésées (figure 15). Cependant, comment HmlL-16 estelle synthétisée ? Existe-t-il un ou plusieurs précurseurs de la cytokine ? Comment la cytokine exerce-t-elle son activité chimioattractante ? Quel est le récepteur microglial d'*Hm*IL-16?

A. Analyse de la pro-HmIL-16 et de HmIL-16

L'analyse du génome de la sangsue nous apprend qu'une seule séquence génomique contient la séquence nucléotidique connue dans les banques EST correspondant à l'ARNm de la pro-HmIL-16. Cet ARNm a d'ailleurs été caractérisé (figure 24). La séquence en acides aminés qui en a été déduite présente une masse moléculaire de 87 kDa et a été nommée pro-HmlL-16. Du fait de son poids moléculaire (87 kDa), les deux signaux observés sur les westerns blot du MC24h correspondent à des produits de taille comparable (figure 26). Cependant, ce précurseur ne possède pas de peptide signal lui permettant d'être sécrété. De plus, la pro-HmlL-16 contient trois motifs « D-S » (D594-S595, D608-S609, D623-S624) (figure 24, surlignés en bleu). La caspase 3 clive les formes humaines de la pro-IL-16 et de la NIL-16 entre un acide aspartique (D510) et une sérine (S511) [278, 283] (figure 25). La forme active et sécrétée de l'IL-16 humaine correspond donc à l'extrémité Cterminale du précurseur une fois coupé par la caspase. Chez la sangsue, les motifs « D-S » présents dans la séquence protéique de la pro-HmIL-16 représentent autant de sites de clivage enzymatique potentiels. De plus, l'analyse de la banque EST de SNC de sangsue a permis l'identification de plusieurs protéines apparentées à des caspases. Il est possible que la pro-HmlL-16 subisse une maturation enzymatique due à une protéine de type caspase, ce qui permet de libérer la forme active HmlL-16 dans le milieu extracellulaire. Comme la cytokine de sangsue et la cytokine humaine possèdent toutes deux un domaine PDZ fortement homologue, domaine impliqué dans la conformation des molécules, il est probable qu'HmlL-16 se multimérise également après avoir été sécrétée. Par conséquent, les molécules visualisées à environ 90 kDa sur les westerns blot (figure 26) pourraient correspondre à une forme HmlL-16 multimérique. D'ailleurs, l'analyse par western blot des produits issus de la dernière co-immunoprécipitation montre la présence de deux signaux, à 80 kDa et à 60 kDa, détectés spécifiquement par l'anticorps polyclonal anti-IL-16 humaine (figure 33). Ces deux produits sont non seulement reconnus spécifiquement mais semblent également interagir avec le même récepteur. Ces données renforcent l'hypothèse d'une maturation par clivage enzymatique de la pro-HmlL-16 suivie d'une libération dans le milieu extracellulaire de la forme active HmlL-16 autoagrégée.

Afin de déterminer le(s) processus de maturation de la pro-*Hm*IL-16, la séquence en acides aminés contenant les trois motifs « D-S » a été sélectionnée afin de produire la protéine recombinante r*Hm*IL-16 (figure 24, régions surlignées en bleu et rose). Cette séquence a été clonée dans le vecteur pET-16b pour y être produite au sein de la bactérie *Escherichia coli* (*E. coli*). Cette production est en cours de réalisation. La purification de la cytokine recombinante permettra d'approfondir l'étude de *Hm*IL-16. Par exemple, différentes caspases commerciales, dont la caspase 3 humaine recombinante, seront utilisées pour étudier leurs effets enzymatiques sur la molécule recombinante de *Hm*IL-16. Cela permettra non seulement de préciser le site de coupure mais aussi de déterminer les modalités de multimérisation de la forme active. En outre, il sera aussi important d'évaluer la capacité chimioattractante des différentes formes de *Hm*IL-16 éventuellement obtenues sur les cellules microgliales de sangsue.

Dans l'état actuel de nos connaissances, une seule protéine précurseur a été identifiée, la pro-HmlL-16. Or, son extrémité N-terminale ne possède aucune homologie avec les prodomaines de la pro-IL-16 et de la npro-IL-16 humaines. En effet, contrairement aux molécules mammaliennes, la pro-HmlL-16 ne contient aucun domaine PDZ supplémentaire, ni aucun autre domaine conservé, au niveau de son extrémité N-terminale (figures 24 et 25). Par conséquent, il semble que la partie Nterminale de la pro-HmIL-16 soit une séquence singulière. Nous comptons donc produire un anticorps spécifiquement dirigé contre cette extrémité. Employés dans un western blot réalisé sur le milieu conditionné, milieu avant incubé des chaînes nerveuses lésées pendant 24h (MC24h), cet anticorps nous donnera un élément de réponse en ce qui concerne la libération de la pro-HmIL-16 dans le MC24h ou celle d'une forme autoagrégée de HmlL-16. En effet, comparé aux signaux présentés en figure 26, l'absence d'un signal identique sur le western blot réalisé avec l'anticorps dirigé contre l'extrémité N-terminale nous permettra de supposer la présence d'un multimère de HmlL-16 dans le MC24h. Dans le cas contraire, il sera possible de suggérer la présence de la pro-*Hm*IL-16 dans le MC24h.

De plus, bien que les mécanismes de maturation restent à définir, nous savons que la cytokine de sangsue est produite dans le corps cellulaire des neurones et des cellules microgliales activées [5] (figures 15 et 16). Or, chez les vertébrés, les parties N-terminales de la pro-IL-16 et de la npro-IL-16 possèdent des

fonctions biologiques similaires ou différentes du fait de leurs structures respectives [201, 205, 284]. Par conséquent, l'anticorps spécifiquement dirigé contre l'extrémité N-terminale de la pro-*Hm*IL-16, employé dans différentes expériences d'immunohistochimie sur cellules dissociées ou sur chaîne entière, permettra de détecter les lieux de maturation de *Hm*IL-16 au sein du système nerveux, de localiser le prodomaine et de débuter l'étude de sa fonction biologique.

Par ailleurs, la détection de *Hm*lL-16, présentée sur la figure 26 dans les résultats, n'a eu lieu que dans le milieu ayant incubé huit chaînes nerveuses lésées de sangsue pendant 24h (MC24h). Néanmoins, il est possible que la molécule soit libérée dans le milieu extracellulaire à partir des extrémités axonales lésées juste après la section du connectif [5] (figure 15). *Hm*lL-16 peut donc être présente dans le MC6h mais en trop faible quantité pour être détectée par western blot. L'absence de signal dans le MC72h peut signifier l'internalisation de la cytokine par les cellules microgliales. Migrant selon un gradient de *Hm*lL-16, elles doivent probablement internaliser la molécule pour ensuite la dégrader.

Une étude antérieure a montré que certaines cellules microgliales accumulées au site de lésion peuvent produire *Hm*IL-16 [5] (figure 16). Les résultats présentés ici ne suggèrent aucune libération significative de *Hm*IL-16 dans le milieu conditionné 72h. Il serait donc intéressant d'évaluer le niveau d'expression du gène au cours du temps, par Q-PCR ou par des expériences d'hybridation *in situ*, de la lésion immédiate et selon des intervalles de temps réguliers jusqu'à la réparation complète du SNC de la sangsue.

B. <u>Activité chimioattractante de HmIL-16 sur les cellules</u> <u>microgliales de sangsue</u>

Les résultats, obtenus en employant le peptide de synthèse «RRKSLQKETTAAGDS» dans des tests de chimiotactisme sur la microglie de sangsue (figure 27), renforcent l'analogie fonctionnelle entre *Hm*IL-16 et l'IL-16 humaine. En effet, le peptide de synthèse correspond à l'extrémité C-terminale (Arg₁₀₆-Ser₁₂₁) de l'IL-16 humaine. Cette région est impliquée dans la liaison de la cytokine sur son récepteur sans pour autant suffire à déclencher l'activation cellulaire [6, 194, 204]. De précédentes analyses ont démontré que ce peptide de synthèse est

un inhibiteur compétitif de la forme active de l'IL-16 humaine dans le recrutement des cellules cibles humaines [195, 204]. En outre, de précédentes expériences faites au laboratoire ont démontré que HmlL-16 exerce une activité chimioattractante sur les lymphocytes T CD4+ humains de façon analogue à l'IL-16 humaine (figure 17). La pré-incubation de ces cellules CD4+ humaines avec les anticorps anti-HmlL-16 ou anti-IL-16 humaine permet de réduire significativement leur recrutement médié soit par le milieu conditionné de sangsue (MC), soit par la cytokine humaine. De plus, en présence du peptide de synthèse « RRKSLQKETTAAGDS », le recrutement des lymphocytes T CD4+ humains induit par le milieu conditionné de sangsue est fortement inhibé. Dans notre étude, nous confirmons que l'effet chimiotactique médié par le milieu conditionné sur les cellules microgliales de sangsue est lui aussi réduit significativement lorsque les cellules sont pré-incubées avec ce peptide de synthèse (figure 27). Par conséquent, le peptide de synthèse est là encore un inhibiteur compétitif de *Hm*IL-16 pour le recrutement de ses cellules cibles. Il interagirait avec le récepteur de HmlL-16 présent à la surface des cellules microgliales de sangsue, empêchant ainsi la fixation de la forme active.

En outre, les études menées sur l'IL-16 humaine ont montré que l'Arg₁₀₇ est indispensable pour l'interaction avec le récepteur CD4 [195, 204]. La séquence de *Hm*IL-16 possède un motif C-terminal « RRKE » (figure 24) qui pourrait être impliqué dans l'interaction de la cytokine de sangsue avec son récepteur. Cela reste bien sûr à démontrer, en utilisant, par exemple, des expériences de mutagenèse dirigée sur la forme recombinante de *Hm*IL-16. En effet, en modifiant la séquence nucléotidique encodant la région « RRKE » de *Hm*IL-16, il est possible de produire des formes recombinantes mutées de *Hm*IL-16. Elles pourront être utilisées dans des expériences *in vitro* afin de mesurer leur activité chimioattractante sur les cellules microgliales de sangsue.

Il est également intéressant d'étudier la conformation de la cytokine afin de comprendre comment *Hm*IL-16 interagit avec son récepteur. Cette étude conformationnelle peut être réalisée par résonance magnétique nucléaire comme cela a été fait pour la cytokine humaine [280]. En effet, le peptide de synthèse interagit avec le récepteur microglial de *Hm*IL-16 mais il n'induit pas le recrutement des cellules microgliales. Par conséquent, l'activité chimioattractante de la cytokine de sangsue est portée par une autre séquence. L'étude de la conformation de la protéine nous permettra probablement de déterminer les sites d'interaction de la

cytokine avec son ou ses interactants, via des logiciels bioinformatiques, après avoir caractérisé ces derniers.

La séquence «106RRKSLQKETTAAGDS120» est impliquée dans la liaison de la cytokine humaine à son récepteur CD4 [255-257, 285]. Nous avons montré que l'IL-16 humaine recrute les cellules microgliales de sangsue de manière dosedépendante. Ces données suggèrent l'implication d'un récepteur apparenté au CD4 humain dans le recrutement de la microglie de sangsue. Cette suggestion est renforcée par l'emploi d'un anticorps anti-CD4 humain dans le test de chimiotactisme (figure 27). En effet, le recrutement des cellules microgliales de sangsue médié par le milieu conditionné est inhibé suite à la pré-incubation des cellules avec l'anticorps monoclonal anti-CD4 humain (figure 27). Il est par conséquent nécessaire de rechercher l'existence d'une telle molécule chez la sangsue.

II. <u>Etude du récepteur de *Hm*IL-16 : un potentiel analogue du CD4</u> <u>humain</u>

A. <u>Une molécule localisée à la surface des cellules microgliales</u> <u>de sangsue</u>

Dans un premier temps, une protéine d'environ 50 kDa, présente dans les protéines totales extraites des SNC de sangsue (PT0h), a été spécifiquement reconnue par l'anticorps polyclonal anti-CD4 humain (figure 28A). De plus, l'anticorps monoclonal anti-CD4 humain marqué au FITC, employé dans l'expérience de cytométrie en flux, aurait reconnu 4,5% de cellules microgliales (figure 28B). Ensuite, les expériences d'immunohistochimie, réalisées avec l'anticorps polyclonal anti-CD4 humain, montrent un marquage spécifique, ponctiforme, au niveau des connectifs et de la zone lésée, immédiatement et 24h après la lésion (figure 29). D'ailleurs, le signal immuno-fluorescent au niveau de la lésion s'intensifie au cours du temps et ce phénomène est corrélé à l'accumulation de la microglie au niveau du site endommagé (figure 29A comparée à la figure 29B ; figure 29B''). Par conséquent, l'ensemble de ces résultats démontre la présence d'une protéine, reconnue par les anticorps anti-CD4 humain, présente à la surface des cellules microgliales de sangsue. Cependant, aucun homologue au CD4 humain n'a été mis en évidence

suite à l'analyse de la banque normalisée d'EST construite à partir d'ARN totaux de système nerveux de sangsues adultes. Ceci peut s'expliquer par une homologie de séquence insuffisante entre le récepteur de *Hm*IL-16 et le CD4 humain, ce qui ne permet pas son identification dans les banques de sangsue. Cependant, si les homologies peuvent être faibles, les analogies de fonction entre les deux molécules sont suffisamment fortes. Par conséquent, certains motifs structuraux, jouant un rôle fondamental dans l'interaction ligand-récepteur et dans l'activation des cellules microgliales, ont pu être conservés.

B. <u>Implication du récepteur de HmIL-16 dans le recrutement de</u> <u>la microglie</u>

Le milieu conditionné 24h (MC24h) et la cytokine humaine recrutent significativement les cellules microgliales de sangsue *in vitro* (figures 30 et 31). La pré-incubation des cellules microgliales de sangsue avec les anticorps anti-CD4 humain réduit significativement leur recrutement induit par le milieu ayant incubé les systèmes nerveux de sangsue pendant 24h (MC24h) ou par l'IL-16 humaine. Par conséquent, l'anticorps polyclonal anti-CD4 humain a reconnu spécifiquement une molécule, présente à la surface des cellules microgliales de sangsue, qui serait impliquée dans l'activité chimiotactique de *Hm*IL-16. Le même effet inhibiteur est observé lorsque l'IL-16 humaine est mise en présence de CD4 soluble, un compétiteur spécifique du CD4 membranaire. Ainsi, le récepteur de *Hm*IL-16, présent à la surface des cellules microgliales de sangsue, est probablement un analogue du CD4 humain.

C. <u>Mise en évidence de l'interaction entre HmIL-16 et ses</u> partenaires.

1. <u>Interaction de *Hm*IL-16 avec un récepteur analogue au CD4</u> <u>humain</u>

L'interaction spécifique de *Hm*IL-16 avec son récepteur a été étudiée en utilisant l'anticorps anti-CD4 humain et l'anticorps anti-*Hm*IL-16 dans deux expériences de co-immunoprécipitation différentes (figures 32 et 33). L'ensemble des résultats soutient la théorie précédemment émise, à savoir, l'existence d'un

récepteur apparenté au CD4 humain à la surface de certaines cellules microgliales de sangsue, récepteur ayant la capacité d'interagir avec l'IL-16 humaine et HmIL-16. Il est donc nécessaire de caractériser ce récepteur. Les stratégies de caractérisation par spectrométrie de masse avant échoué jusqu'à présent, une autre méthode est proposée (figure 50). Cette nouvelle stratégie consiste à immuno-précipiter la molécule apparentée au CD4 à partir d'extraits protéigues de sangsue en utilisant l'anticorps polyclonal anti-CD4 humain. Ensuite, via une stratégie « Bottom Up », les complexes protéiques obtenus seront digérés par la trypsine, séparés par chromatographie liquide puis caractérisés par spectrométrie de masse. Cette méthode présente aussi l'avantage de pallier à un autre inconvénient inhérent à l'étude des récepteurs et de la sangsue, à savoir la faible quantité de matériel disponible. Comme les anticorps anti-CD4 ne peuvent être immobilisés de façon définitive sur les billes magnétiques, deux contrôles sont nécessaires : un premier témoin permettant de caractériser les peptides issus de la digestion trypsique des anticorps, et un second mettant en incubation les billes magnétiques avec les seuls extraits protéiques de SNC de sangsue (PT0h) pour révéler les interactions aspécifiques. Ainsi, les profils peptidiques de ces contrôles seront analysés puis soustraits à l'analyse des complexes.



Figure 50 : Stratégie envisagée pour caractériser la protéine reconnue par les anticorps anti-CD4 humain. Première étape : élution des immunoglobulines anti-CD4. Les peptides issus de la digestion trypsique des immunoglobulines sont séparés par capillaire puis les peptides isolés sont séquencés par nanoLC-Trappe. Une première liste de séquences peptidiques est ainsi obtenue. Seconde étape : l'immunoprécipitation anti-CD4/PT0h est effectuée puis les éluats sont digérés par la trypsine. Les résidus de digestions sont séparés par capillaire puis les peptides sont analysés par nanoLC-Trappe. Une seconde liste de séquences peptidiques est acquise. Troisième étape : les DynaBeads A+ sont incubées avec les PT0h. Après élution, les molécules non-spécifiques sont digérées et le digestat est injecté dans le capillaire. Après séparation, une troisième liste de peptides séquencés est obtenue suite

2. Interaction de HmIL-16 avec ses partenaires

La production de la protéine recombinante, r*Hm*IL-16, peut permettre de purifier les interactants de la cytokine présents dans le SNC de la sangsue. En effet, r*Hm*IL-16 peut être utilisée dans des expériences de purification du ou des récepteur(s) par affinité. La forme recombinante r*Hm*IL-16, produite avec une séquence terminale composée de plusieurs résidus d'histidine (HIS-tagged), peut être fixée à la surface de billes magnétiques recouvertes de nickel. Ensuite, la forme recombinante sera mise en interaction avec des protéines totales, extraites immédiatement après dissection de plusieurs systèmes nerveux de sangsue (PT0h). La molécule r*Hm*IL-16 pourra ainsi interagir avec son ou ses ligands naturels. Après élution, l'ensemble des interactants seront digérés par la trypsine puis analysés par nanoLC-Trappe. De plus, afin de quantifier et visualiser le nombre de ligands de *Hm*IL-16, les éluats peuvent migrer dans un gel SDS-page puis subir une coloration

argentique. L'ensemble des résultats obtenus nous procurera les premiers indices concernant la présence de plusieurs partenaires. Après la caractérisation, des anticorps spécifiquement dirigés contre les différentes structures réceptrices de *Hm*IL-16 pourront être achetés ou produits afin de préciser leur localisation et de valider leur implication fonctionnelle dans l'activité biologique de *Hm*IL-16.

3. Etude de l'activation des cellules microgliales par HmlL-16

Par ailleurs, l'interaction de la cytokine humaine/CD4 entraîne l'activation de la phosphatidylinositol 1-4-5 triphosphate (IP-3). Cela se traduit par un accroissement de la concentration en calcium au niveau intracellulaire et une augmentation de l'expression du CD25 (ou récepteur de l'IL-2) à la surface des lymphocytes T [189, 286]. La liaison de l'IL-16 au CD4 induit également la translocation de la PKC (protéine kinase C) du cytosol à la membrane plasmique. Or, la PKC semble jouer un rôle fondamental dans le déclenchement de la migration des cellules T CD4+ [273, 287, 288]. Plus largement, la cytokine humaine promeut la mobilisation des lymphocytes T CD4+, des monocytes, des éosinophiles et des cellules microgliales [256, 287, 289]. Il semble donc intéressant, chez H. medicinalis, d'utiliser des toxines afin de bloquer l'action de la PKC et de l'IP-3. Bien entendu, l'objectif visé est de débuter, par ce biais, l'étude des voies de signalisation microgliales déclenchant la migration de ces cellules de sangsue, induite par HmlL-16. Pour finir, de concert avec l'IL-2 ou l'IL-15, l'IL-16 induit la prolifération des cellules T CD4+ [286]. La cytokine induit également la synthèse puis la sécrétion d'IL-1β, d'IL-4, d'IL-6, d'IL-15 et de TNF- α par les monocytes [290]. Chez la sangsue, suite à la production et la purification de rHmlL-16, les cellules microgliales dissociées pourront être stimulées par la protéine recombinante afin d'estimer la prolifération éventuelle de ces cellules et analyser leur sécrétome. Cela permettra également de déterminer les facteurs produits par la microglie au cours de leur activation par rHmlL-16.

L'analyse du sécrétome des cellules microgliales activées par un facteur chimioattractant est au cœur de plusieurs questions. En effet, elle peut apporter une signature moléculaire qui sera, ensuite, comparée à celle des cellules humaines. Elle pose également la question du contexte moléculaire qui intervient probablement dans la communication avec les cellules voisines, à savoir les autres cellules microgliales, et surtout les neurones lésés.

D. En conclusion

De manière intéressante, d'autres molécules apparentées à l'IL-16 humaine ont été détectées dans d'autres modèles vertébrés et invertébrés (tableau 7). Cependant, seules les cytokines présentes chez l'homme et la souris ont fait l'objet d'études fonctionnelles. Ainsi, HmlL-16 représente la première molécule apparentée à la cytokine humaine dont l'une des fonctions biologiques a été mise en évidence dans un modèle invertébré. De par son activité chimioattractante sur une souspopulation microgliale, HmIL-16 joue un rôle important dans la mobilisation des cellules microgliales. Le recrutement des cellules microgliales aboutit de façon générale à la réparation du système nerveux central de la sangsue H. medicinalis. L'étude de HmlL-16 et de son ou ses récepteur(s) dans le recrutement des cellules microgliales de sangsue, représente l'unique modèle qui permettra, peut être, de répondre à certaines questions restées en suspens chez les mammifères. En effet, bien que le CD4 ait été identifié comme étant le récepteur naturel de l'IL-16 chez l'Homme, l'existence de structures réceptrices différentes est plus que suggérée. Cependant, ces protéines n'ont pas encore été caractérisées et les études restent controversées.

Description	Nom courant (latin)	Homologie	Type d'étude
ref XP_784502.2 similar to interleukin-16 precursor	Oursin (Strongylocentrotus purpuratus)	67%	Annotation automatique (génome, EST)
ref XP_317940.4 AGAP011384-PA	Moustique (Anopheles gambiae)	65%	Annotation automatique (génome, EST)
emb CAD70074.2 interleukin-16	Truite (Oncorhynchus mykiss)	65%	Annotation automatique (génome, EST)
gb AAC04383.1 interleukin-16 precursor	Souris (Mus musculus)	65%	Analyse fonctionnelle
ref XP_001606112.1 similar to prIL-16	Guêpe (Nasonia vitripennis)	64%	Annotation automatique (génome, EST)
gb AAX36076.3 interleukin 16	Tétraodon (Tetraodon nigroviridis)	64%	Phylogénie moléculaire
gb AAB36371.2 prIL-16	Homme (Homo sapiens)	62%	Analyse fonctionnelle
XM_001901346 interleukin-16 partial mRNA	Nématode filaire (Brugia malayi)	60%	Annotation automatique (génome, EST)
XP_001951758 similar to IL-16, partial mRNA	Puceron (Acyrthosiphon pisum)	60%	Annotation automatique (génome, EST)
ref XP_001121687.1 similar to interleukin 16 precursor	Abeille (Apis mellifera)	58%	Annotation automatique (génome, EST)
gb AAO18640.1 interleukin 16	Poulet (Gallus gallus)	58%	non publié
gb AAM73549.1 AF294320_1 interleukin-16 precursor	Canard (Anas platyrhynchos)	56%	non publié
XM_002157951 similar to interleukin 16, partial mRNA	Hydre (Hydra magnipapillata)	51%	Annotation automatique (génome, EST)

Tableau 7: Pourcentages d'homologie entre l'IL-16 humaine et les molécules répertoriées dans les banques de données (tableau obtenu via le logiciel BLAST-P, sur le site NCBI). De nombreuses cytokines homologues ont été détectées dans d'autres modèles vertébrés et invertébrés grâce à une homologie structurelle importante. Cependant, peu de molécules ont

III. <u>Activité chimioattractante de *Hm*C1q : mise en évidence de</u> <u>ses récepteurs *Hm*C1qBP et *Hm*cC1qR</u>

Chez les vertébrés, le C1q est un facteur du complément possédant diverses fonctions biologiques en lien avec sa structure. Le C1q représente un complexe protéigue de 462 kDa. Chague sous-unité contient un domaine collagène au niveau de son extrémité N-terminale et un domaine globulaire au niveau de son extrémité Cterminale [220, 221] (figure 19). En tant qu'opsonine, le C1q participe à l'élimination des agents pathogènes en promouvant leur phagocytose ou en déclenchant la cascade d'activation du système du complément. D'ailleurs, suite à une lésion ou une infection du SNC, la synthèse du C1q est engagée au sein de la microglie et ce phénomène s'accroît en fonction de leur degré d'activation [111]. Le C1q contribue également au maintien de l'activation des cellules microgliales de manière autocrine/paracrine [111]. La production microgliale de C1q semble d'ailleurs fortement impliquée dans le maintien et la régulation de l'activation des cellules microgliales au cours du développement de maladies neuro-dégénératives [231-233]. Les cellules microgliales, activées par le C1g, se différencient et produisent de l'IL-6, du TNF-α, du monoxyde d'azote (NO) et des radicaux libres [111]. De ce fait, l'activation microgliale induite par le C1g est potentiellement neurotoxique. En se liant à ses récepteurs, comme le C1qRp ou le CR1 constitutivement présents à la surface des cellules microgliales, le C1q stimule l'activité phagocytaire de la microglie ce qui est une protection essentielle mais qui peut également s'avérer délétère. En effet, le taux de C1q dans le liquide cérébrospinal (CSF) est particulièrement élevé chez les patients atteints de sclérose multiple, maladie neurodégénérative associée à la dégradation de la gaine de myéline des neurones. Enfin, le C1q et les molécules du complément semblent être impliqués dans le développement d'autres pathologies du système nerveux comme la maladie de Parkinson et de Creutzfeld Jacob [244], l'ischémie cérébrale ou l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) [245], le modèle permettant d'étudier la genèse et le développement de la sclérose en plaque.

Dans le système périphérique, le C1q interagit avec deux récepteurs via son domaine globulaire et son domaine collagène. De ce fait, ces récepteurs ont été nommés gC1qR (ou C1qBP) pour « globular head C1q binding protein » et cC1qR

(ou calréticuline) pour « collagen C1q binding protéin ». Les g- et c-C1qR, aussi appelés les « C1qR », sont des récepteurs atypiques, ubiquitaires et présents conjointement à la surface de nombreux types cellulaires dont des cellules immunitaires. Bien qu'aucune interaction entre ces deux récepteurs n'ait été mise en évidence, ils semblent jouer de concert un rôle dans le recrutement des cellules immunitaires induit par le C1q. En effet, en se liant aux « C1qR », le C1q agit comme une cytokine pro-inflammatoire, recrutant les cellules dendritiques, les monocytes, les mastocytes et autres cellules immunitaires sur le ou les sites inflammatoires [225, 227-230]. La mobilisation de ces cellules induite par le C1q amplifie grandement la réponse immunitaire sur les sites d'intérêt, démontrant l'importance de ce facteur et de ces deux récepteurs dans les mécanismes inflammatoires et la genèse de pathologies, comme les thromboses [225]. En effet, via le g- et le c-C1qR, le C1q recrute les cellules immunitaires et il active simultanément les thrombocytes ainsi que les cellules endothéliales. En retour, les cellules endothéliales synthétisent des protéines d'adhésion, de l'IL-6, de l'IL-8 et de la MCP-1 (monocytes chemoattractant protein-1) [225]. Ces molécules recrutent, activent et retiennent d'autres cellules immunitaires au niveau de la paroi vasculaire. Ces cellules immunitaires recrutées et activées produiront à leur tour des médiateurs proinflammatoires dont le C1q [225]. Le C1q produit recrutera et activera de nouveau les cellules immunitaires, les thrombocytes et les cellules endothéliales. Par conséquent, le C1q peut déclencher une cascade de stimulation et de mobilisation cellulaire, aboutissant à la formation des thromboses et de maladies vasculaires comme l'athérosclérose [225]. Cependant, la présence du gC1qR et du cC1qR à la surface des cellules microgliales n'a pas encore été démontrée.

Chez la sangsue, une molécule apparentée au C1q humain a été identifiée et a fait l'objet d'études fonctionnelles [1] (figure 19). Ce facteur est constitutivement produit dans le corps cellulaire des neurones (figures 20 et 21) et il est libéré dans le milieu extracellulaire à la suite d'une lésion (figures 21 et 23). De manière intéressante, *Hm*C1q possède un domaine collagène et un domaine globulaire (figure 19). Par ailleurs, le C1q humain recrute également de façon spécifique et dose-dépendante les cellules microgliales de sangsue (figure 22). Deux molécules homologues au gC1qR et au cC1qR humains ayant été caractérisées suite à l'analyse des banques EST de sangsue (figures 39 et 41), l'étude de la fonction chimioattractante de *Hm*C1q a été approfondie. Pour cela, la protéine recombinante r*Hm*c1q a été produite afin de préciser son activité et analyser ses interactants.

A. <u>L'activité chimioattractante de rHmC1q sur les cellules</u> <u>microgliales de sangsue</u>

Le milieu conditionné par l'incubation de chaînes nerveuses lésées de sangsue est un milieu complexe, contenant plusieurs facteurs chimioattractants dont HmIL-16 et HmC1q. C'est pourquoi, dans un premier temps, la protéine recombinante, rHmC1q, a été produite dans un système eucaryote, chez la levure Pichia pastoris. Ce système a été choisi car les molécules recombinantes sont produites en grande quantité et elles peuvent être sécrétées dans le milieu de culture. D'ailleurs, la molécule rHmC1g a été détectée dans le milieu de culture des clones P. pastoris transformés (figure 34). Après centrifugation de ce milieu de culture, le surnageant contenant les molécules sécrétées a été analysé par western blot. Deux signaux à 33 kDa ont été observés sur les westerns blot du milieu conditionné (figure 34, piste « control ») et du surnageant du clone transformé (figure 34, piste « Positive clone »), réalisés en employant l'anticorps polyclonal spécifique anti-HmC1q. Le poids moléculaire de HmC1q étant estimé à 32.6 kDa, ces résultats sont cohérents et la reconnaissance de la forme recombinante par les anticorps anti-*Hm*C1g prouve le succès de sa production. Les milieux de culture contenant r*Hm*C1g ont donc été employés dans des expériences in vitro et ex vivo afin d'évaluer l'impact et le rôle joué par la molécule dans le recrutement des cellules microgliales de sangsue (figures 35 et 36). Les expériences de chimiotactisme montrent le recrutement spécifique et dose-dépendant des cellules microgliales de sangsue par la forme recombinante, avec un optimum observé à la concentration de 8 µl de surnageant P. pastoris pour 50 µl de L-15 (figure 35). Le nombre de cellules recrutées diminue si cet échantillon est utilisé en plus grande quantité (15 µl dilué dans 50 µl de L-15). Cet effet est caractéristique des molécules chimioattractantes et ce recrutement peut d'ailleurs être comparé au recrutement microglial médié par le C1q humain (figure 22A). En effet, la présence excessive de chimioattractant réduit le déplacement des cellules vers le puits d'arrivée car le facteur diffuse jusqu'au puits de départ où se trouvent les cellules. Par ailleurs, l'injection de rHmC1q au niveau de la lésion des connectifs provoque une augmentation significative du recrutement de

la microglie au site lésé (figures 36c et 36e comparés aux images 36b et 36d). Ces résultats corroborent ceux obtenus dans les tests de chimiotactisme et prouvent l'efficacité du recrutement médié par la protéine recombinante. En effet, ce recrutement est bel et bien induit par r*Hm*C1q puisque l'injection de l'anticorps polyclonal anti-*Hm*C1q réduit significativement le nombre de cellules microgliales recrutées (figures 36f et 37).

Afin de comprendre les modalités du recrutement des cellules microgliales de sangsue par *Hm*C1q, une attention particulière a été portée sur l'étude de ses récepteurs.

B. <u>Caractérisation et localisation des récepteurs analogues au</u> C1qBP et cC1qR à la surface de cellules microgliales

1. <u>*Hm*C1qBP</u>

Cette molécule de 33 kDa ne possède pas seulement le même poids moléculaire que le gC1gR, alias C1gBP, humain. Comme la forme humaine, elle contient un domaine MAM33 [291] (figures 39 et 40). HmC1gBP présente également une homologie comprise entre 47% et 55% avec les protéines C1gBP répertoriées dans les banques de données (tableau 5). La comparaison de la séquence protéique de HmC1qBP aux séquences gC1qR humain et murin met en évidence la conservation de sept des neuf résidus impliqués dans la conformation des récepteurs mammaliens ainsi que dans la reconnaissance de leurs ligands [258] (figure 40). De plus, le C1q humain recrute les cellules microgliales de sangsue de manière spécifique et dose-dépendante (figure 22) et interagit avec HmC1gBP comme le montre l'expérience de purification par affinité (figure 48). Les résidus Lys-123 et Leu-231 du gC1gR humain, jugés comme importants pour la conformation du récepteur, ne sont pas présents chez la sangsue puisqu'ils sont remplacés par les acides aminés Thr-137 et Met-239 dans la séquence d'HmC1qBP (figure 40). Cependant, cela ne perturbe visiblement pas l'interaction entre le C1q humain et HmC1qBP (figure 48). Les expériences de cytométrie en flux ont démontré que rHmC1q interagit de façon spécifique avec HmC1qBP (figure 45). Par conséquent, sachant que le facteur humain se lie au gC1qR via son domaine globulaire [251,

292], il est probable que le C1q humain agisse de cette manière avec HmC1qBP (figures 19 et 39). En outre, HmC1qBP possède deux autres caractéristiques similaires au gC1qR humain : l'existence d'une forme précurseur [225] et l'absence de domaine transmembranaire [225, 247]. Par ailleurs, les cellules microgliales expriment le gène hmc1gbp comme le montre l'expérience d'hybridation in situ (figure 43). La protéine a été localisée dans et à la surface des cellules microgliales comme le démontre les expériences de cytométrie en flux et d'immunohistochimie, réalisées avec les anticorps anti-gC1qR humain (figures 44C et 46). De plus, la cinétique, effectuée sur le recrutement des cellules microgliales in vitro au moyen d'un immunomarquage anti-gC1qR humain, montre un signal fluorescent de plus en plus intense au niveau de la lésion entre T0h, T6h et T24h (figure 44A, B et C). Ce signal peut d'ailleurs être corrélé au nombre de cellules microgliales accumulées sur le site endommagé, cellules observables grâce à leur marquage nucléaire. Chez les vertébrés, le gC1gR peut être mobilisé au niveau de la membrane plasmique des cellules immunitaires suite à leurs stimulations par des cytokines proinflammatoires, comme l'INF-y, le TNF- α ou le LPS [4, 225]. Les cellules microgliales de sangsue peuvent-elles augmenter la synthèse de HmC1qBP dans le temps? Il serait intéressant d'évaluer le niveau du gène codant ce récepteur par PCR quantitative dans les cellules microgliales suite à leur stimulation par rHmC1g ou par tout autre facteur d'activation (ATP, NO, HmIL-16...). Si, dans ce cas, les cellules microgliales produisent davantage *Hm*C1gBP, l'hypothèse d'une implication graduelle de *Hm*C1g via sa liaison avec HmC1qBP dans le recrutement microglial chez la sangsue serait alors envisageable.

2. HmcC1qR

*Hm*cC1qR est une protéine d'environ 51 kDa contenant un domaine calréticuline extrêmement conservé (figures 41 et 42 ; tableau 6). De plus, l'analyse de sa séquence protéique a permis de mettre en évidence l'absence d'un domaine transmembranaire. En revanche, comme dans la séquence du cC1qR humain, l'existence d'un peptide signal et d'un domaine riche en proline contenant probablement un signal de localisation nucléaire ont été mis en évidence (figure 41) [225, 247]. Ces données sont importantes car elles soulignent l'homologie entre *Hm*cC1qR et le cC1qR humain [225, 247]. Il serait donc intéressant d'étudier la localisation de *Hm*cC1qR dans les cellules microgliales par microscopie électronique

par exemple. Chez l'homme, le domaine collagène du C1g interagit avec le domaine calréticuline du cC1qR [225]. Or, le facteur humain se lie également avec HmcC1qR comme le prouve l'expérience de purification par affinité, réalisée à partir d'extraits protéiques de sangsue (figure 48). HmC1q contenant aussi un domaine collagène, il est fort probable que ce domaine se fixe au niveau du domaine calréticuline présent sur HmcC1qR. Les expériences d'hybridation in situ (figure 46) et celles d'immunohistochimie, utilisant l'anticorps polyclonal anti-cC1qR humain (figure 47), montrent respectivement l'expression génique et la production d'HmcC1qR au niveau de certaines cellules microgliales. Cependant, le nombre de cellules positives paraît faible. Par ailleurs, la protéine a été localisée dans certaines cellules microgliales situées dans le connectif et dans le ganglion à T24h et T72h post-lésion, sans qu'il y ait une augmentation du nombre de cellules immunopositives. Il est donc fort probable que la synthèse d'HmcC1gR soit induite dans le temps par une souspopulation de cellules microgliales avant une fonction biologique particulière dans les processus de réparation du système nerveux de l'animal. Afin de déterminer le rôle de ces cellules HmcC1qR positives dans la réparation du système nerveux, il serait intéressant d'injecter l'anticorps anti-cC1qR humain dans différentes chaînes nerveuses de sangsue. Après les avoir lésés au niveau d'un ou de plusieurs connectifs, les systèmes nerveux seront mis en culture. Après des intervalles de temps réguliers, les noyaux des cellules microgliales seront marqués au Hoechst. L'accumulation des cellules microgliales au niveau du site endommagé ainsi que les phénomènes de réparation seront finalement observés par microscope. Une autre expérience est également envisageable : il s'agira de mettre en culture des cellules microgliales de sangsue dissociées puis de les activer via rHmC1q. Ensuite, le sécrétome de cette population cellulaire activée sera récupéré en vue d'être analysé par spectrométrie de masse. Des expériences d'immunocytochimie seront réalisées sur les cellules ainsi activées en employant l'anticorps anti-cC1qR humain. Si le récepteur HmcC1qR est produit ou sécrété dans le temps par les cellules microgliales activées par rHmC1q, ces expériences pourront donner des éléments de réponse intéressants.

En parallèle, l'analyse du sécrétome des cellules microgliales *Hm*C1qBP positives est également nécessaire. Ces données permettront de comprendre les implications de ces deux récepteurs dans l'activation microgliale et ceci, toujours
dans l'optique d'identifier les facteurs microgliaux intervenant dans le dialogue de la microglie avec les neurones lésés. Cependant, au préalable, il semble intéressant de réaliser un marquage anti-gC1qR et anti-cC1qR afin de s'assurer si les cellules *Hm*C1qBP et *Hm*cC1qR positives sont bien deux populations microgliales distinctes. En effet, chez les vertébrés les récepteurs gC1qR et cC1qR sont, de manière générale, présents conjointement à la surface de nombreuses cellules dont les cellules immunitaires. D'ailleurs, bien qu'aucune interaction entre ces deux récepteurs n'ait été mise en évidence, ils semblent jouer de concert un rôle dans divers mécanismes inflammatoires médiés par le C1q. De manière intéressante, le C1q agit comme un puissant facteur chimioattractant, recrutant les cellules dendritiques, les monocytes, les mastocytes et autres cellules immunitaires sur le ou les sites inflammatoires via sa liaison aux gC1qR et cC1qR [225, 227-230].

Chez la sangsue, nous ne savons pas si *Hm*C1qBP et *Hm*C1qR sont liés en même temps par le C1q. Les cellules microgliales présentant *Hm*C1qBP semblent plus nombreuses que celles présentant *Hm*cC1qR. Nous n'avons pas observé de comarquage des deux molécules, ce qui nous laisse penser que les récepteurs peuvent intervenir dans le recrutement médié par *Hm*C1q, soit sur des cellules différentes, soit à des temps d'activation différents. Cependant, hormis chez la sangsue, ni le gC1qR ni le cC1qR n'ont été caractérisés à la surface des cellules microgliales d'autres espèces. Par conséquent, pour la toute première fois, deux récepteurs au C1q, homologues au gC1qR et cC1qR humains, ont été identifiés à la surface de cellules microgliales.

C. <u>Implication des récepteurs HmC1qBP et HmcC1qR dans le</u> <u>recrutement des cellules microgliales</u>

De manière intéressante, les résultats obtenus lors du recrutement des cellules microgliales de sangsue induit par les cytokines humaines (C1q et IL-16 humains) ne sont jamais aussi intenses que lorsque le milieu conditionné, milieu ayant incubé les chaînes nerveuses lésées de sangsue, est utilisé comme réactif chimioattractant. Cela suggère donc l'existence de sous-populations microgliales réactives aux différents facteurs produits et sécrétés suite à une lésion du système nerveux de la sangsue.

De plus, les anticorps polyclonaux anti-gC1qR et anti-cC1qR humains ne semblent pas marquer les cellules microgliales de manière équivalente. Les expériences de cytométrie en flux (figure 45), d'immunohistochimie (figures 44 et 47) ainsi que les expériences d'hybridation in situ (figures 43 et 46), montrent l'existence d'une population de cellules microgliales exprimant HmC1gBP relativement importante, alors que les signaux correspondant à HmcC1qR semblent correspondre à un pourcentage de cellules microgliales plus faible. Cependant, l'absence de valeur chiffrée quant au pourcentage de cellules HmcC1qR+ nous oblige à être circonspects. Par ailleurs, comme cela a déjà été mentionné, nous ne savons pas s'il existe une sous-population microgliale HmC1qBP+ distincte d'une population microgliale HmcC1qR+. Cependant, les résultats des expériences in vitro sont intéressants. En effet, la pré-incubation des cellules microgliales avec l'anticorps polyclonal anti-cC1qR humain réduit significativement le nombre de cellules recrutées par rHmC1q (figure 38) et ceci, de façon quasiment identique à la préincubation de la microglie avec l'anticorps polyclonal anti-gC1gR humain (figure 37). Si les effets inhibiteurs des anticorps anti-cC1qR et du cC1qR soluble ont été observés, nous ne savons pas sur quelle population de cellules microgliales ils s'exercent ni quelles sont leurs modalités d'action. Afin de répondre à ces questions, il serait intéressant d'analyser et de comparer le sécrétome des cellules microgliales activées par rHmC1q, en inhibant, via les anticorps, l'un des deux récepteurs (HmC1qBP ou HmcC1qR) ou les deux récepteurs simultanément. Des populations microgliales identiques seraient donc mises en culture avec l'anticorps anti-gC1qR ou l'anticorps anti-cC1qR humains, puis elles seraient activées par la forme recombinante de HmC1q. Après un temps d'incubation compris entre 24h et 48h, les sécrétomes seront récupérés, digérés par la trypsine et analysés par spectrométrie de masse. En comparant les listes des protéines sécrétées, nous pourrons certainement mettre en évidence l'existence d'une réponse microgliale spécifique montrant que les cellules sont capables d'adapter leur réponse en fonction du récepteur mis en jeu.

Concernant l'interaction de *Hm*C1q avec *Hm*C1qBP, les résultats montrent que ce récepteur est impliqué dans le recrutement des cellules microgliales de sangsue. En effet, la pré-incubation de la microglie avec les immunoglobulines antigC1qR humain réduit significativement le nombre de cellules recrutées par les deux facteurs (figures 22B et 37). De plus, pour mémoire, la toxine pertussique (ou PTX), qui inactive la protéine G, et la wortmannine, qui bloque la phosphatidylinositol-3-phosphate (ou « PtdIns (3,4,5) P3 ») ont également été utilisées dans des expériences de chimiotactisme sur les cellules microgliales de sangsue [1]. De manière intéressante, la pré-incubation de la microglie de sangsue avec la toxine pertussique, la wortmannine et avec l'anticorps anti-gC1qR humain a inhibé significativement le recrutement induit par le C1q humain (figure 22B). Or, chez les vertébrés, le C1q recrute les cellules immunitaires en reconnaissant entre autre le gC1qR et en déclenchant les voies de signalisation induites par la protéine G et la phosphatidylinositol-3-phosphate [226]. Il semble donc intéressant d'approfondir l'étude des voies de signalisation induites par l'interaction HmC1q-HmC1qBP. Ce travail sera également nécessaire pour comprendre l'activité médiée par le récepteur HmcC1qR.

Pour conclure, l'étude d'*Hm*C1q et de ces récepteurs, caractérisés dans le SNC de la sangsue médicinale, est unique. Comme cela a déjà été mentionné, des récepteurs de type gC1qR et cC1qR ont été localisés à la surface de cellules microgliales et leurs implications relatives dans le recrutement de la microglie ont été mises en évidence.

D. <u>Existe-t-il des analogues au C1q dans le système nerveux</u> <u>d'autres modèles ?</u>

Dans l'état actuel des connaissances, des molécules apparentées au C1q humain ont été caractérisées chez l'oursin [293], l'amphioxus *Branchiostoma floridae* [294] ou encore chez la moule *Mytilus galloprovincialis* [295]. Chez l'amphioxus, une molécule, nommée AmphiC1q, possède des homologies avec la CTRP1 qui appartient à la famille C1q. Comme le C1q humain ou la CTRP1, AmphiC1q se lie au LPS des bactéries Gram négatif. AmphiC1q peut également induire une activation et une agrégation cellulaire ou plaquettaire [294]. Chez la moule, la protéine *Mg*C1q a été détectée et semble sollicitée en cas d'infection par des bactéries Gram positif ou négatif. *Mg*C1q présente une forte homologie avec des protéines de type lectine. Bien que *Hm*C1q soit homologue au C1q des vertébrés, la voie classique d'activation

du système du complément semble impossible en l'absence de complexes immuns chez la sangsue. Cependant, de manière intéressante, des molécules apparentées à la MBL ont été détectées dans les banques EST de la sangsue. L'ensemble de ces données suggère que chez les invertébrés, le C1q participe plutôt à l'activation d'un système du complément par la voie des lectines que par la voie dite classique [295]. La poursuite de l'étude fonctionnelle de *Hm*C1q est donc primordiale afin d'approfondir sont rôle dans la réponse microgliale. En effet, *Hm*C1q ne fait-elle qu'induire le recrutement de cellules microgliales vers le site lésé en se liant à ses récepteurs ? A-t-elle une fonction dans l'activation d'un système apparenté au complément chez la sangsue en cas d'infection bactérienne ? Quelles sont alors les réponses immunitaires médiées par cette molécule ?

IV. Des mécanismes de l'activation microgliale

L'analyse des facteurs chimiotactiques impliqués dans le recrutement des cellules microgliales chez la sangsue a également révélé l'importance du facteur HmEMAPII [55]. Chez les vertébrés, EMAPII (ou endothélial-monocytes-activatingpolypeptide II) est une protéine issue de la maturation d'un précurseur, la p43 [296]. Cependant, les processus de maturation de la molécule restent controversés. En effet, cette protéine semble être libérée par les cellules apoptotiques, ce qui a amené certains auteurs à supposer le rôle joué par certaines enzymes de type caspases dans le clivage de la p43 [297]. D'autres données suggèrent qu'EMAPII n'est qu'un sous-produit issu de l'apoptose des cellules et que le clivage de la p43 est causé par l'activation d'une cystéine protéase [298]. Aussi, EMAPII est potentiellement associée à de nombreux processus pathologiques du système nerveux central [299]. Chez le rat, suite à une section de la moelle épinière, l'expression de la cytokine a été mise en évidence dans les cellules microgliales accumulées au niveau du site endommagé [300]. De plus, une récente étude a montré qu'après ischémie cérébrale, le taux d'EMAPII augmente significativement dans les zones lésées [301]. Enfin, différentes expériences, réalisées en utilisant des anticorps dirigés contre cette molécule, montrent un marquage accru des cellules microgliales lors de pathologies du SNC [302, 303]. Bien que la cytokine ait une activité chimioattractante sur les monocytes ou sur les cellules endothéliales via le récepteur CXCR3 dans le système périphérique, la fonction biologique d'EMAPII au sein du parenchyme cérébral reste inconnu [299].

Comme chez les vertébrés, HmEMAPII résulte du clivage d'un précurseur Hm-p43 présent dans le SNC de la sangsue [55]. De plus, des expériences d'hybridation in situ et d'immunohistochimie montrent que, comme chez les mammifères, cette cytokine est synthétisée dans les cellules microgliales et les neurones de la sangsue. Des analyses par PCR quantitative révèlent que l'expression du gène codant Hm-p43/EMAPII est induite soit par une lésion expérimentale de la chaîne nerveuse de l'animal, soit lors d'une stimulation des cellules nerveuses de la sangsue par des bactéries Gram positif ou Gram négatif. Hm-EMAPII semble donc être impliquée dans les processus de régénérescence du système nerveux de la sangsue et dans la mise en place de la réponse immunitaire innée induite lors d'une infection bactérienne. Des analyses d'immunohistochimie, effectuées sur des chaînes nerveuses lésées au niveau des connectifs et mises en culture avec ou sans challenge bactérien, ont révélé une production importante de la cytokine par les cellules microgliales accumulées au niveau du site endommagé. Par ailleurs, l'expression du gène Hm-EMAPII semble être sous le contrôle du récepteur HmTLR1, une structure réceptrice de type Toll récemment caractérisée chez la sangsue [52]. De manière intéressante, chez les vertébrés, l'expression d'EMAPII semble également être sous le contrôle de récepteurs de type TLR et HmTLR1 présente de fortes homologies avec le récepteur TLR13, identifié chez la souris mais dont les fonctions biologiques sont encore inconnues.

La recherche d'effecteurs immunitaires chez la sangsue, a permis la mise en évidence de peptides antimicrobiens comme la neuromacine et la lumbricine au niveau du système nerveux [52]. En outre, la neuromacine et l'*Hm*-lumbricine possèdent également une activité neurotrophique [52]. D'ailleurs, si la neuromacine est produite par les neurones et l'ensemble de la microglie, l'*Hm*-lumbricine est essentiellement produite par les cellules microgliales accumulées au niveau du site endommagé. Ces résultats suggèrent fortement que le système nerveux de la sangsue est capable de mettre en place une réponse immunitaire adaptée aux microorganismes qu'elle rencontre. Par conséquent, la réponse immunitaire du système nerveux permet de limiter le développement d'agents infectieux dans le système nerveux lésé de la sangsue.

185

De plus, nous savons qu'elle permet le recrutement et l'activation des cellules microgliales au niveau de la lésion intervenant dans les mécanismes de réparation nerveuse. En effet, l'ensemble des facteurs chimioattractants, *Hm*IL-16, *Hm*C1q et *Hm*-EMAPII, caractérisés dans le SNC de la sangsue, est impliqué dans la mobilisation des cellules microgliales. Leur activation distincte par chacun des facteurs, permettrait de comprendre l'implication relative des sous-types microgliaux intervenant dans la réparation du SNC de la sangsue. Cette notion de sous-types microgliaux peut se concevoir sous deux aspects.

Sommes-nous face à des sous-types microgliaux réagissant distinctement à différents chimioattractants selon qu'ils exposent un récepteur particulier? Cela implique de caractériser ces récepteurs pour comprendre la mobilisation de ces sous-types cellulaires. Mais aussi, sommes-nous face à une réponse microgliale portée par des cellules capables de réagir à plusieurs chimioattractants car elles exposent plusieurs récepteurs ? Dans ce cas, la réponse spécifique dépendrait du mode d'activation. Par exemple, une cellule réactive à *Hm*C1q est elle réactive à *Hm*IL16. Si tel est le cas, la réponse est-elle différente entre les deux situations d'activation ? Il semble important de mener ces études pour mieux comprendre le phénomène plus général d'activation microgliale et engager l'étude de leur dialogue avec les neurones lésés.

CONCLUSION

Il est nécessaire de comprendre l'origine évolutive de certaines fonctions biologiques pour en recenser les mécanismes ancestraux dont dérivent les organismes plus complexes. Les études menées chez les Annélides en sont des exemples évidents.

Les Annélides - présents depuis 600 millions d'années - auxquels appartiennent les hirudinées, font partie des Lophotrochozoaires, un vaste ensemble phylogénétique qui comprend également les mollusques et les plathelminthes. Les Lophotrochozoaires constituent la troisième grande branche des bilatériens aux côtés des Ecdysozoaires (arthropodes, nématodes...) et des deutérostomiens (échinodermes, vertébrés...). L'analyse du génome du ver marin Platynereis dumerilii a démontré que près de deux tiers des introns du génome humain sont communs avec ceux de l'annélide alors qu'ils sont absents chez les insectes et les nématodes. Cette très grande proximité s'est expliquée par l'implication de ce support génétique dans la mise en place de la symétrie bilatérale. L'analyse des séquences codantes a par ailleurs confirmé cette forte homologie entre les Annélides et l'Homme [175]. L'organisation de la symétrie bilatérale comprend également la formation de la chaîne nerveuse. La comparaison entre Platynereis dumerilii et les Vertébrés a montré une grande similitude des gènes impliqués dans l'installation du système nerveux central et suggère une origine commune de la centralisation du système nerveux chez tous les organismes bilatériens.

Cet exemple montre bien que grâce à l'utilisation de certains modèles d'étude simples, des questions pertinentes peuvent être adressées et dépasser largement le cas spécifique.

Concernant la réponse du système nerveux lésé chez la sangsue médicinale, nous savons qu'elle se montre efficace. En effet, après la suppression de toute conduction nerveuse, les mécanismes initiés aboutissent en quelques semaines à la réparation fonctionnelle de la chaine nerveuse. Ceci est visible par la restauration complète des fonctions locomotrices de l'animal. Nous avons vu récemment que le processus de recrutement microglial est, chez la sangsue médicinale, une étape essentielle à la réparation nerveuse. Lorsqu'il est altéré, les reconnexions synaptiques sont très largement compromises [47]. Ces cellules sont donc globalement perçues comme neuro-protectrices pour le système nerveux de la sangsue. Ce processus de recrutement microglial repose entre autre sur des facteurs immunitaires connus et utilisés chez les mammifères.

Les cellules microgliales de la sangsue présentent de nombreuses caractéristiques communes avec les cellules microgliales des vertébrés. Suite à une stimulation, elles deviennent amiboïdes, mobiles et développent une activité de phagocytose. Par ailleurs, les cellules du système nerveux de la sangsue sont capables de détecter, dans son environnement, la présence de micro-organismes ou de débris cellulaires, provoquée par la lésion des connectifs. Dans un premier temps, la production neuronale et microgliale de NO, de peptides antimicrobiens et d'effecteurs tels que HmIL-16, HmC1q et HmEMAPII, suggère fortement la mise en place d'une réponse immunitaire innée qui débute par la migration des cellules microgliales vers le site endommagé. De plus, les résultats, obtenus tout au long de cette thèse, ont mis en relief l'existence de protéines contenant des domaines hautement conservés au cours de l'évolution. Que ce soit HmlL-16, HmC1g et ses récepteurs HmC1qBP ou HmcC1q, ces protéines présentent des domaines conservés et des analogies fonctionnelles avec leurs correspondants mammaliens. Afin de poursuivre cette étude, il est nécessaire de développer des questions autour de :

- L'impact de chaque facteur chimioattractant sur l'activité des cellules microgliales et l'interdépendance pouvant exister entre ces molécules (effet synergique ou inhibiteur ?).
- 2. La mise en évidence de différentes sous-populations microgliales.
- L'action de chaque sous-type microglial recruté sur l'initiation de la repousse axonale.

Chez les Mammifères, il est très difficile de dire si, comme des vertébrés inférieurs tels que les amphibiens, les individus adultes gardent des caractères embryonnaires de la neurogenèse leur permettant de réparer leur système nerveux central. Il existe une régénération partielle au niveau des nerfs sciatiques chez le rat. En revanche, les modèles montrent une régénération nerveuse périphérique et non centrale. De plus, il est clairement établi chez les mammifères que l'infiltration massive de cellules microgliales d'origine macrophagique est nécessaire au nettoyage des débris causés dans le cadre d'une dégénérescence dans le système

nerveux central. Mais cet effet neuro-protecteur présente un revers car de nombreuses études montrent que la réponse neuro-inflammatoire, proportionnelle à l'infiltration de nombreuses sous-populations de cellules sanguines, compromet la réparation correcte du tissu nerveux [304] [305]. La neuro-inflammation, lorsqu'elle échappe à un contrôle normal, devient même un élément déclenchant de pathologies du système nerveux comme c'est le cas avec la sclérose multiple [305].

En conséquence, des modèles structuralement plus accessibles - tentant de mettre en lumière l'implication de la seule microglie résidente - sont utiles pour évaluer le rapport entre la capacité de réparation nerveuse et la réponse inflammatoire. *Hirudo medicinalis,* par sa mobilisation microgliale dépourvue d'infiltration significative de cellules sanguines, constitue un très bon modèle complémentaire.

En effet, le raffinement d'un mécanisme qui a résisté durant des centaines de millions d'années aux pressions naturelles réside surtout dans l'efficacité des réseaux cellulaires et moléculaires mis en jeu. Plus largement, si l'on réfléchit aux particularités qui confèrent à la sangsue médicinale sa capacité innée et fonctionnelle de réparation nerveuse, il semble important que les adaptations naturelles bénéfiques soient élucidées.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- 1. Tahtouh, M., et al., *Evidence for a novel chemotactic C1q domain-containing factor in the leech nerve cord.* Mol Immunol, 2009. **46**(4): p. 523-31.
- 2. Francis, K., et al., *Innate immunity and brain inflammation: the key role of complement.* Expert Rev Mol Med, 2003. **5**(15): p. 1-19.
- 3. Gasque, P., et al., *Complement components of the innate immune system in health and disease in the CNS.* Immunopharmacology, 2000. **49**: p. 171-186.
- 4. Kishore, U. and K.B. Reid, *C1q: structure, function, and receptors.* Immunopharmacology, 2000. **49**: p. 159- 170.
- 5. Croq, F., et al., A homologous of interleukin 16 active form is implicated in microglia recruitment in leech Hirudo medicinalis following nervous system injury. GLIA, 2010. **54**(14): p. 1649-62.
- 6. Center, D.M., et al., *Interleukin 16: implications for CD4 functions and HIV-1 progression.* Immunology Today, 2000. **Vol. 21, No. 6**: p. 273-280.
- 7. Nakajima, K. and S. Kohsaka, *Microglia: Neuroprotective and Neurotrophic Cells in the Central Nervous System.* Current Drug Targets Cardiovascular & Haematological Disorders, 2004. **4**: p. 65-84.
- 8. Duan, Y., et al., *Repair and Regeneration of Functional Synaptic Connections: Cellular and Molecular Interactions in the Leech.* Cellular and Molecular Neurobiology, 2005. **25**(2): p. 441-450.
- 9. Hanisch, U.K. and H. Kettenmann, *Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain.* Nat Neurosci, 2007. **10**(11): p. 1387-94.
- 10. Hanisch, U.K., *Microglia as a source and target of cytokines.* Glia, 2002. **40**(2): p. 140-55.
- 11. Hawkins, B.T. and T.P. Davis, *The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease.* Pharmacol Rev, 2005. **57**(2): p. 173-85.
- 12. Abbott, N.J., L. Ronnback, and E. Hansson, *Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier*. Nat Rev Neurosci, 2006. **7**(1): p. 41-53.
- 13. Steinman, L., *Nuanced roles of cytokines in three major human brain disorders.* J Clin Invest, 2008. **118**(11): p. 3557-63.
- 14. Babington, E.J., et al., *Three-dimensional culture of leech and snail ganglia for studies of neural repair.* Invert Neurosci, 2005. **5**(3-4): p. 173-82.
- 15. Zlokovic, B.V. and M.L. Apuzzo, *Strategies to circumvent vascular barriers of the central nervous system.* Neurosurgery, 1998. **43**(4): p. 877-8.
- 16. Becher, B., et al., *Brain-Immune Connection: Immuno-Regulatory Properties* of CNS-Resident Cells. GLIA, 2000. **29**: p. 293–304.
- 17. Stoll, G., et al., *Inflammation and Glial responses in Ischemic Brain Lesions*. Progress in Neurobiology, 1998. **56**: p. 149-171.
- 18. Raivich, G., et al., *Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function.* Brain Research Reviews, 1999. **30**: p. 77-105.
- 19. Perry, V.H., *The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease.* Brain Behav Immun, 2004. **18**(5): p. 407-13.
- 20. Poirier, J., La barrière hémato-encéphalique. Données morpholofonctionnelles. publication hoechst Inc, 1976.
- 21. Nimmerjahn, A., et al., *Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo.* Science, 2005. **308**: p. 1314-1318.
- 22. Hawkins, R.A., et al., *Structure of the Blood–Brain Barrier and Its Role in the Transport of Amino Acids.* J. Nutr. , 2006. **136**: p. 218S–226S.

- 23. Streit, W.J. and G.W. Kreutzberg, *Lectin binding by resting and reactive microglia.* J Neurocytol., 1987. **16(2)**: p. 249-60.
- 24. Aloisi, F., *Immune function of microglia*. Glia, 2001. **36**(2): p. 165-79.
- 25. Glezer, I., et al., *Neuroprotective role of the innate immune system by microglia.* Neuroscience, 2007. **147**(4): p. 867–883.
- 26. Abbott, N.J., *Inflammatory Mediators and Modulation of Blood–Brain Barrier Permeability.* Cellular and Molecular Neurobiology, 2000. Vol. 20, No. 2.
- 27. Dheen, S.T., et al., *Microglial Activation and its Implications in the Brain Diseases*. Current Medicinal Chemistry, 2007. **14**: p. 1189-97.
- 28. Kettenmann, H. and U. Hanisch, *Physiology of Microglia.* Physiol Rev, 2011. **91**: p. 461–553.
- 29. Moon, L.D., et al., *Robust regeneration of CNS axons through a track depleted of CNS glia.* Exp Neurol, 2000. **161**(1): p. 49-66.
- 30. Fawcett, J.W. and R.A. Asher, *The glial scar and central nervous system repair.* Brain Research Bulletin, 1999. **49**(6): p. 377–391.
- 31. Baylor, D.A. and J.G. Nicholls, *Patterns of regeneration between individual nerve cells in the central nervous system of the leech.* Nature, 1971. **232**: p. 268-270.
- 32. Jansen, J.K.S. and J.G. Nicholls, *Regeneration and Changes in Synaptic Connections between Individual Nerve Cells in the Central Nervous System of the Leech.* Proc. Nat. Acad. Sci., 1972. **69, No.3**: p. 636-639.
- 33. Chiquet, M. and J.G. Nicholls, *Neurite Outgrowth and Synapse Formation by Identified Leech Neurones in culture.* J. exp. Biol., 1987. **132**: p. 191-206.
- 34. Baylor, D.A. and J.G. Nicholls, *Chemical and Electrical Synaptic Connexions* between Cutaneous Mechanoreceptor Neurones in the Central Nervous System of the Leech. J. Physiol., 1969. **203**: p. 591-609.
- 35. Nicholls, J.G. and U.G. Hernandez, *Growth and Synapse formation by identified leech neurones in culture: a review.* Quarterly Journal of Experimental Physiology, 1989. **74**: p. 965-973.
- 36. Elliott, E.J. and K.J. Muller, *Long-term Survival of Glial Segments during Nerve Regeneration in the Leech.* Brain Research, 1981. **218**: p. 99-113.
- 37. McGlade-McCulloh, E. and K.J. Muller, *Developing Axons Continue to Grow at Their Tip after Synapsing with Their Appropriate Target.* Neuron, 1989(2). **2**: p. 1063-1068.
- 38. Nicholls, J.G. and D.A. Baylor, *Specific modalities and receptive fields of sensory neurons of the leech.* J Neurophysiol, 1968. **31**(5): p. 740-756.
- 39. Coggeshall, R.E. and D.W. Fawcett, *The Fine Structure of the Central Nervous System of the Leech, Hirudo medicinalis.* J Neurophysiol 1964. **27**(2): p. 229-289.
- 40. Elliott, E.J. and K.J. Muller, *Accurate Regeneration of an Electrical Synapse between two Leech Neurones after Destruction of the Ensheathing Glial Cell.* J. Physiol., 1983. **344**: p. 243-255.
- 41. Elliott, E.J. and K.J. Muller, Sprouting and Regeneration of Sensory Axons after Destruction of Ensheathing Glial Cells in the Leech Central Nervous System. The Journal of Neuroscience, 1983. **3**(10).
- 42. Morgese, V.J., E.J. Elliot, and K.J. Muller, *Microglial movement to sites of nerve lesion in the leech CNS.* Brain Research, 1983. **272**: p. 166-170.
- 43. McGlade-McCulloh, E., et al., *Individual microglia move rapidly and directly to nerve lesions in the leech central nervous system.* Proc. Nati. Acad. Sci. (Neurobiology), 1989(1). **86**: p. 1093-1097.

- 44. Masuda-Nakagawa, L.M., K.J. Muller, and J.G. Nicholls, Accumulation of laminin and microglial cells at sites of injury and regeneration in the central nervous system of the leech. Proc Biol Sci, 1990. **241**(1302): p. 201-6.
- 45. von Bernhardi, R. and K.J. Muller, *Repair of the central nervous system: lessons from lesions in leeches.* J Neurobiol, 1995. **27**(3): p. 353-66.
- 46. Chen, A., et al, *Nitric Oxide Influences Injury-Induced Microglial Migration and Accumulation in the Leech CNS.* The Journal of Neuroscience, 2000. **20**(3): p. 1036–1043.
- 47. Ngu, E.M., C.L. Sahley, and K.J. Muller, *Reduced axon sprouting after treatment that diminishes microglia accumulation at lesions in the leech CNS.* J Comp Neurol, 2007. **503**(1): p. 101-9.
- 48. Boidin-Wichlacz, C., et al., *Morphological and functional characterization of leech circulating blood cells: role in immunity and neural repair.* Cell. Mol. Life Sci., 2011. **69**: p. 1717–1731.
- 49. Lefebvre, C., et al., *Transcriptomic analysis in the leech Theromyzon tessulatum: involvement of cystatin B in innate immunity.* Biochem. J., 2004. **380**: p. 617–625.
- 50. Lefebvre, C., et al., *Cathepsin L and cystatin B gene expression discriminates immune coelomic cells in the leech Theromyzon tessulatum.* Dev Comp Immunol, 2008. **32**(7): p. 795-807.
- 51. Tasiemski, A., et al., *Molecular characterization of two novel antibacterial* peptides inducible upon bacterial challenge in an annelid, the leech Theromyzon tessulatum. J Biol Chem, 2004. **279**(30): p. 30973-82.
- 52. Schikorski, D., et al., *Microbial Challenge Promotes the Regenerative Process* of the Injured Central Nervous System of the Medicinal Leech by Inducing the Synthesis of Antimicrobial Peptides in Neurons and Microglia. The Journal of Immunology, 2008. **181**: p. 1083-1095.
- 53. Vergote, D., et al., *Proteome modifications of the medicinal leech nervous system under bacterial challenge.* Proteomics., 2006. **6**(17): p. 4817-25.
- 54. Vergote, D., et al., *Up-regulation of Neurohemerythrin Expression in the Central Nervous System of the Medicinal Leech, Hirudo medicinalis, following Septic Injury.* The Journal of Biological Chemistry, 2004. **279, No. 42**: p. 43828–43837.
- 55. Schikorski, D., et al., *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, 2009. **183**(11): p. 7119-28.
- 56. Tahtouh, M., et al., Interaction of HmC1q with leech microglial cells: involvement of C1qBP-related molecule in the induction of cell chemotaxis. Journal of Neuroinflammation, 2010.
- 57. Pachter, J.S., H.E. de Vries, and Z. Fabry, *The blood-brain barrier and its role in immune privilege in the central nervous system.* J. Neuropathol Exp Neurol, 2003. **62**(6): p. 593-604.
- 58. Engelhardt, B., *Development of the blood-brain barrier.* Cell Tissue Res, 2003. **314**(1): p. 119-29.
- 59. Lee, J.C., *Evolution in the concept of the blood-brain barrier phenomenon.* Progress in Neuropathology, 1971: p. 84-145 (ISBN 0-88167-188-6).
- 60. Duvernoy, H.M. and P.Y. Risold, *The circumventricular organs: An atlas of comparative anatomy and vascularization.* Brain Research Reviews, 2007. **56**: p. 119 147.

- 61. Dulmovits, B.M. and I.M. Herman, *Microvascular remodeling and wound healing: A role for pericytes.* Int J Biochem Cell Biol, 2012. **44**(11): p. 1800-1812.
- 62. Boado, R.J. and W.M. Pardridge, *Glucose deprivation and hypoxia increase* the expression of the *GLUT1* glucose transporter via a specific mRNA cisacting regulatory element. Journal of Neurochemistry, 2002. **80**: p. 552-554.
- 63. Pan, W., et al., *Modulation of feeding-related peptide/protein signals by the blood-brain barrier.* J Neurochem, 2004. **90**(2): p. 455-61.
- 64. Schwaninger, M., et al., *Bradykinin induces interleukin-6 expression in astrocytes through activation of nuclear factor-κB.* J. Neurochem., 1999. **73**: p. 1461–1466.
- 65. Deli, M.A., et al., *Exposure of tumor necrosis factor-α to luminal membrane of bovine capillary endothelial cells cocultured with astrocytes induces a delayed increase of permeability and cytoplasmic stress formation of actine.* J. Neurosci. Res., 1995. **41**: p. 717–726.
- 66. Didier, N. et al., Secretion of interleukin-1β by astrocytes mediates endothelin-1 and tumour necrosis factor-α effects on human brain microvascular endothelial cell permeability. J. Neurochem., 2003. **86**: p. 246–254.
- 67. Huber, J.D., R.D. Egleton, and T.P. Davis, *Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood–brain barrier.* Trends Neurosci., 2001. **24**: p. 719–725.
- 68. Banks, W.A., Blood-brain barrier transport of cytokines: a mechanism for neuropathology. Curr. Pharm. Des., 2005. **11**: p. 973–984.
- 69. Iadecola, C., *Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease.* Nature Rev. Neurosci., 2004. **5**: p. 347–360.
- 70. Lawson, L.J., V.H. Perry, and S. Gordon, *Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain.* Neuroscience, 1992. **48**(2): p. 405-415.
- 71. Streit, W.J., S.A. Walter, and N.A. Pennell, *Reactive microgliosis*. Progress in Neurobiology (Prog Neurobiol), 1999. **57**(6): p. 563-581.
- 72. Nissl, F., Über einige Beziehungen zwischen Nervenzellenerkrankungen und gliosen Erscheinungen bei verschiedenen Psychosen. Arch Psychiatr Nervenkr, 1899. **32**: p. 656-676.
- 73. Robertson, W., A microscopic demonstration of the normal and pathological histology of mesoglia cells. J Ment Sci, 1900. **46**: p. 733-752.
- 74. Alzheimer, A., Histologische Studien zur Diferenzialdiagnose der progressiven Paralyse. Nissl's histologische und histopathologische Arbeiten. 1904. **1**: p. 18-314.
- 75. Kaur, C., et al., Origin of Microglia. Microsc. Res. Tech., 2001. 54: p. 2–9.
- 76. Ling, E.A. and W.C. Wong, *The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts.* Glia, 1993. **7**(1): p. 9-18.
- 77. Ling, E.A., et al., *Immunocytochemical localization of CR3 complement receptors with OX-42 in amoeboid microglia in postnatal rats.* Anat Embryol (Berl), 1990. **182**(5): p. 481-6.
- 78. Rezaie, P. and D. Male, *Expression of adhesion molecules on human foetal cerebral vessels: relationship to colonisation by microglial precursors.* Biochem Soc Trans, 1997. **25**(2): p. 170S.
- 79. Guilian, D. and T. Baker, *Peptides Released by Ameboid Microglia Regulate Astroglial Proliferation.* The Journal of Cell Biology, 1985. **101**: p. 2411-2415.

- 80. Guilian, D. and D.G. Young, *Brain Peptides and Glial Growth. II. Identification of Cells That Secrete Glia-promoting Factors.* The Journal of Cell Biology, 1986. **102**: p. 812-820.
- 81. Paterson, J.A., et al., *Investigation of glial cells in semithin sections.* 3. *Transformation of subependymal cells into glial cells, as shown by radioautography after* 3 *H-thymidine injection into the lateral ventricle of the brain of young rats.* J Comp Neurol, 1973. **149**: p. 83-102.
- 82. Wolswijk, G., Strongly GD3+ cells in the developing and adult rat cerebellum belong to the microglial lineage rather than to the oligodendrocyte lineage. Glia, 1995. **13**: p. 13-26.
- 83. Fedoroff, S., R. Zhai, and J.P. Novak, *Microglia and astroglia have a common progenitor cell.* J Neurosci Res, 1997. **50**: p. 477-486.
- 84. Priller, J., et al., Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. Nat Med, 2001. **7**(12): p. 1356-61.
- 85. Simard, A.R., et al., *Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease.* Neuron, 2006. **49**(4): p. 489-502.
- 86. Bechmann, I., et al., *Circulating monocytic cells infiltrate layers of anterograde axonal degeneration where they transform into microglia.* . Faseb J, 2005. **19**: p. 647-649.
- 87. Alliot, F., I. Godin, and B. Pessac, *Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain.* Brain Res Dev Brain Res, 1999. **117**: p. 145-152.
- 88. Takahashi, K., F. Yamamura, and M. Naito, *Differentiation, maturation, and proliferation of macrophages in the mouse yolk sac: a light-microscopic, enzyme-cytochemical, immunohistochemical, and ultrastructural study. J Leukoc Biol 45, 87-96.* J Leukoc Biol 1989. **45**: p. 87-96.
- 89. Sievers, J., R. Parwaresch, and H.U. Wottge, *Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells on monolayers of astrocytes: morphology.* Glia, 1994. **12**: p. 245-258.
- 90. Leone, C., et al., *Characterization of human monocyte-derived microglia-like cells. Glia 54, 183-192.* Glia, 2006. **54**: p. 183-192.
- 91. Kennedy, D.W. and J.L. Abkowitz, *Kinetics of central nervous system microglial and macrophage engraftment: analysis using a transgenic bone marrow transplantation model.* Blood, 1997. **90**: p. 986-993.
- 92. Liu, W., et al., *Macrophage Colony-Stimulating Factor Mediates Astrocyte-Induced Microglial Ramification in Human Fetal Central Nervous System Culture.* American Journal ofPathology, 1994. Vol. 145, No. 1: p. 48-53.
- 93. Kanzawa, T., et al., *Differentiated regulation of allo-antigen presentation by different types of murine microglial cell lines.* J Neurosci Res, 2000. **62**: p. 383-388.
- 94. Kreutzberg, G.W., *Microglia: a sensor for pathological events in the CNS.* GLia (Trends Neurosci.), 1996. **19**: p. 312-318.
- 95. Dheen, S.T., C. Kaur, and E.A. Ling, *Microglial activation and its implications in the brain diseases.* Curr Med Chem, 2007. **14**(11): p. 1189-97.
- 96. Soulet, D. and S. Rivest, *Bone-marrow-derived microglia: myth or reality?* Curr Opin Pharmacol, 2008. **8**(4): p. 508-18.

- 97. Nahrendorf, M., et al., *The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions.* The Journal of Experimental Medicine, 2007. **204**(12): p. 3037-3047.
- 98. Yong, V.W. and S. Rivest, *Taking Advantage of the Systemic Immune System to Cure Brain Diseases.* Neuron, 2009. **64**: p. 55-60.
- Martinez, F.O., L. Helming, and S. Gordon, *Alternative Activation of Macrophages: An Immunologic Functional Perspective.* Annu. Rev. Immunol., 2009. 27: p. 451–83.
- 100. Jung, D.Y., et al., *TLR4, but Not TLR2, Signals Autoregulatory Apoptosis of Cultured Microglia: A Critical Role of IFN-β as a Decision Maker.* The Journal of Immunology, 2005. **174**: p. 6467–6476.
- 101. Streit, W.J., *Microglial senescence: does the brain's immune system have an expiration date?* Trends Neurosci., 2006. **29**(9): p. 506-10.
- 102. Wolburg, H. and A. Lippoldt, *Tight junctions of the blood–brain barrier: Development, composition and regulation.* Vascular Pharmacology, 2002. **38** p. 323–337.
- 103. Berzin, T.M., et al., *Agrin and microvascular damage in Alzheimer's disease.* Neurobiol. Aging, 2000. **21**: p. 349–355.
- 104. Dirnagl, U., et al., *Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view.* Trends Neurosci., 1999. **22**: p. 391–397.
- 105. Antel, J.P. and T. Owens, *Immune regulation and CNS autoimmune disease*. Journal of Neuroimmunology, 1999. **100**: p. 181–189.
- 106. Owens, T., *Immune cells entry to the CNS focus for immunoregulation of EAE.* 75th Forum in Immunology, 1998(Immunoregulation of EAE): p. 781-789.
- 107. Wang, Q., X.N. Tang, and M.A. Yenari, *The inflammatory response in stroke.* J Neuroimmunol, 2007. **184**(1-2): p. 53-68.
- 108. Rock, R.B., et al., *Transcriptional response of human microglial cells to interferon-gamma.* Genes Immun, 2005. **6**(8): p. 712-9.
- Smith, E.M., *Phagocytic Properties of Microglia In Vitro: Implications for a Role in Multiple Sclerosis and EAE.* Microscopy Research and Technique, 2001.
 54: p. 81–94.
- 110. Speth, C., M.P. Dierich, and P. Gasque, *Neuroinvasion by pathogens: a key role of the complement system.* Mol Immunol, 2002. **38**(9): p. 669-79.
- 111. Farber, K., et al., *C1q, the recognition subcomponent of the classical pathway of complement, drives microglial activation.* J Neurosci Res, 2009. **87**(3): p. 644-52.
- 112. Reichert, F. and S. Rotshenker, *Complement-receptor-3 and scavengerreceptor-Al/II mediated myelin phagocytosis in microglia and macrophages.* Neurobiol Dis, 2003. **12**(1): p. 65-72.
- 113. David, S., et al., *Macrophages can modify the nonpermissive nature of the adult mammalian Central Nervous System.* Neuron, 1990. **5**: p. 463-469.
- 114. Ponomarev, E.D., et al., *Microglial cell activation and proliferation precedes the onset of CNS autoimmunity.* J Neurosci Res 2005b. **81**: p. 374-389.
- 115. Heppner, F.L., et al., *Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis.* Nat Med 2005. **11**: p. 146-152.
- 116. Boulu, R.G., M. Plotkine, et al., *Nitric monoxide, a new neurotransmitter in the central nervous system.* Ann Pharm Fr, 1994. **52**(2): p. 69-80.
- 117. Foster, M.W., D.T. Hess, et al., *Protein S-nitrosylation in health and disease: a current perspective.* Trends Mol Med, 2009. **15**(9): p. 391-404.

- 118. Esen, N., F.Y. Tanga, et al., *Toll-like receptor 2 (TLR2) mediates astrocyte activation in response to the Gram-positive bacterium Staphylococcus aureus.* J Neurochem, 2004. **88**(3): p. 746-758.
- Ebert, S., J. Gerber, et al., Dose-dependant activation of microglial cells by Toll-like receptor agonists alone and in combination. J Neuroimmunol, 2005.
 159(1-2): p. 87-96.
- 120. Esen, N. and T. Kielian, Central role for MyD88 in the responses of microglia to pathogen-associated molecular patterns. J Immunol, 2006. **176**(11): p. 6802-6811.
- 121. Olanow, C.W., *A radical hypothesis for neurodegeneration.* Trends Neurosci, 1993. **16**: p. 439-444.
- 122. Guix, F.X., et al., *The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain.* Prog Neurobiol, 2005. **76**(2): p. 126-152.
- 123. Moreira, P.I., M.A. Smith, et al., *Oxidative stress and neurodegeneration.* Ann NY Acad Sci, 2005. **1043**: p. 545-552.
- 124. Li, J., et al., *Peroxynitrite generated by inducible nitric oxide synthase and NADPH oxidase mediates microglial toxicity to oligodendrocytes.* Proc Natl Acad Sci USA, 2005. **102**: p. 9936-9941.
- 125. Lipton, S.A., et al., A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. Nature 1993. **364**: p. 626-632.
- 126. da Cunha, A., et al., *Glial cell-specific mechanisms of TGF-beta 1 induction by IL-1 in cerebral cortex. .* J Neuroimmunol, 1993. **42**: p. 71-85.
- 127. Chao, C.C., et al., *Tumor necrosis factoralpha mediates the release of bioactive transforming growth factor-beta in murine microglial cell cultures.* Clin Immunol Immunopathol 1995. **77**: p. 358-365.
- 128. da Cunha, A., et al., *Transforming growth factor-beta1 in adult human microglia and its stimulated production by interleukin-1.* J Interferon Cytokine Res, 1997. **17**: p. 655-664.
- 129. Lehrmann, E., et al., *Microglia and macrophages are major sources of locally produced transforming growth factor-beta1 after transient middle cerebral artery occlusion in rats.* Glia, 1998. **24**: p. 437-448.
- 130. Pratt, B.M. and J.M. McPherson, *TGF-beta in the central nervous system: potential roles in ischemic injury and neurodegenerative diseases.* Cytokine Growth Factor Rev, 1997. **8**: p. 267-292.
- 131. Baghdassarian, D., et al., *Effects of transforming growth factor-beta 1 on the extracellular matrix and cytoskeleton of cultured astrocytes.* Glia, 1993. **7**: p. 193-202.
- 132. Shrikant, P., et al., *Stimulus-specific inhibition of intracellular adhesion molecule-1 gene expression by TGF-beta.* J Immunol, 1996. **157**: p. 892-900.
- 133. Paglinawan, R., et al., *TGFbeta directs gene expression of activated microglia* to an anti-inflammatory phenotype strongly focusing on chemokine genes and cell migratory genes. Glia, 2003. **44**: p. 219-231.
- 134. Wei, R. and G.M. Jonakait, *Neurotrophins and the anti-inflammatory agents interleukin-4 (IL-4), IL-10, IL-11 and transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) down-regulate T cell costimulatory molecules B7 and CD40 on cultured rat microglia.* J Neuroimmunol, 1999. **95**: p. 8-18.
- 135. Suzumura, A., et al., *Transforming growth factor-beta suppresses activation and proliferation of microglia in vitro.* J Immunol, 1993. **151**: p. 2150-2158.

- 136. Jander, S., et al., *Time course and cellular localization of interleukin-10 mRNA and protein expression in autoimmune inflammation of the rat central nervous system.* Am J Pathol, 1998. **152**: p. 975-982.
- Aloisi, F., et al., Opposite effects of interferon-gamma and prostaglandin E2 on tumor necrosis factor and interleukin-10 production in microglia: a regulatory loop controlling microglia pro- and antiinflammatory activities. J Neurosci Res, 1999. 56: p. 571-580.
- 138. Elkabes, S., E.M. DiCicco-Bloom, and I.B. Black, *Brain microglia/macrophages* express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. J Neurosci 1996. **16**: p. 2508-2521.
- 139. Batchelor, P.E., et al., 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, 1999. **19**: p. 1708-1716.
- 140. Aarum, J., et al., *Migration and differentiation of neural precursor cells can be directed by microglia.* Proc Natl Acad Sci USA, 2003. **100**: p. 15983-15988.
- 141. Rabchevsky, A.G. and W.J. Streit, *Grafting of cultured microglial cells into the lesioned spinal cord of adult rats enhances neurite outgrowth.* J Neurosci Res, 1997. **47**: p. 34-48.
- 142. Kitamura, Y., et al., Intracerebroventricular injection of microglia protects against focal brain ischemia. J Pharmacol Sci, 2004. **94**: p. 203-206.
- 143. Heese, K., C. Hock, and U. Otten, *Inflammatory signals induce neurotrophin expression in human microglial cells.* J Neurochem, 1998. **70**: p. 699-707.
- 144. Chan, A., et al., *Phagocytosis of apoptotic inflammatory cells by microglia and its therapeutic implications: termination of CNS autoimmune inflammation and modulation by interferon-beta.* Glia, 2003. **43**: p. 231-242.
- Magnus, T., et al., Microglial phagocytosis of apoptotic inflammatory T cells leads to down-regulation of microglial immune activation. J Immunol, 2001.
 167: p. 5004-5010.
- 146. Rotshenker, S., *Microglia and macrophage activation and the regulationof complement-receptor-3 (CR3/MAC-1)-mediated myelin phagocytosis in injury and disease.* J Mol Neurosci, 2003. **21**(1): p. 65-72.
- 147. Polazzi, E. and A. Contestabile, *Reciprocal interactions between microglia and neurons: from survival to neuropathology.* Rev Neurosci, 2002. **13**: p. 221-242.
- 148. Streit, W.J., *Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS.* Glia, 2002. **40**: p. 133-139.
- 149. Peiser, L., S. Mukhopadhyay, and S. Gordon, *Scavenger receptors in innate immunity.* Curr Opin Immunol, 2002. **14**(1): p. 123-128.
- 150. Mukhopadhyay, S. and S. Gordon, *The role of scavenger receptors in pathogen recognition and innate immunity.* Immunobiology, 2004. **209**(1-2): p. 39-49.
- 151. Alarcon, R., et al., *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, 2005. **280**(34): p. 30406-15.
- 152. Husemann, J., et al., *Scavenger receptors in neurobiology and neuropathology: their role on microglia and other cells of the nervous system.* Glia, 2002. **40**(2): p. 195-205.
- 153. Matsushita, M. and T. Fujita, *The lectin pathway.* Res Immunol, 1996. **147**(2): p. 115-8.

- 154. Fujita, T., *Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity.* Nat Rev Immunol, 2002. **2**(5): p. 346-53.
- 155. Fujita, T., Y. Endo, and M. Nonaka, *Primitive complement system-recognition and activation.* Mol Immunol, 2004. **41**(2-3): p. 103-11.
- 156. Jauneau, A.C., et al., *Complement component anaphylatoxins upregulate chemokine expression by human astrocytes.* FEBS Lett, 2003. **537**(1-3): p. 17-22.
- Rus, H., et al., Complement activation in autoimmune demyelination: dual role in neuroinflammation and neuroprotection. J Neuroimmunol, 2006. 180(1-2): p. 9-16.
- 158. Ramaglia, V., M.R. Daha, and F. Baas, *The complement system in the peripheral nerve: friend or foe?* Mol Immunol, 2008. **45**(15): p. 3865-77.
- 159. Gasque, P., *Complement: a unique innate immune sensor for danger signals.* Mol Immunol, 2004. **41**(11): p. 1089-98.
- 160. D.Webster, S., et al., *Structural and functional evidence for microglial expression of C1qRP, the C1q receptor that enhances phagocytosis.* Journal of Leukocyte Biology, 2000. **Volume 67**: p. 109-116.
- 161. Kielian, T., *Microglia and chemokines in infectious diseases of the nervous system: views and reviews.* Front Biosci, 2004. **9**: p. 732-50.
- 162. Ponomarev, E.D., *CD40 Expression by Microglial Cells Is Required for Their Completion of a Two-Step Activation Process during Central Nervous System Autoimmune Inflammation.* The Journal of Immunology, 2006. **176**: p. 1402-1410.
- Walker, P.R., et al., *The brain parenchyma is permissive for full antitumor CTL effector function, even in the absence of CD4 T cells.* J Immunol, 2000. 165(6): p. 3128-35.
- 164. Fischer, H.G., et al., *Differenciation driven by granulocyte-macrophage colonystimulating factor endows microglia with interferon-gamma-independant antigen presentation function.* J Neuroimmunol, 1993. **42**(1): p. 87-95.
- 165. Re, F., et al., *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces an expression program in neonatal microglia that primes them for antigen presentation.* J Immunol, 2002. **169**(5): p. 2264-73.
- 166. Napoli, I. and H. Neumann, *Protective effects of microglia in multiple sclerosis*. Exp Neurol, 2010. **225**(1): p. 24-8.
- 167. Hyson, J.M., Leech therapy: a history. J Hist Dent, 2005. 53: p. 25-7.
- 168. Singh, A.P., *Medicinal leech therapy (hirudotherapy): a brief overview.* Complement Ther Clin Pract, 2010. **16**(4): p. 213-5.
- 169. Hildebrandt, J.P. and S. Lemke, *Small bite, large impact-saliva and salivary molecules in the medicinal leech, Hirudo medicinalis.* Naturwissenschaften, 2011. **98**(12): p. 995-1008.
- 170. Michalsen, A., et al., *Effectiveness of leech therapy in Osteoarthritis of the Knee. A Randomized, Controlled Trial.* Ann Intern Med, 2003. **139**: p. 724-730.
- 171. Ernst, E., *Born to suck The return of the leech?* Editorial/Pain, 2008. **137**: p. 235-236.
- 172. Andereya, S., et al., *Assessment of leech therapy for knee ostheoarthritis. A randomized study.* Acta Orthopaedica, 2008. **79**(2): p. 235-243.
- 173. Sonetti, D., et al., *Microglia in invertebrate ganglia.* Neurobiology Proc. Nadl. Acad. Sci. USA 1994. **Vol. 91**: p. 9180-9184.

- 174. Balavoine, G. and A. Adoutte, *The Segmented Urbilateria: A Testable Scenario.* INTEGR. COMP. BIOL., 2003. **43**: p. 137–147.
- 175. Raible, F., et al., Vertebrate-Type Intron-Rich Genes in the Marine Annelid Platynereis dumerilii. 2005.
- 176. Muller, K.J. and S. Carbonetto, *The morphological and physiological properties of a regenerating synapse in the C.N.S. of the leech.* J Comp Neurol, 1979. **185**(3): p. 485-516.
- 177. Chiquet, M. and S.E. Acklin, *Attachment to Con A or extracellular matrix initiates rapid sprouting by cultured leech neurons.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986. **83**: p. 6188-6192.
- Henderson, L.P., et al., Structural and functional analysis of synaptic transmission between identified leech neurons in culture. J. Physiol., 1983.
 340: p. 347-358.
- 179. Masuda-Nakagawa, L., K. Beck, and M. Chiquet, *Identification of molecules in leech extracellular matrix that promote neurite outgrowth.* Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1988. **235**(1280): p. 247-57.
- 180. Kumar, S.M., et al., Nerve Injury Induces a Rapid Efflux of Nitric Oxide (NO) Detected with a Novel NO Microsensor. The Journal of Neuroscience, 2001.
 21(1): p. 215–220.
- 181. Chen, A., et al., *Nitric oxide influences injury-induced microglial migration and accumulation in the leech CNS.* J Neurosci, 2000. **20**(3): p. 1036-43.
- 182. Kumar, S.M., et al., *Nerve injury induces a rapid efflux of nitric oxide (NO) detected with a novel NO microsensor.* J Neurosci, 2001. **21**(1): p. 215-20.
- Haase, A. and G. Bicker, *Nitric oxide and cyclic nucleotides are regulators of neuronal migration in an insect embryo.* Development, 2003. **130**(17): p. 3977-3987.
- 184. Moroz, L.L., D. Chen, et al., *Nitric oxide synthase activity in the molluscan CNS.* J Neurochem, 1996. **66**(2): p. 873-876.
- Sengupta, R., R. Sahoo, and e. al., *Characterization of Drosophila nitric oxide synthase: a biochemical study.* Biochem Biophys Res Commun, 2003. **306**(2): p. 590-597.
- 186. Peruzzi, E. and D. Sonetti, *Microglia proliferation as a response to activation in the freshwater snail Planorbarius corneus: a BrdU incorporation study.* Acta Biol Hung, 2004. **55**(1-4): p. 287-291.
- Center, D.M. and W.W. Cruikshank, Modulation of lymphocyte migration by human lymphokines. I. Identification and characterization of chemoattractant activity for lymphocytes from mitogen-stimulated mononuclear cells. J Immunol, 1982. 128: p. 2563-8.
- 188. Cruikshank, W.W. and D.M. Center, *Modulation of lymphocyte migration by human lymphokines. II. Purification of a lymphotactic factor (LCF).* The Journal of Immunology, 1982. **128**: p. 2569-2574.
- 189. Cruikshank, W.W., et al., *Lymphokine activation of T4+ T lymphocytes and monocytes.* J Immunol, 1987. **138**: p. 3817-23.
- 190. Zhang, Y., et al., *Processing and activation of pro-interleukin-16 by caspase-3.* J Biol Chem, 1998. **273**: p. 1144-9.
- 191. Cruikshank, W.W., et al., *Lymphocyte chemoattractant factor induces CD4dependent intracytoplasmic signaling in lymphocytes.* J Immunol, 1991. **146**: p. 2928-34.
- 192. Cruikshank, W.W., H. Kornfeld, and D.M. Center, *Interleukin-16.* J Leukoc Biol, 2000. **67**: p. 757-66.

- 193. Keane, J., et al., *Conservation of Structure and Function Between Human and Murine IL-16.* The Journal of Immunology, 1998. **160**: p. 5945–5954.
- 194. Liu, Y., et al., *Identification of a CD4 Domain Required for Interleukin-16 Binding and Lymphocyte Activation.* The Journal of Biological Chemistry, 1999. Vol. 274, No. 33: p. 23387–23395.
- 195. Nicoll, J., et al., *Identification of Domains in IL-16 Critical for Biological Activity.* The Journal of Immunology, 1999. **163**: p. 1827-1832.
- 196. Cruikshank, W.W., et al., *Molecular and functionnal analyzes of a lymphocyte chemoattractant factor: Association of biologic function with CD4 expression.* Immunology Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994. **91**: p. 5109-5113.
- 197. Baier, M., et al., *HIV suppression by interleukin-16.* Nature, 1995. 378, 563.
- Idziorek, T., et al., Recombinant human IL-16 inhibits HIV-1 replication and protects against activation-induced cell death (AICD). Clin Exp Immunol, 1998.
 112: p. 84–91.
- 199. Viglianti, G.A., et al., *IL-16 anti-HIV-1 therapy.* Nat Med, 1997. 3.
- Sekigawa, I., et al., The possible role of interleukin-16 in the low incidence of HIV infection in patients with systemic lupus erythematosus. Lupus, 2000. 9: p. 155-6.
- 201. Kurschner, C. and Yusaki, M., *Neuronal Interleukin-16 (NIL-16): A Dual Function PDZ Domain Protein.* The Journal of Neuroscience, 1999.
- 202. Chupp, G.L., et al., *Tissue and T cell distribution of precursor and mature IL-16.* J Immunol, 1998. **161**: p. 3114-9.
- Wilson, K.C., et al., Binding of HTLV-1 tax oncoprotein to the precursor of interleukin-16, a T cell PDZ domain-containing protein. Virology, 2003. 306(1): p. 60-67.
- 204. Keane, J., et al., *Conservation of Structure and Function Between Human and Murine IL-16.* The Journal of Immunology, 1998. **160**: p. 5945–5954.
- 205. Bannert, N., et al., *PDZ Domain-mediated interaction of interleukin-16 precursor proteins with myosin phosphatase targeting subunits.* J Biol Chem, 2003. **278**(43): p. 42190-9.
- 206. Hofmann, F.e.a., *Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases.* Journal of Cell Science, 2000. **113**: p. 1671-1676.
- 207. Weick, J.P.e.a., Interactions with PDZ Proteins Are Required for L-Type Calcium Channels to Activate cAMP Response Element-Binding Protein-Dependent Gene Expression. The Journal of Neuroscience, 2003. 23(8): p. 3446–3456.
- 208. Kawano, Y., et al., *Phosphorylation of Myosin-binding Subunit (MBS) of Myosin Phosphatase by Rho-Kinase In Vivo.* The Journal of Cell Biology, 1999. **147**(5): p. 1023–1037.
- 209. Naisbitt, S., et al., Interaction of the Postsynaptic Density-95/Guanylate Kinase Domain-Associated Protein Complex with a Light Chain of Myosin-V and Dynein. The Journal of Neuroscience, 2000. **20**(12): p. 4524–4534.
- 210. Lei, S., et al., *Regulation of NMDA Receptor Activity by F-Actin and Myosin Light Chain Kinase.* The Journal of Neuroscience, 2001. **21**(21): p. 8464–8472.
- 211. Glass, W.G., et al., *Not-So-Sweet Sixteen: The Role of IL-16 in Infectious and Immune-Mediated Inflammatory Diseases.* JOURNAL OF INTERFERON & CYTOKINE RESEARCH, 2006. **26**: p. 511–520.

- 212. Biddison, W.E., et al., Chemokine and matrix metalloproteinase secretion by myelin proteolipid protein-specific CD8+ T cells: potential roles in inflammation. J Immunol, 1997. **158**: p. 3046-53.
- 213. Skundric, D.S., et al., *Production of IL-16 correlates with CD4+ Th1 inflammation and phosphorylation of axonal cytoskeleton in multiple sclerosis lesions.* J Neuroinflammation, 2006. **3**: p. 13.
- 214. Skundric, D.S., et al., *Increased levels of bioactive IL-16 correlate with disease activity during relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE).* J Autoimmun, 2005b. **25**(3): p. 206-14.
- 215. Skundric, D.S., et al., *Anti-IL-16 therapy reduces CD4+ T-cell infiltration and improves paralysis and histopathology of relapsing EAE.* J Neurosci Res, 2005a. **79**: p. 680-93.
- 216. Guo, L.-H., et al., *Expression of interleukin-16 by microglial cells in inflammatory, autoimmune, and degenerative lesions of the rat brain.* Journal of Neuroimmunology, 2004. **146**(1-2): p. 39-45.
- 217. Mueller, C.A., et al., Spinal cord injury-induced expression of the immuneregulatory chemokine interleukin-16 caused by activated microglia/ macrophages and CD8+ cells. J Neurosurg Spine, 2006. **4**: p. 233-40.
- 218. Pahan, K., et al., *Induction of Nitric-oxide Synthase and Activation of NF-κB by Interleukin-12 p40 in Microglial Cells.* J Biol Chem., 2001. **276**(11): p. 7899– 7905.
- 219. Jana, M. and K. Pahan, *IL-12 p40 homodimer, but not IL-12 p70, induces the expression of IL-16 in microglia and macrophages.* Mol Immunol, 2009. **46**(5): p. 773-83.
- 220. Nicholson-Weller, A. and L.B. Klickstein, *C1q-binding proteins and C1q receptors*. Current Opinion in Immunology, 1999. **11**: p. 42-46.
- 221. Carland, T.M. and L. Gerwick, *The C1q domain containing proteins: Where do they come from and what do they do?* Developmental and Comparative Immunology, 2010. **34**: p. 785-790.
- 222. ALVAREZ-DOMINGUEZ, C., E. CARRASCO-MARIN, and F.L. COBIAN, *Role of Complement Component Clq in Phagocytosis of Listeria monocytogenes by Murine Macrophage-Like Cell Lines.* Infection and Immunity, 1993. Vol. 61, No. 9: p. 3664-3672.
- 223. Teh, B.K., et al., C1q regulation of dendritic cell development from monocytes with distinct cytokine production and T cell stimulation. Mol Immunol, 2011. **48**(9-10): p. 1128-38.
- 224. Fraser, D.A., et al., C1q differentially modulates phagocytosis and cytokine responses during ingestion of apoptotic cells by human monocytes, macrophages, and dendritic cells. J Immunol, 2009. **183**(10): p. 6175-85.
- 225. Ghebrehiwet, B. and E.I. Peerschke, *cC1q-R* (*calreticulin*) and *gC1q-R/p33:* ubiquitously expressed multi-ligand binding cellular proteins involved in inflammation and infection. Mol Immunol, 2004. **41**(2-3): p. 173-83.
- 226. Leigh, L.E., et al., C1q-mediated chemotaxis by human neutrophils: involvement of gC1qR and G-protein signalling mechanisms. Biochem. J., 1998. **330**: p. 247-254.
- 227. Vegh, Z., et al., Chemotaxis of human monocyte-derived dendritic cells to complement component C1q is mediated by the receptors gC1qR and cC1qR. Mol Immunol, 2005. **43**(9): p. 1402-7.
- 228. Kuna, P., et al., *Human C1q induces eosinophil migration.* Clin Immunol Immunopathol, 1996. **81**(1): p. 48-54.

- Leigh, L.E., et al., C1q-mediated chemotaxis by human neutrophils: involvement of gClqR and G-protein signalling mechanisms. Biochem J, 1998.
 330 (Pt 1): p. 247-54.
- 230. Liu, S., et al., Complement C1q chemoattracts human dendritic cells and enhances migration of mature dendritic cells to CCL19 via activation of AKT and MAPK pathways. Mol Immunol, 2008. **46**(2): p. 242-9.
- 231. Lynch, N.J., et al., *Microglial activation and increased synthesis of complement component C1q precedes blood-brain barrier dysfunction in rats.* Mol Immunol, 2004. **40**(10): p. 709-16.
- 232. Farber, K., et al., *C1q, the recognition subcomponent of the classical pathway of complement, drives microglial activation.* J Neurosci Res, 2009. **87**(3): p. 644-52.
- 233. Mariani, M.M. and T. Kielian, *Microglia in Infectious Diseases of the Central Nervous System.* J Neuroimmune Pharmacol, 2009.
- 234. Stevens, B., et al., *The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination.* Cell, 2007. **131**(6): p. 1164-78.
- 235. Yuzaki, M., *Cbln and C1q family proteins: new transneuronal cytokines.* Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(11): p. 1698-705.
- 236. Tenner, A.J. and M.I. Fonseca, THE DOUBLE-EDGED FLOWER:ROLES OF COMPLEMENT PROTEIN C1q IN NEURODEGENERATIVE DISEASES.
- 237. Zhou, J., et al., *Complement* C3 and C4 expression in C1q sufficient and deficient mouse models of Alzheimer's disease. J Neurochem, 2008. **106**(5): p. 2080-92.
- 238. Fishelson, Z., G. Attali, and D. Mevorach, *Complement and apoptosis*. Mol Immunol, 2001. **38**(2-3): p. 207-19.
- 239. Nauta, A.J., et al., *Direct binding of C1q to apoptotic cells and cell blebs induces complement activation.* Eur J Immunol, 2002. **32**(6): p. 1726-36.
- 240. Trouw, L.A., A.M. Blom, and P. Gasque, *Role of complement and complement regulators in the removal of apoptotic cells.* Mol Immunol, 2008. **45**(5): p. 1199-207.
- 241. Rambach, G., R. Wurzner, and C. Speth, *Complement: an efficient sword of innate immunity.* Contrib Microbiol, 2008. **15**: p. 78-100.
- 242. Rogers, J., et al., *Microglia and inflammatory mechanisms in the clearance of amyloid beta peptide.* Glia, 2002. **40**(2): p. 260-9.
- 243. Webster, S.D., et al., *Structural and functional evidence for microglial expression of C1qRp, the C1q receptor that enhances phagocytosis.* J Leukoc Biol, 2000. **67**: p. 109-116.
- 244. Sim, R.B., et al., C1q binding and complement activation by prions and amyloids. Immunobiology, 2007. 212(4-5): p. 355-62.
- 245. Pekny, M., et al., *The role of astrocytes and complement system in neural plasticity.* Int Rev Neurobiol, 2007. **82**: p. 95-111.
- 246. Kishore, U., et al., *C1q and tumor necrosis factor superfamily: modularity and versatility.* Trends Immunol, 2004. **25**(10): p. 551-61.
- 247. Ghiran, I., *Expression and Function of C1q Receptors and C1q Binding Proteins at the Cell Surface.* Immunobiology, 2002. **205**(4-5): p. 407-420.
- 248. Tye, A.J., et al., *The Human gC1qR/p32 Gene, C1qBP Genomic organization and promoter analysis.* The Journal of Biological Chemistry, 2001. Vol. 276, No. 20: p. 17069-17075.
- 249. Joseph, K., et al., Identification of the zinc-dependent endothelial cell binding protein for high molecular weight kininogen and factor XII: Identity with the

receptor that binds to the globular "heads" of Clq (gClq-R). Immunology Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996. **Vol. 93**: p. 8552-8557.

- 250. Lim, B.L., et al., *The binding protein for globular heads of complement C1q, gC1qR. Functional expression and characterization as a novel vitronectin binding factor.* J Biol Chem, 1996. **271**(43): p. 26739-44.
- 251. Ghebrehiwet, B., et al., *Evidence That the Two C1q Binding Membrane Proteins, gC1q-R and cC1q-R, Associate to form a Complex.* The Journal of Immunology, 1997. **159**: p. 1429-1436.
- 252. Tastet, C., et al., *A versatile electrophoresis system for the analysis of highand low-molecular-weight proteins.* Electrophoresis, 2003. **24**(11): p. 1787-94.
- 253. Kohidai, L., *Method for determination of chemoattraction in Tetrahymena pyriformis.* Curr Microbiol, 1995. **30**(4): p. 251-3.
- 254. Suckau, D. and A. Resemann, *T3-sequencing: targeted characterization of the N- and C-termini of undigested proteins by mass spectrometry.* Anal Chem, 2003. **75**(21): p. 5817-24.
- 255. Keane, J., et al., *Conservation of structure and function between human and murine IL-16.* J Immunol, 1998. **160**(12): p. 5945-54.
- 256. Center, D.M., H. Kornfeld, and W.W. Cruikshank, *Interleukin 16 and its function as a CD4 ligand.* Immunol Today, 1996. **17**(10): p. 476-81.
- 257. Liu, Y., et al., *Identification of a CD4 domain required for interleukin-16 binding and lymphocyte activation.* J Biol Chem, 1999. **274**(33): p. 23387-95.
- 258. Jiang, J., et al., *Crystal structure of human p32, a doughnut-shaped acidic mitochondrial matrix protein.* Proc Natl Acad Sci USA, 1999. **96**(7): p. 3572-7.
- 259. Sonetti, D., et al., *Microglia in invertebrate ganglia.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(19): p. 9180-4.
- Duan, Y., et al., Repair and regeneration of functional synaptic connections: cellular and molecular interactions in the leech. Cell Mol Neurobiol, 2005.
 25(2): p. 441-50.
- 261. Kettenmann, H., et al., *Physiology of microglia.* Physiol Rev, 2011. **91**(2): p. 461-553.
- 262. Croq, F., et al., A homologous form of human interleukin 16 is implicated in microglia recruitment following nervous system injury in leech Hirudo medicinalis. Glia, 2010. **58**(14): p. 1649-62.
- 263. Mladinic, M., K.J. Muller, and J.G. Nicholls, *Central nervous system regeneration: from leech to opossum.* J Physiol, 2009. **587**(Pt 12): p. 2775-82.
- 264. Bellini, A., et al., Bronchial epithelial cells of patients with asthma release chemoattractant factors for T lymphocytes. J Allergy Clin Immunol, 1993. **92**(3): p. 412-24.
- 265. Lim, K.G., et al., *Human eosinophils elaborate the lymphocyte chemoattractants. IL-16 (lymphocyte chemoattractant factor) and RANTES.* J Immunol, 1996. **156**(7): p. 2566-70.
- 266. Laberge, S., et al., Secretion of IL-16 (lymphocyte chemoattractant factor) from serotonin-stimulated CD8+ T cells in vitro. J Immunol, 1996. **156**(1): p. 310-5.
- 267. Sciaky, D., et al., Cultured human fibroblasts express constitutive IL-16 mRNA: cytokine induction of active IL-16 protein synthesis through a caspase-3-dependent mechanism. J Immunol, 2000. **164**(7): p. 3806-14.
- 268. Sharma, V., J.L. Sparks, and J.D. Vail, *Human B-cell lines constitutively* express and secrete interleukin-16. Immunology, 2000. **99**(2): p. 266-71.

- 269. Guo, L.H., et al., *Expression of interleukin-16 by microglial cells in inflammatory, autoimmune, and degenerative lesions of the rat brain.* J Neuroimmunol, 2004. **146**(1-2): p. 39-45.
- 270. Liebrich, M., et al., *Expression of interleukin-16 by tumor-associated macrophages/activated microglia in high-grade astrocytic brain tumors.* Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2007. **55**(1): p. 41-7.
- 271. Schluesener, H.J., et al., *Leukocyte chemotactic factor, a natural ligand to CD4, is expressed by lymphocytes and microglial cells of the MS plaque.* J Neurosci Res, 1996. **44**(6): p. 606-11.
- 272. Schwab, J.M., et al., *IL-16 is differentially expressed in the developing human fetal brain by microglial cells in zones of neuropoesis.* Int J Dev Neurosci, 2001. **19**(1): p. 93-100.
- Zhang, Z.Y., et al., Expression of interleukin-16 in sciatic nerves, spinal roots and spinal cords of experimental autoimmune neuritis rats. Brain Pathol, 2009. 19(2): p. 205-13.
- 274. Zhao, M.L., Q. Si, and S.C. Lee, *IL-16 expression in lymphocytes and microglia in HIV-1 encephalitis.* Neuropathol Appl Neurobiol, 2004. **30**(3): p. 233-42.
- 275. Baier, M. and R. Kurth, *Interleukin-16 for the gene therapy of HIV infection*. Expert Opin Investig Drugs, 1997. **6**(12): p. 1879-81.
- 276. Zhang, Z., U. Fauser, and H.J. Schluesener, *Early attenuation of lesional interleukin-16 up-regulation by dexamethasone and FTY720 in experimental traumatic brain injury.* Neuropathol Appl Neurobiol, 2008. **34**(3): p. 330-9.
- 277. Center, D.M., H. Kornfeld, and W.W. Cruikshank, *Interleukin-16.* Int J Biochem Cell Biol, 1997. **29**(11): p. 1231-4.
- 278. Cruikshank, W.W., H. Kornfeld, and D.M. Center, *Interleukin-16.* J Leukoc Biol, 2000. **67**(6): p. 757-66.
- 279. Cho, M.L., et al., *IL-17 induces the production of IL-16 in rheumatoid arthritis.* Exp. Mol. Med, 2008. **40(2)**: p. 237-245.
- 280. Muhlhahn, P., et al., 1998, *Structure of interleukin 16 resembles a PDZ domain with an occluded peptide binding site.* nature structural biology, 1998. **volume 5 number 8**.
- Schwab, J.M., et al., *IL-16 is differentially expressed in the developing human fetal brain by microglial cells in zones of neuropoesis.* Int. J. Devl. Neuroscience (International Journal of Developmental Neuroscience) 2001. 19 p. 93–100.
- 282. Mittelbronn, M., et al., *Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude.* Acta Neuropathol 2001. **101**: p. 249–255.
- 283. Zhang, Y., et al., *Processing and activation of pro-interleukin-16 by caspase-3.* J Biol Chem, 1998. **273**(2): p. 1144-9.
- 284. Wilson, K.C., et al., *Regulation of nuclear Prointerleukin-16 and p27(Kip1) in primary human T lymphocytes.* Cell Immunol, 2005. **237**(1): p. 17-27.
- 285. Center, D.M., et al., *Interleukin 16: implications for CD4 functions and HIV-1 progression.* Immunol Today, 2000. **21**(6): p. 273-80.
- 286. Parada, N.A., et al., *Synergistic Activation of CD4+ T Cells by IL-16 and IL-2.* The Journal of Immunology, 1998. **160**: p. 2115-2120.
- 287. Cruikshank, W., et al., *Biological activity of interleukin-16.* Nature, 1996. **382**(6591): p. 501-2.

- 288. Parada, N.A., et al., *Synergistic activation of CD4+ T cells by IL-16 and IL-2.* J Immunol, 1998. **160**(5): p. 2115-20.
- 289. Theodore, A.C., et al., CD4 ligand IL-16 inhibits the mixed lymphocyte reaction. J Immunol, 1996. **157**(5): p. 1958-64.
- 290. Mathy, N.L., et al., *Interleukin-16 stimulates the expression and production of pro-inflammatory cytokines by human monocytes.* Immunology, 2000. **100**: p. 63-69.
- 291. Seytter, T., et al., *Mam33p, an oligomeric, acidic protein in the mitochondrial matrix of Saccharomyces cerevisiae is related to the human complement receptor gC1q-R.* Yeast, 1998. **14**(4): p. 303-10.
- 292. Lim, B.-L., et al., *The Binding Protein for Globular Heads of Complement C1q, gC1qR.* The Journal of Biological Chemistry, 1996. Vol. 271, No. 43: p. 26739-26744.
- 293. Hibino, T., et al., *The immune gene repertoire encoded in the purple sea urchin genome.* Dev Biol, 2006. **300**(1): p. 349-65.
- 294. Huang, S., et al., *Genomic analysis of the immune gene repertoire of amphioxus reveals extraordinary innate complexity and diversity.* Genome Res, 2008. **18**(7): p. 1112-26.
- 295. Gestal, C., et al., *MgC1q, a novel C1q-domain-containing protein involved in the immune response of Mytilus galloprovincialis.* Dev Comp Immunol, 2010.
- 296. Journeay, S. and B. Singh, *EMAPII antibody detects both proEMAP/p43 and mature EMAPII molecules.* Acta Neuropathol, 2007. **114**(4): p. 435.
- 297. Behrensdorf, H.A., M. van de Craen, et al., *The endothelial monocyteactivating polypeptide II (EMAPII) in a substrate for caspase 7.* FEBS Lett, 2000. **466**(1): p. 143-147.
- Liu, J. and M.A. Schwarz, Identification of protease-sensitive sites in Human Endothelial-Monocyte Activating Polypeptide II protein. Exp Cell Res, 2006.
 312(12): p. 2231-2237.
- 299. von Horssen, R., J.A. Rens, et al., *EMAPII facilitates TNF-R1 apoptotic signalling in endothelial cells and induces TRADD mobilization.* Apoptosis, 2006. **11**(12): p. 2137-2145.
- 300. Mueller, C.A., H.J. Schluesener, et al., Lesional expression of proinflammatory and antiangiogenic cytokine EMAPII confined to endothelium and microglia/macrophages during secondary damage following experimental traumatic brain injury. J Neuroimmunol, 2003. 135(1-2): p. 1-9.
- 301. Liao, Y., Z. Zhang, et al., *Lesional expression of EMAPII in macrophages/microglia following cerebral ischemia in rats.* Int J Neurosci, 2011. **121**(2): p. 58-64.
- 302. Brabeck, C., et al., *Expression of EMAPII by activated monocytes/microglia cells in different regions of rat hippocampus after trimethyltin-induced brain damage.* Exp Neurol 2002. **177**(1): p. 341-346.
- 303. Mueller, C.A., H.J. Schluesener, et al., *Spinal cord injury induces lesional expression of the proinflammatory and antiangiogenic cytokine EMAPII.* J Neurotrauma, 2003. **20**(10): p. 1007-1015.
- Bennett, J., et al., Blood-brain barrier disruption and enhanced vascular permeability in the multiple sclerosis model EAE. J Neuroimmunol, 2011. 229(1-2): p. 180-91.
- 305. Larochelle, C., J.I. Alvarez, and A. Prat, *How do immune cells overcome the blood-brain barrier in multiple sclerosis?* . FEBS Lett, 2011.

Modalités de recrutement des cellules microgliales dans le système nerveux central lésé chez la sangsue *Hirudo medicinalis*.

La sangsue médicinale possède la capacité à régénérer efficacement son SNC à la suite d'une lésion. Le premier phénomène conditionnant la réparation du système nerveux est le recrutement des cellules microgliales au niveau du site endommagé. Aussi, deux facteurs chimioattractants, *Hm*IL-16 et *Hm*C1q, homologues et analogues à l'IL-16 et au C1q humains, ont été identifiés dans le SNC de la sangsue.

Chez l'Homme, l'IL-16 est connue pour exercer une activité chimioattractante sur ces cellules cibles en se liant à son récepteur, le CD4. Or, nos premiers tests *in vitro* ont montré (i) que la cytokine humaine recrute les cellules microgliales de sangsue et (ii) que les cellules CD4+ humaines migrent en réponse à un gradient de *Hm*IL-16. L'ensemble de ces données suggère fortement la conservation d'une interaction fonctionnelle IL-16/CD4 dans le SNC de la sangsue. Afin de confirmer cette hypothèse, une stratégie de purification par affinité du récepteur de *Hm*IL-16 a été entreprise, suivie d'une caractérisation par spectrométrie de masse.

Le C1q humain recrute les cellules immunitaires en se liant à deux récepteurs, le gC1qR (alias C1qBP) et le cC1qR. Chez la sangsue, deux protéines, *Hm*C1qBP et *Hm*cC1qR, homologues aux get c-C1qR humains, ont été caractérisées dans le système nerveux. Afin de démontrer l'implication de ces récepteurs dans le recrutement microglial induit par *Hm*C1q, des expériences d'hybridation *in situ*, d'immunohistochimie et de chimiotactisme ont été réalisées. Enfin, une stratégie de purification par affinité, réalisée en utilisant le C1q humain, a permis de montrer son interaction avec les deux récepteurs.

Le travail de thèse consiste à étudier les interactions moléculaires impliquées dans les processus de recrutement des cellules microgliales, intervenant à la suite d'une lésion du système nerveux de la sangsue. Les données acquises permettent de saisir les premiers mécanismes de la réponse microgliale, essentielle dans la réparation du SNC chez la sangsue *H. medicinalis*.

The recruitment properties of the microglial cells in injured central nervous system of the leech *Hirudo medicinalis*.

The leech, *Hirudo medicinalis*, has the capacity to regenerate its CNS following injury. After damage, the microglial cells migrate and accumulate at the lesion site, and this phenomenon is essential for the CNS repair. Moreover, two chemoattractant factors, *Hm*IL-16 and *Hm*C1q, which are mammalian IL-16 and C1q homologous, were identified in the leech CNS.

In vertebrates, the IL-16 active form can recruit CD4+ T cells and macrophages. The CD4 receptor is the natural ligand of the cytokine. Interestingly, our first chemotaxis assays showed that (i) human IL-16 active form recruits leech microglial cells (ii) *Hm*IL-16 can exert a chemotactic activity on human CD4+ T cells. Taken together, the *in vitro* assays suggest the conservation of functional IL-16/CD4 interaction in leech. To confirm this hypothesis, the affinity purification using *Hm*IL-16 demonstrated the interaction with a CD4-related protein in leech CNS.

The human C1q recruits the immune cells via an interaction with two different receptors named gC1qR (or C1qBP) and cC1qR. In the leech CNS, two proteins present a high degree of homology with these human C1q receptors. So, they were called *Hm*C1qBP and *Hm*cC1qR. In order to demonstrate the *Hm*C1qBP and *Hm*cC1qR implications in the leech microglial cells *Hm*C1q-mediated recruitment, some in vitro chemotaxis assays were carried out. These analyses were combined and completed with different fluorescence *in situ* hybridization and immunohistochemistry experiments performed on crushed nerve cords. Finally, using the human C1q, *Hm*C1qBP and *Hm*cC1qR were purified by affinity.

The presented work specifies the molecular processes which are involved in the microglial recruitment following lesions in the leech CNS. The data could help to understand the early phase of this response leading to a complete and functional CNS repair in the leech.

Mots-Clés: Sangsue *H. medicinalis*, Système nerveux central, Cellules microgliales, Facteurs chimioattractants (*Hm*IL-16, *Hm*C1q), Interactions moléculaires, Réparation nerveuse.

Laboratoire de Spectrométrie de Masse Biologique Fondamentale et Appliquée Equipe "Cellules microgliales et Réparation neuronale" EA4550, IFR 147, Bâtiment SN3 Université de Lille 1 59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France