

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE
U.F.R DE BIOLOGIE**

Année 2007

N° ordre : 4143

THESE

**Présentée en vue de l'obtention du grade de
DOCTEUR EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**



**MISE EN EVIDENCE DE MOLECULES IMPLIQUEES
DANS LA REPONSE IMMUNITAIRE INNEE DU SYSTEME
NERVEUX CENTRAL DE LA SANGSUE MEDICINALE
*HIRUDO MEDICINALIS***

PAR

DAVID SCHIKORSKI

Présentée le 18 décembre 2007 devant la commission d'examen :

PRESIDENT :	Mr le Professeur Matthias LEIPPE
DIRECTEURS DE THESE :	Mr le Professeur Michel SALZET Mme le Docteur Aurélie TASIEMSKI
RAPPORTEURS :	Mr le Professeur François LALLIER Mr le Docteur Yannick GUEGUEN

*À mes parents,
Merci pour vos encouragements.*

A Sophie,

*Merci pour ton soutien
durant ces longues années.*

Remerciements

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers les personnes qui ont contribué à l'aboutissement de cette thèse.

En premier lieu, je voudrais particulièrement remercier les deux personnes qui m'ont permis d'accomplir cette thèse, le professeur Michel Salzet et le Docteur Aurélie Tasiemski.

Michel, pour m'avoir accueilli au sein de ton laboratoire, pour m'avoir accordé ta confiance, pour tes conseils, tes encouragements, pour m'avoir donné l'opportunité de faire des vacances, mais également pour le reste ... je te remercie de tout cœur.

Aurélie, je ne te remercierai jamais assez de m'avoir encadré, guidé, encouragé, et pour m'avoir appris tant de choses durant ces trois dernières années. Merci pour ta rigueur scientifique et pour ta gentillesse.

Je remercie également Monsieur le Professeur François Lallier et Monsieur le Docteur Yannick Gueguen, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de consacrer une partie de leur temps à la lecture ainsi qu'à la critique de ce manuscrit. Veuillez accepter, Messieurs, ma profonde gratitude.

Professor Matthias Leippe, your acceptance to evaluate my work and to be chair of this jury is a great honour for me. Be sure of my sincere thanks.

Je tiens également à remercier Annie, Céline, Christelle et Mathilde. Merci beaucoup les filles pour votre aide de chaque jours ... Si ma gratitude devait s'exprimer en kilos de chocolat, je vous en devrais encore des tonnes ... Je remercie également Brigitte, l'exceptionnelle gestionnaire du laboratoire.

Je voudrais aussi remercier l'ensemble des enseignants chercheurs du laboratoire. Vous ne m'avez jamais refusé votre aide ni vos conseils : Isabelle, Françoise, Christophe, Pierre Eric et Jacopo, merci à vous.

Je tiens tout particulièrement à remercier Virginie. Merci à toi pour ton aide scientifique et ta bonne humeur. C'est une joie de travailler avec toi.

Merci également aux personnes extérieures au laboratoire qui m'ont un jour ou l'autre apporté leur aide ou leurs conseils. Christophe, Claude, Patricia, Christian, Loïc, Gilles ... et les nombreux autres qui j'espère se reconnaîtront....

Pour terminer, j'ai tout de même une petite pensée pour les centaines de petites sangsues qui ont donné de leur « chaîne nerveuse » durant cette thèse. Où que vous soyez ... merci les bêtes !

SOMMAIRE

SOMMAIRE

INTRODUCTION	8
---------------------	----------

GENERALITES	13
--------------------	-----------

LA SANGSUE MEDICINALE : HIRUDO MEDICINALIS

1 CLASSIFICATION	17
-------------------------	-----------

2 ECOLOGIE	17
-------------------	-----------

3 ANATOMIE	19
-------------------	-----------

3.1 APPAREIL DIGESTIF	19
3.2 APPAREIL EXCRETEUR	21
3.3 APPAREILS RESPIRATOIRE ET CIRCULATOIRE	21
3.4 APPAREIL REPRODUCTEUR	21
3.5 SYSTEME NERVEUX	21
3.5.1 STRUCTURE GENERALE	21
3.5.2 ORGANISATION DES GANGLIONS	23

IMMUNITE INNEE DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL DES VERTEBRES

1 LA BARRIERE HEMATOENCEPHALIQUE	26
---	-----------

2 LES EFFECTEURS CELLULAIRES	30
-------------------------------------	-----------

2.1 LES CELLULES ENDOTHELIALES CEREBROVASCULAIRES	30
2.2 LES CELLULES MACROPHAGIQUES PERIVASCULAIRES	30
2.3 LES CELLULES GLIALES	32
2.3.1 LES ASTROCYTES	32
2.3.2 LES CELLULES MICROGLIALES	33
2.3.2.1 Les cellules microgliales amiboïdes	34
2.3.2.2 Les cellules microgliales ramifiées	36

3 LES EFFECTEURS MOLECULAIRES	40
--------------------------------------	-----------

3.1 LES RECEPTEURS DE RECONNAISSANCE DES PAMPS	40
3.1.1 LES COLLECTINES	41
3.1.2 LE COMPLEMENT	41
3.1.3 LE RECEPTEUR AU MANNOSE	43
3.1.4 LES RECEPTEURS SCAVENGER	43
3.1.5 LE RECEPTEUR DECTIN-1	44
3.1.6 LE RECEPTEUR CD14 ET LA LBP	45

3.1.7	LES TOLL-LIKE RECEPTEURS (TLRs)	46
3.1.7.1	Généralités	46
3.1.7.2	Les TLRs au sein du SNC	50
3.1.8	LES NOD-LIKE RECEPTEURS (NLRs)	52
3.2	LES MEDiateURS DE LA REponse IMMunitaire DU SNC	55
3.2.1	LES PEPTIDES ANTIBACTERIENS	55
3.2.2	LES CYTOKINES ET CHEMOKINES	57
3.2.3	LES DERIVES DU MONOXYDE D'AZOTE	64

IMMUNITE DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL DES INVERTEBRES

1	<u>LES EFFECTEURS CELLULAIRES</u>	66
2	<u>LES EFFECTEURS MOLECULAIRES</u>	69
2.1	LES RECEPTEURS	69
2.2	LES CYTOKINES	70
2.3	LES DERIVES DU MONOXYDE D'AZOTE	72
2.4	LES MOLECULES ANTIBACTERIENNES	73

CHAPITRE I **75**

PUBLICATION 1 : Utilisation de la sangsue médicinale en tant que modèle d'étude de la réponse antimicrobienne effectuée au sein du SNC.

CHAPITRE II **110**

PUBLICATION 2 : Caractérisation et implication de la cytokine proinflammatoire *Hm-EMAPII* dans la protection et la réparation du SNC de la sangsue médicinale *Hirudo medicinalis*.

DISCUSSION & PERSPECTIVES **140**

CONCLUSION **155**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **160**

PUBLICATIONS & COMMUNICATIONS **194**

Liste des Figures

<i>Figure 1 : Photographie d'une sangsue Hirudo medicinalis à l'état adulte</i>	18
<i>Figure 2 : Arbre phylogénique des métazoaires</i>	18
<i>Figure 3 : Schématique du système digestif de la sangsue médicinale Hirudo medicinalis</i>	20
<i>Figure 4 : Coupe transversale de la sangsue Hirudo medicinalis</i>	20
<i>Figure 5 : Anatomie de la chaîne nerveuse de la sangsue médicinale</i>	22
<i>Figure 6 : Photographie d'un ganglion de la sangsue Hirudo medicinalis</i>	25
<i>Figure 7 : La barrière hématoencéphalique</i>	27
<i>Figure 8 : Les différentes morphologies des cellules microgliales</i>	35
<i>Figure 9 : Schéma général d'activation des cellules microgliales</i>	39
<i>Figure 10 : Les différentes voies de signalisation des TLRs chez les vertébrés</i>	48
<i>Figure 11 : Cascade d'activation de NOD1 et NOD2</i>	54
<i>Figure 12 : Rôles bénéfiques des cytokines proinflammatoires au cours de la réponse immunitaire innée du SNC des vertébrés</i>	58
<i>Figure 13: Maturation du complexe P43/EMAP II chez les vertébrés</i>	149

Liste des Tableaux

<i>Tableau 1: Expression des molécules membranaires des cellules microgliales amiboïdes et ramifiées</i>	35
<i>Tableau 2 : Activateurs conventionnels et endogènes des cellules microgliales ramifiées en culture ainsi que leurs principaux effets</i>	37
<i>Tableau 3 : Les principaux ligands connus des Toll-like récepteurs chez la souris</i>	49
<i>Tableau 4 : Récepteurs de chimiokines exprimés par les cellules microgliales en réponse à un stimulus infectieux</i>	59
<i>Tableau 5 : Chimiokines produites par les cellules microgliales en réponse à un stimulus infectieux</i>	59
<i>Tableau 6 : Fonctions biologiques et propriétés de la cytokine EMAP-II et de son précurseur, la protéine P43</i>	62
<i>Tableau 7 : Activité antibactérienne de différentes chimiokine.</i>	63

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le système nerveux central (SNC) des vertébrés a longtemps été considéré comme un organe dépourvu de système immunitaire du fait de l'absence d'irrigation par des vaisseaux lymphatiques et de la présence de la barrière hématoencéphalique (BHE) (Male et al., 1987 ; Traugott et Lebon, 1988). Cependant, durant les deux dernières décennies, de nombreuses études ont montré que le cerveau des vertébrés avait développé ses propres systèmes de défense (Nguyen, 2002 ; Rivest, 2003).

La mise en place d'une réponse immunitaire au niveau du SNC des vertébrés repose sur des mécanismes classiques impliquant des molécules de reconnaissances, des effecteurs cellulaires et des effecteurs moléculaires, que nous présenterons dans la première partie de ce manuscrit intitulée « généralités ». L'activation de ces divers effecteurs entraîne la mise en place d'une réponse immunitaire présentant des effets à la fois bénéfiques en protégeant les neurones et délétères en favorisant la neurodégénérescence du SNC qui, chez les vertébrés, possède des capacités de restauration limitées (Wyss-Coray et Mucke, 2002). Les événements à l'origine de l'un ou l'autre de ces effets restent pour l'instant inconnus et difficiles à appréhender du fait de la complexité du SNC des mammifères. Une approche alternative est donc d'utiliser des modèles invertébrés possédant une organisation nerveuse simple, et partageant avec les vertébrés les mêmes mécanismes fondamentaux (Clarac et Edouard Pearlstein, 2007).

Dans ce contexte, une thématique de recherche visant à comprendre les mécanismes et les effecteurs de l'immunité innée du SNC de la sangsue *Hirudo medicinalis* a été développée au sein du Laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides. La sangsue médicinale, grâce à l'organisation et à l'accessibilité particulièrement favorable de son SNC, constitue un modèle privilégié en neurobiologie.

Notre attention a particulièrement été retenue sur les capacités de régénération à la fois morphologique et fonctionnelle du SNC de la sangsue, suite à une lésion importante (von Bernhardt, 1995). Cette régénération se produit quelles qu'en soient les conditions d'asepsie. Cela suggère une capacité intrinsèque du SNC de la sangsue à monter une réponse anti-infectieuse efficace qui contrairement à celle des vertébrés, n'engendrerait pas d'effets néfastes puisqu'elle n'entrave pas la mise en place du processus de régénération.

Au démarrage de cette thèse, comme nous le verrons dans la seconde partie des « généralités », peu de données nous renseignaient sur la réponse immunitaire du SNC des annélides et des invertébrés en général. L'objectif principal de mon travail de recherche fut donc d'identifier de nouvelles molécules impliquées dans la réponse immunitaire développée au sein du SNC de la sangsue médicinale et d'étudier leur rôle quant à la protection et à la réparation de celui-ci. L'existence de peptides antimicrobiens ayant préalablement été démontrée au niveau périphérique de l'animal, nous avons recherché la présence de telles molécules au sein même du SNC de notre modèle. En parallèle, nous avons également recherché, dans les banques d'EST de système nerveux de sangsue, des molécules présentant des homologies avec les cytokines impliquées dans la réaction immunitaire innée du SNC des vertébrés.

Dans ce manuscrit, nous présenterons les publications soumises ou en voie de soumission qui regroupent les résultats obtenus au cours de ce travail de thèse. La première publication, exposée dans le premier chapitre, est consacrée à la caractérisation de deux nouveaux peptides antibactériens exprimés au sein du SNC de la sangsue, la neuromacine et l'*Hm-lumbricine*. La seconde publication, présentée dans le second chapitre, relate la caractérisation et le rôle fonctionnel, chez notre modèle, d'une molécule homologue à celle présente chez des vertébrés, la cytokine proinflammatoire *Hm-EMAPII*. Des expériences *in vitro* et *ex vivo* ont permis d'analyser le rôle joué par ces différentes molécules lors d'une infection ou d'une lésion du SNC.

Dans chacun de ces chapitres, les résultats obtenus seront d'abord présentés sommairement puis discutés et les champs d'investigations ouverts par ces travaux seront donnés dans une partie intitulée « discussion et perspectives ». Enfin, une conclusion générale viendra éclairer les principaux aboutissements de cette thèse.

GENERALITES

LA SANGSUE MEDICINALE: *HIRUDO MEDICINALIS*

1 CLASSIFICATION

La sangsue médicinale *Hirudo medicinalis* appartient à l'embranchement des Annélides (Figure 1). D'un point de vu phylogénique, les Annélides sont des Eumétazoaires caractérisés par une symétrie bilatérale (Bilatériens) (Figure 2). Lors de leur développement embryonnaire, le blastopore de la gastrula est à l'origine de la bouche et de l'anus. La bouche est donc formée primitivement. Leur SNC est organisé autour d'un ganglion céphalique et d'une chaîne nerveuse ventrale (Protostomiens). Le développement embryonnaire est dit indirect car il passe par une larve nageuse ciliée (qui a disparue chez les sangsues) appelée larve trocophore (Lophotrochozoaires - Eutrochozoaires). La segmentation de l'œuf est spirale (Spiralien). Enfin ils présentent un corps métamérisé et sont les seuls protostomiens à posséder un système circulatoire clos.

La sangsue médicinale, de la classe des Achètes, présente un nombre constant de 33 métamères dépourvus de soies chitineuses plus un prostomium. Ce dernier est modifié en une ventouse qui entoure la bouche munie de 3 mâchoires denticulées (Ordre des Gnathobdellidés = Hirudinées). Parmi les 650 espèces de sangsues recensées, la sangsue médicinale *Hirudo medicinalis* est la mieux étudiée, est a été choisie comme modèle d'étude au sein du laboratoire.

2 ECOLOGIE

La sangsue médicinale est un annélide aquatique d'eau douce affectionnant plutôt les mares et les étangs, à fond vaseux et riches en matière organique. La sangsue médicinale est un ectoparasite temporaire hématophage se nourrissant du sang de poissons, d'amphibiens, de reptiles ou de mammifères (Sawyer, 1986). Elle se fixe sur l'animal à l'aide de sa ventouse péribuccale, incise la peau avec ses mâchoires et aspire jusqu'à huit fois son poids en sang tout en injectant dans la plaie des anticoagulants et des endorphines. La ventouse postérieure, plus grande, sert uniquement à la fixation. Le sang ingéré subit ensuite des changements très lents, notamment par la lyse progressive des érythrocytes faisant intervenir deux mécanismes successifs, l'hémolyse et la protéolyse. La digestion du repas de sang est rendue possible dans



Figure 1 : Photographie d'une sangsue *Hirudo medicinalis* à l'état adulte.

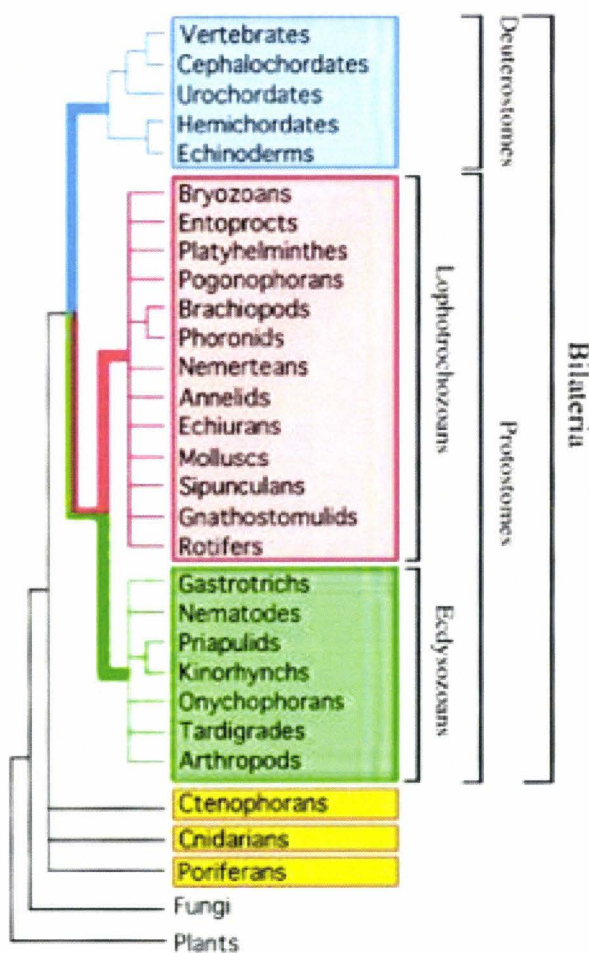


Figure 2 : Arbre phylogénique des métazoaires (d'après Adoutte et al., 2000).

le tube digestif par la bactérie *Aeromonas hydrophila*. Ses repas de sang sont espacés, en effet les sangsues supportent aisément un jeûne de 6 à 8 mois.

Dans le milieu naturel, les sangsues sont alertées de la présence d'une proie potentielle par les vibrations de l'eau et/ou la température du futur hôte lorsqu'il s'agit de vertébrés à sang chaud. Dans l'eau, elle se déplace en nageant en effectuant des mouvements ondulatoires ou en se fixant sur le substrat à l'aide de ses ventouses. Sur terre, elle progresse en fixant la ventouse postérieure puis en allongeant le corps pour fixer la ventouse antérieure. Détachant ensuite le disque arrière et se contractant sur leur point d'appui, elle rapproche toute la partie postérieure du corps vers la ventouse antérieure. La sangsue médicinale est hermaphrodite protandre. A l'approche de la ponte, la sangsue présente un renflement dans la partie antérieure du corps accompagné d'une coloration de la zone, d'une teinte allant du vert au jaune. La reproduction débute au printemps et se termine à la fin de l'automne. La ponte se produit en général 1 mois après la fécondation et a lieu sur terre; la sangsue libère un cocon, capsule ovoïde d'une consistance variable, et dans lequel les œufs fécondés sont déposés. La taille du cocon, 2 à 3 cm de longueur sur 1 à 1,5 cm de largeur, est fonction de la taille de la sangsue pondeuse. Le cocon est rempli d'un liquide nutritif permettant l'alimentation des jeunes sangsues avant leur sortie dans le milieu extérieur. Au bout d'un minimum de 3 semaines, les jeunes perforent une extrémité du cocon et gagnent l'eau le plus rapidement possible.

3 ANATOMIE

3.1 Appareil digestif

La sangsue possède un appareil digestif assez développé (Figure 3). Il est composé de 4 parties : la bouche s'ouvrant au fond de la ventouse antérieure est munie de 3 mâchoires, formant un Y renversé et portant de très nombreuses dents assurant l'incision ; le pharynx, doté de muscles puissants, permettant la succion et la déglutition du sang ; l'estomac assurant le stockage du sang en quantité très importante ; l'intestin moyen constituant la zone digestive active et l'intestin postérieur court se terminant par l'anus. Le tube digestif est entouré de muscles longitudinaux et circulaires facilitant le transit. Les sangsues, qui se nourrissent de sang, sécrètent une substance empêchant la coagulation.

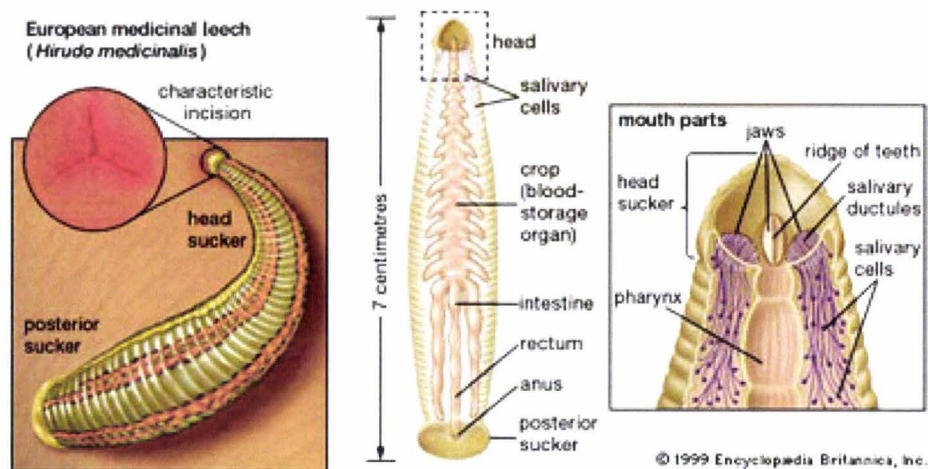


Figure 3 : Représentation schématique du système digestif de la sangsue médicinale *Hirudo medicinalis*.

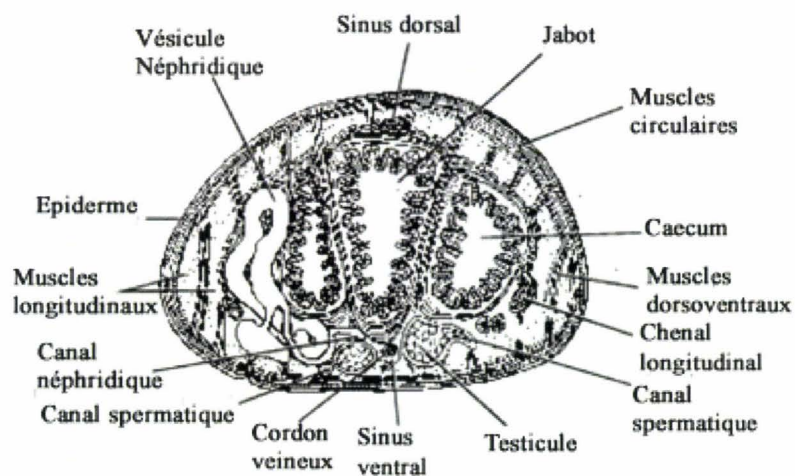


Figure 4 : Coupe transversale de la sangsue *Hirudo medicinalis*.

3.2 Appareil excréteur

L'appareil excréteur est composé de 17 paires de néphridies à cheval sur deux métamères, et s'ouvrant au niveau du tégument par des néphridiopores. Ces métanéphridies sont constituées par des groupes de cellules spécialisées, les solénocytes, qui émettent un flagelle dans le canal excréteur. Ces canaux sont en relation avec les conduits génitaux.

3.3 Appareils respiratoire et circulatoire

La sangsue possède un système circulatoire clos composé de deux vaisseaux principaux, le sinus dorsal et le sinus ventral (Figure 4). Des capillaires péri-intestinaux permettent l'absorption des nutriments et leurs distributions dans le corps. Son appareil respiratoire n'est pas différencié. La respiration est cutanée et se fait par diffusion à travers du tégument gardé en permanence humide grâce au mucus. Elle possède des pigments respiratoires (hémoglobine) extracellulaires.

3.4 Appareil reproducteur

L'appareil reproducteur mâle est formé de 9 paires de testicules, des spermiductes et d'un pénis permettant la libération des spermatozoïdes. L'appareil femelle comprend 2 ovaires, des oviductes, un utérus et un vagin. Au niveau du tégument ventral de la sangsue, un pore mâle (entre le 24ème et le 25ème anneau) et un pore femelle (entre le 29ème et 30ème) sont visibles.

3.5 Système nerveux

3.5.1 Structure générale

C'est au début du XIXème siècle que les premières études ont porté sur le système nerveux de la sangsue médicinale (Ehrenberg, 1836 ; Retzius, 1891), permettant ainsi à la sangsue d'être l'un des premiers modèles en neurobiologie. Depuis, de nombreuses études ont abouti à une connaissance très précise de sa structure, schématisée sur la figure 5.

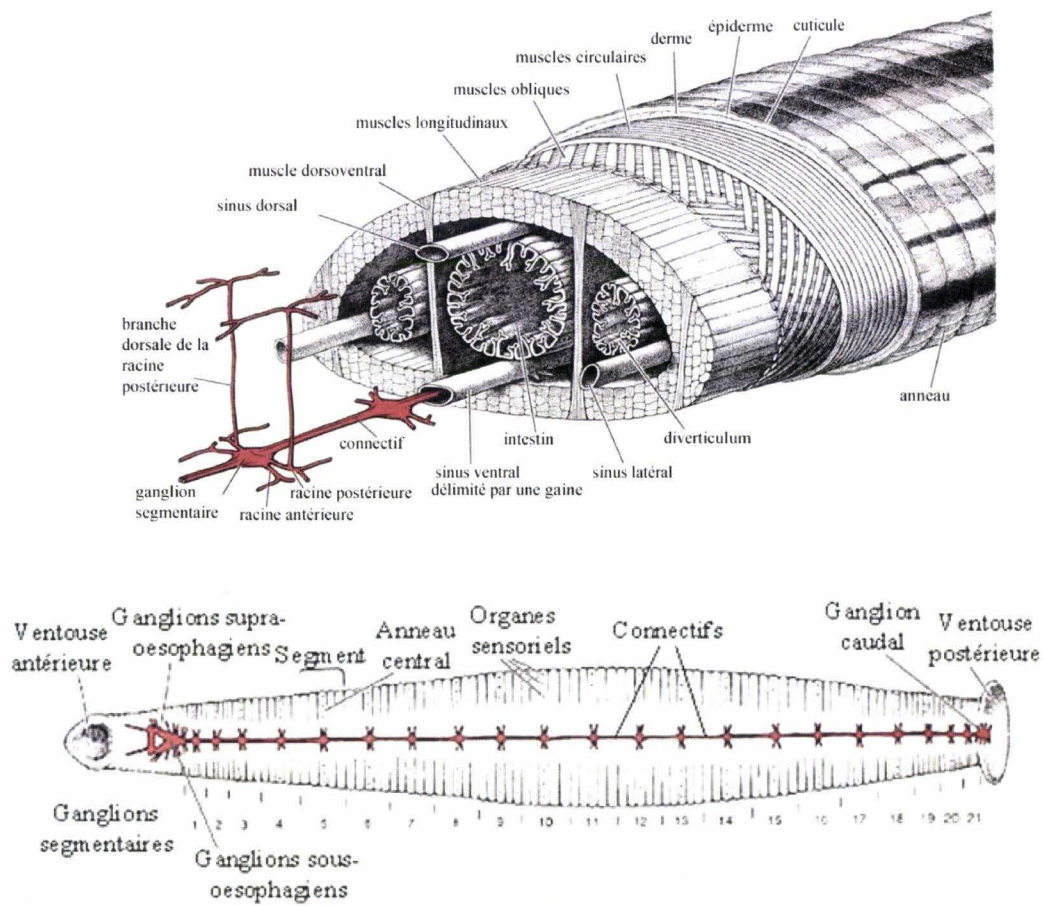


Figure 5 : Anatomie de la chaîne nerveuse de la sangsue médicinale (en rouge) (d'après Kuffer et Nicholls, 1976).

Le système nerveux central d'*Hirudo medicinalis* est segmenté. Il est composé d'une chaîne de ganglions reliés entre eux par une paire de nerfs bilatéraux (les connectifs) et d'un petit nerf médian simple (le nerf de Faivre), et à la périphérie par deux paires de nerfs bilatéraux. Chaque métamère est ainsi innervé par un ganglion. La chaîne nerveuse est ventrale et enfermée dans un sinus sanguin. Quatre ganglions innervent la partie antérieure de l'animal. Ces ganglions sont fusionnés en deux masses. Les ganglions supra-œsophagiens ont un rôle limité, excepté dans la neurosécrétion (Sawyer, 1986), tandis que les ganglions sous-œsophagiens jouent un rôle sensoriel important par l'innervation de la ventouse antérieure et des trois mâchoires (Sawyer, 1986). Ces deux masses sont reliées entre elles et forment un collier nerveux péri-œsophagien. Un ganglion segmentaire innerve chaque métamère du corps de l'animal. Sept ganglions fusionnés forment un ganglion caudal volumineux innervant principalement la ventouse postérieure de la sangsue. L'ensemble de la chaîne nerveuse est couvert par une capsule fibreuse contenant, au niveau des connectifs, des fibres musculaires contractiles.

3.5.2 Organisation des ganglions

L'architecture neuronale des ganglions segmentaires de la sangsue médicinale a très bien été caractérisée. Les ganglions contiennent environ 400 corps cellulaires neuronaux répartis sous forme de paires bilatérales, excepté les ganglions 5 et 6 associés aux systèmes reproducteurs qui en contiennent environ 700 (Macagno, 1980). La majorité des neurones sont organisés dans un modèle réitéré dans chacun des ganglions segmentaires. Seuls 5 à 8% d'entre eux seraient dépareillés (Macagno 1980 ; Sawyer 1986). Les neurones de sangsue sont relativement grands (μm 10-60), et peuvent être identifiés sous une loupe binoculaire.

Le ganglion est divisé en 6 paquets de cellules (follicules), séparés par des septas, contenant les neurones sensoriels et moteurs ainsi que des interneurones. Chaque follicule est enveloppé par une cellule gliale (cellule gliale des paquets). Deux autres cellules gliales sont présentes dans le neuropile (cellules gliales géantes ou neuropile glia). La plupart des raccords synaptiques sont formés dans un neuropile central. Une cellule gliale supplémentaire est associée à chaque connectif (cellules gliales des connectifs). De nombreuses cellules microgliales sont disséminées au sein du neuropile et du neuvrilème. En plus des connectifs inter-ganglionnaires, deux nerfs segmentaires en communication avec le système nerveux périphérique de l'animal partent de chaque côté des ganglions.

Une cartographie détaillée des neurones ganglionnaires a été réalisée (Figure 6). Le rôle fonctionnel de certains d'entre eux a également été déterminé (Nicholls and Baylor, 1968). Ainsi, les neurones possédant des corps cellulaires de plus grande taille sont associés aux activités sensorielles. Ce sont les neurones nommés T-cells (toucher), P-cells (pression) et les N-cells (nociception). D'autres neurones sont quant à eux associés à des fonctions telles que la nage, la circulation sanguine ou encore l'activité sexuelle de l'animal.

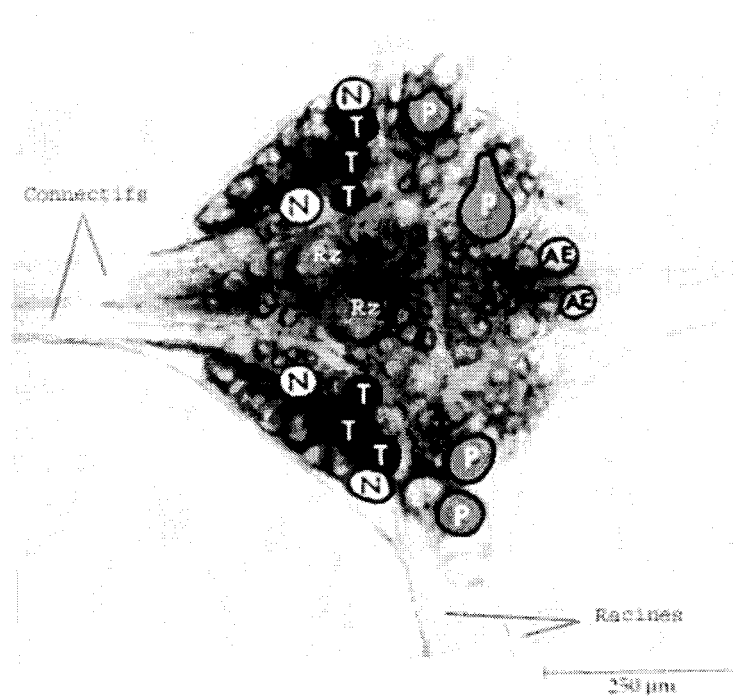


Figure 6 : Photographie d'un ganglion de la sangsue *Hirudo medicinalis*. Les différents neurones assurant les perceptions sensorielles sont représentés par leur lettre respective (N = neurones nocicepteurs, T= neurones sensibles au toucher et P = neurones sensibles à la pression). Au centre sont visibles les cellules de Retzius (Rz).

IMMUNITE INNEE DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL DES VERTEBRES

Au cours de ce chapitre, nous passerons en revue les principaux acteurs cellulaires et moléculaires impliqués dans la défense immunitaire innée du SNC des vertébrés suite à la pénétration de divers micro-organismes au travers de la barrière hématoencéphalique.

1 LA BARRIERE HEMATOENCEPHALIQUE

Le cerveau est isolé du reste de l'organisme par des interfaces séparant le sang du cerveau. Cette notion d'isolement a été décrite pour la première fois par Ehrlich, microbiologiste allemand, en 1885 (Ehrlich, 1885). La barrière hématoencéphalique (BHE) est une barrière physique essentielle pour l'équilibre homéostatique du SNC et pour sa protection contre une éventuelle invasion bactérienne systémique. Elle isole ainsi le SNC du reste de l'organisme et lui permet d'avoir un milieu spécifique. En effet, le cerveau est un organe fragile et les neurones nécessitent un environnement extracellulaire stable pour assurer leurs fonctions. Il existe donc des mécanismes de régulation contrôlant les échanges entre le sang, le liquide céphalo-rachidien et le tissu cérébral (Poirier, 1976).

Cette barrière se compose de plusieurs couches de cellules endothéliales cérébrovasculaires (Figure 7), présentant des jonctions serrées, entourées par une membrane basale épaisse composée de collagène de type IV, de laminines, de protéoglycanes et de fibronectines (Prat et al., 2001). Les jonctions serrées des cellules endothéliales empêchent tout transfert de molécules circulantes, obligeant celles-ci à utiliser les canaux et les pompes cellulaires, ce qui limite ainsi toute invasion par les micro-organismes étrangers. Les cellules endothéliales cérébrovasculaires sont également accompagnées d'astrocytes, de péricytes et de macrophages périvasculaires qui entourent étroitement les vaisseaux sanguins.

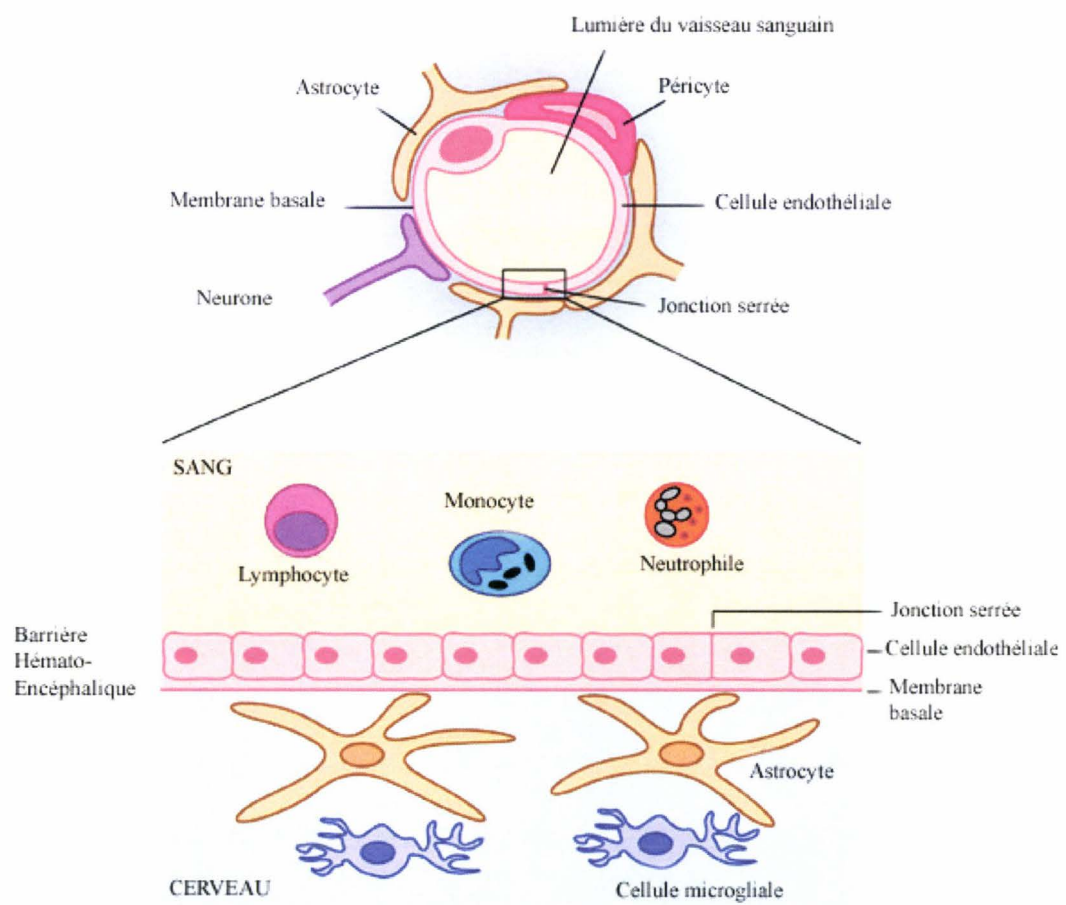


Figure 7 : Représentation schématique des différents constituants de la barrière hématoencéphalique.

Les astrocytes sont des cellules gliales étoilées présentes dans le SNC. Ils forment un réseau tridimensionnel qui a un rôle dans le soutien et le maintien des structures cérébrales. Les astrocytes sont des constituants de la BHE de par leurs pieds vasculaires recouvrant la quasi-totalité de la surface des capillaires en contact avec le SNC. Ils limitent ainsi les échanges entre le domaine vasculaire et le domaine glial. Ils participent également au développement et à l'entretien de la BHE. En effet, il a été montré qu'*in vitro*, les cellules endothéliales cérébrovasculaires perdaient leurs capacités de barrière en l'absence d'astrocytes. La présence des astrocytes augmenterait le nombre et la complexité des jonctions formées entre les cellules endothéliales cérébrovasculaires (Tao-Cheng, 1987 ; Abbruscato et Davies, 1999). Les facteurs diffusibles connus pour être produits par des astrocytes, tel le TGF β (*Transforming Growth Factor beta-1*), le FGF (*Fibroblast Growth Factor*) ou encore le GDNF (*Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor*), peuvent favoriser quelques dispositions de la BHE (Abbott, 2002). Cependant les mécanismes complets par lesquels les astrocytes commandent l'étanchéité endothéliale restent en grande partie inconnus.

La BHE est également composée de péricytes. Ce sont des cellules mésenchymateuses contractiles peu différenciées et en association avec la paroi des vaisseaux sanguins. Le rôle précis de ces cellules dans la BHE est encore mal connu (Guillemin et Brew, 2004). Cependant, ces cellules participeraient au maintien et à l'entretien des vaisseaux sanguins notamment par leur rôle dans la sécrétion de la membrane basale (Ramsauer, 2002). Suite à un dommage ou à une infection du SNC, les péricytes peuvent évoluer et acquérir certaines fonctions macrophagiques, telles que la phagocytose ou l'expression de molécules du CMH (*Complexe Majeur d'Histoincompatibilité*) de type II (Guillemin et Brew, 2004 ; Angelov et al., 1998 ; Kida, 1993).

L'endothélium de la BHE entoure la quasi-totalité du SNC (Pachter et al., 2003). Il est cependant interrompu au niveau de certaines régions du cerveau que sont les organes circumventriculaires (CVOs), les plexus choroïdes et les leptoméniges. Dans ces régions, l'endothélium vasculaire est fenestré, ce qui permet la diffusion de macromolécules et le passage de cellules immunitaires périphériques. Cet endothélium est entouré de cellules épithéliales produisant le liquide céphalorachidien. Cependant, bien que ces cellules épithéliales soient également liées entre elles par des jonctions serrées, elles offrent une plus faible résistance à l'infiltration des micro-organismes que l'endothélium de la BHE (Levine, 1987).

Une infiltration du SNC par les micro-organismes étrangers va donc s'amorcer principalement à partir des régions non protégées par la BHE et va s'étendre progressivement à l'ensemble du cerveau lors d'une infection systémique. La réponse immunitaire innée du SNC va alors s'enclencher et engendrer une inflammation du parenchyme nerveux passant par une importante production de cytokines proinflammatoires (l'IL-6, le TNF α , l'IL-1 α , l'IL-1 β et l'IFN γ) (de Vries et al., 1996 ; Deli et al., 1995 ; Gloor et al., 1997 ; Huynh et al., 1993). Cependant, ces dernières peuvent engendrer un relâchement des jonctions serrées. La perméabilité de la BHE sera donc augmentée, ce qui peut alors favoriser le passage des éléments pathogènes (Banks et al., 1993).

La réponse immunitaire innée du SNC possède donc des effets contradictoires. La production de différentes cytokines dont le rôle principal est d'assurer la protection du SNC peut également favoriser l'entrée des micro-organismes en ayant un effet néfaste sur la BHE (Begolka et al., 1998 ; Sato et al., 1997). De même, l'induction de NO (monoxyde d'azote) lors de la réaction inflammatoire peut également altérer l'intégrité de la BHE, et ce, d'une manière dose-dépendante (Jaworowicz et al., 1998 ; Buster et al., 1995 ; Giovannoni et al., 1998).

Certaines bactéries pathogènes peuvent cependant pénétrer le SNC en passant au travers de la BHE saine, et ce sans l'altérer, par des phénomènes d'interactions puis de transcytose avec les cellules endothéliales cérébrovasculaires (Stins et al., 2001). Ainsi certaines bactéries, telles que *Escherichia coli* ou encore *Streptococcus pneumoniae* sont capables de passer de la circulation sanguine au SNC en respectant cette intégrité (Ring et al., 1998 ; Stins et al., 2001). Le succès de la transcytose n'est cependant pas garanti pour les bactéries internalisées car les vésicules d'endocytose peuvent fusionner avec les lysosomes, contenant des lysozymes tels que les cathepsines, permettant la destruction des bactéries pathogènes. De plus, les astrocytes et les cellules endothéliales cérébrovasculaires pourraient produire des peptides antibiotiques (cf. paragraphe suivant) qui lutteraient contre l'infiltration des micro-organismes pathogènes (Bergman et al., 2005; Hao et al., 2001).

2 LES EFFECTEURS CELLULAIRES

La défense immunitaire innée du SNC des vertébrés va être assurée par les types cellulaires présents *in situ*. Cependant, bien que les neurones soient le type cellulaire le plus important du système nerveux, ils ne sont pas connus pour participer activement à cette réponse immunitaire. En effet, celle-ci sera principalement réalisée par les cellules gliales (cellules microgliales et astrocytes), les cellules endothéliales, les macrophages périvasculaires, mais également par des cellules du système immunitaire périphérique qui, dans certaines conditions, peuvent traverser la BHE et infiltrer le SNC. Dans cette partie, nous ne nous intéresserons qu'aux effecteurs cellulaires locaux.

2.1 Les cellules endothéliales cérébrovasculaires

Les cellules endothéliales cérébrovasculaires, comme nous l'avons vu précédemment, sont des constituants de la BHE. Elles sont donc en première ligne au contact des éléments pathogènes lors d'une infection systémique. Lors de stimulations bactériennes ou virales, il a été rapporté que ces cellules produisaient des molécules proinflammatoires telles que l'IL-1 β , l'IL-6, l'IFN γ ou encore le TNF α (Hofman et al., 1994 ; Vadeboncoeur et al., 2003). Ces cellules peuvent donc induire l'inflammation du SNC. En conditions normales, les cellules endothéliales cérébrovasculaires expriment constitutivement les NO synthases endothéliales (eNOS). Lors de certaines pathologies, elles surexpriment ces eNOS et entraînent une importante synthèse de NO visant à combattre les micro-organismes mais pouvant également engendrer une altération de la BHE (Kim et al., 2000).

2.2 Les cellules macrophagiques périvasculaires

Les cellules macrophagiques du SNC sont représentées par une population hétérogène comprenant les macrophages périvasculaires que sont les cellules de Mato, les cellules de Kolmer, et les cellules dendritiques. Toutefois, la principale population macrophagique du SNC est représentée par les cellules microgliales, que nous présenterons en détail dans un paragraphe suivant.

Les cellules de Mato (Mato et al., 1986) représentent une minorité cellulaire au sein du SNC. Elles sont localisées dans un dédoublement de la lame basale des capillaires cérébraux.

Ces cellules ont la particularité d'exprimer constitutivement les molécules du CMH II et de façon inductible des molécules de co-stimulation et d'activation leur donnant la capacité de présenter efficacement l'antigène en situation inflammatoire. Ces cellules sont douées à l'état basal d'une grande capacité de phagocytose vis-à-vis de particules et d'antigènes contenus dans le liquide interstitiel du parenchyme nerveux.

Les cellules de Kolmer, ou cellules épiplexuelles, sont des cellules phagocytaires présentes au niveau des CVOs et des plexus choroïdes. Ces cellules luttent contre l'infiltration des microbes pathogènes. Les cellules de Kolmer expriment des composants du complexe CMH II et sont capables de recruter des lymphocytes-T, par la synthèse de diverses chimiokines, et de leur présenter des antigènes.

Les cellules dendritiques, qui sont les cellules présentatrices d'antigènes par excellence, sont localisées stratégiquement à l'extérieur du parenchyme nerveux aux points d'entrée potentiels des micro-organismes, c'est-à-dire au niveau des méninges et des plexus choroïdes (McMenamin, 1999). Une partie de ces cellules présente des caractéristiques morphologiques, phénotypiques et fonctionnelles de cellules dendritiques matures suggérant que la présentation d'antigène puisse avoir lieu au sein même du SNC.

A l'état physiologique, un faible nombre de leucocytes périphériques (lymphocytes T et monocytes/macrophages) passent la BHE et pénètrent dans le parenchyme cérébral afin d'effectuer une fonction de surveillance (Hickey, 1999). Ces cellules seront positionnées de façon stratégique au niveau des plexus choroïdes et des méninges. Les macrophages périphériques ayant pris place dans le SNC sain adoptent une forme ramifiée à l'état quiescent (Constam et al., 1992). Dans le SNC sain, les fonctions immunitaires innées des macrophages sont inhibées par la synthèse de la cytokine antiinflammatoire TGF- β (Peress et al., 1996 ; Constam et al., 1992) et de MCSF (Macrophage Colony Stimulating Factor) produits par les astrocytes (Liu et al., 1994). Néanmoins, les éléments étrangers infiltrant le SNC seront rapidement reconnus et phagocytés par ces cellules macrophagiques.

2.3 Les cellules gliales

Le tissu cérébral est constitué par l'association de neurones, de cellules cérébrovasculaires et de cellules dites " gliales ". Trois types cellulaires sont regroupés sous cette appellation : les oligodendrocytes, les astrocytes et les cellules microgliales. Ces deux derniers types cellulaires sont impliqués dans la défense immunitaire innée du SNC.

2.3.1 *Les astrocytes*

L'astrocyte tire son nom de sa forme étoilée : d'une petite masse cytoplasmique partent des prolongements diversements ramifiés qui, au contact des autres cellules, s'élargissent en pied astrocytaire. Ils forment un réseau tridimensionnel entre les neurones, véritable support structural du tissu nerveux. Les astrocytes représentent le type de cellules gliales le plus abondant du système nerveux. Ces cellules ont une origine neuroectodermique et sont essentielles à l'homéostasie et aux fonctions neuronales du SNC (Dong et Benveniste, 2001). Les astrocytes sont un constituant essentiel de la BHE de par leur capacité à limiter la pénétration de cellules immunitaires périphériques dans le parenchyme cérébral (Bechmann et al., 2007). En effet, ces dernières, si elles sont en surnombre dans le SNC, entraînent une réaction inflammatoire importante pouvant être néfaste pour les tissus nerveux.

Dans quasiment tous les types d'altération du SNC, les astrocytes subissent des changements caractéristiques. Cette activation est appelée l'astrogliose (Pekny et al., 2005). Les astrocytes deviennent hypertrophiques et surexpriment le GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) qui est une protéine intermédiaire de filament qui va favoriser le maintien de leur force mécanique. Elles forment également la majeure partie cellulaire de la cicatrice gliale. Après inflammation du SNC, les astrocytes acquièrent des fonctions proinflammatoires favorisant la réponse immunitaire. Ces astrocytes peuvent reconnaître une grande variété de structures moléculaires conservées sur la surface des micro-organismes, les PAMPs (pour *Pathogen-Associated Molecular Pattern*). En effet, ils expriment une grande variété de récepteurs immunitaires que sont les PRRs (*Pattern Recognition Receptors*), en grande partie représentés par les TLRs (*Toll-like Receptors*) (Bsibsi et al., 2002 ; Bowman et al., 2003 ; Carpentier et al., 2005). Lorsque les astrocytes sont stimulés par différents ligands des TLRs ou par certaines cytokines telles que l'IL-12 ou le TNF α , les astrocytes peuvent produire fortement les iNOS et eNOS (Edwards et al., 2000 ; Esen et al., 2004). En présence de

différents motifs bactériens, tel que des lipopolysaccharides (ou LPS, composé majoritaire de la paroi des bactéries à Gram négatif), ou viraux, tel que l'acide polycytidylique (ou polyI:C, un polymère synthétique mimant l'ARN viral), les astrocytes peuvent induire la production de nombreuses cytokines telles que l'IL-1 β , l'IL-6 ou encore le TNF α (Carpentier et al., 2005 ; Edwards et al., 2000 ; Bowman et al., 2003; Farina et al., 2005). Ils peuvent également produire d'importantes quantités d'interféron (IFN), une glycoprotéine limitant la réplication virale dans les cellules (Carpentier et al., 2005 ; Farina et al., 2005).

Cependant, les astrocytes ont également un rôle régulateur lors de la réponse inflammatoire. Ils peuvent notamment détecter la présence de cytokines proinflammatoires. Lorsque celles-ci sont trop importantes, les astrocytes peuvent alors produire en contre partie certaines cytokines antiinflammatoires telles que le TGF β ou l'IL-10 (Pousset et al., 2000). Ces deux cytokines induisent une diminution de la production de NO et inhiber l'expression de cytokines proinflammatoires par les différents types cellulaires du SNC (Bechmann et al., 2007). Ceci va favoriser le maintien d'un environnement antiinflammatoire au sein du SNC visant à préserver l'intégrité de la BHE afin de limiter l'infiltration des cellules immunitaires périphériques (leucocytes). Des expériences réalisées *in vitro* ont également montré que des astrocytes non stimulés peuvent inhiber la prolifération de lymphocytes T (Trajkovic et al., 2004 ; Gimsa et al., 2004). Ce résultat suggère donc que ces cellules puissent exercer cette même capacité au sein même du SNC.

2.3.2 Les cellules microgliales

Dans le système nerveux central (CNS), les cellules microgliales composent la principale population phagocytaire mononucléaire résidente du CNS, constituant selon la région entre 10 et 15 % de la population cellulaire non neuronale du cerveau (Lawson, 1992 ; Streit, 1999). Elles jouent un rôle dans le maintien de l'intégrité et de l'homéostasie du SNC et représentent la voie effectrice de l'immunité innée dans le parenchyme cérébral (Aloisi, 2001 ; Hanisch, 2002). En conditions normales, ces cellules sont sous forme quiescentes ou « ramifiées » et deviennent « activées » en cas de lésion ou d'infection par des micro-organismes. Elles possèdent plusieurs caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles communes avec les macrophages (Castellano et al., 1991 ; Streit and Kreutzberg, 1987 ; Hutchins et al., 1990 ; Acarin et al., 1994 ; Austyn et Gordon, 1981 ; Perry et al., 1985). Pour ces raisons, elles ont été proposées comme première ligne de défense du SNC en cas d'invasion par des micro-organismes pathogènes (Kreutzberg, 1996 ; Kielan, 2004).

2.3.2.1 Les cellules microgliales amiboïdes

Les cellules microgliales peuvent adopter différentes morphologies selon leur état fonctionnel et développemental. Au cours du développement, les cellules progénitrices migrent vers le SNC et se différencient en cellules microgliales « amiboïdes », de par leur morphologie aplatie présentant quelques pseudopodes (Dalmau, 1997). C'est une population passagère présente du stade prénatal jusqu'au début du stade post-natal. Elles migrent vers le SNC sur de plus ou moins longues distances en fonction de leur origine. Une fois arrivées à destination et au stade adulte, une grande majorité de ces cellules subissent un changement morphologique pour donner des cellules « ramifiées primitives » évoluant elles-mêmes en cellules microgliales « ramifiées », possédant un petit corps cellulaire ovale (de 5 à 10 μM) avec un grand noyau, un cytoplasme réduit et de nombreuses et longues ramifications (Kaur et al., 1985 ; Dalmau, 2003). Les différentes formes de cellules microgliales sont schématiquement présentées dans la Figure 8. Les cellules microgliales amiboïdes ne sont présentes dans le tissu nerveux que pendant la période du développement mais elles peuvent réapparaître chez l'adulte dans divers contextes pathologiques.

L'expression de plusieurs antigènes de surface est modifiée lors de la différenciation des cellules microgliales « amiboïdes » en cellules microgliales « ramifiées » (tableau 1). Remarquablement, l'activité de phagocytose des cellules microgliales amiboïdes est supérieure à celle des cellules microgliales ramifiées. Ainsi l'expression des récepteurs spécifiques de la phagocytose, comme le CR3 ou le CD 64 (*cluster of differentiation*), est régulée négativement lors du passage des cellules microgliales de l'état amiboïde à ramifié. Cela peut en partie s'expliquer par le fait que les cellules microgliales amiboïdes jouent un rôle important dans le développement du cerveau en participant activement à l'élimination des neurones dégénérés.

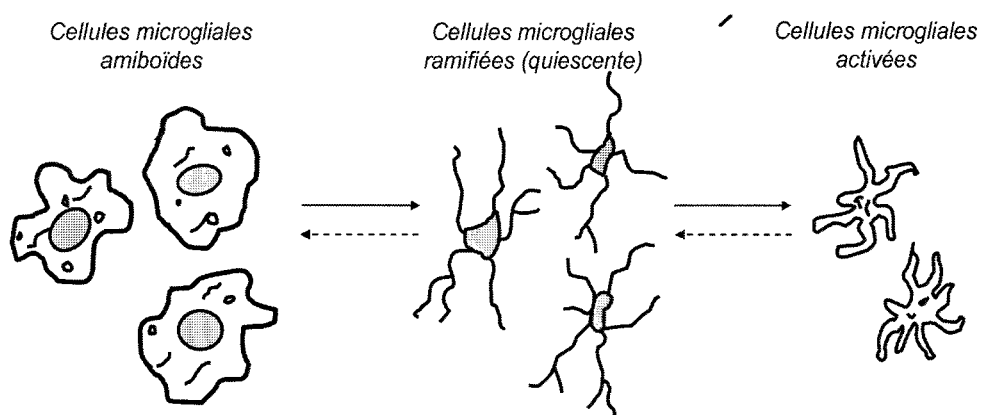


Figure 8 : Les différentes morphologies des cellules microgliales dans le cerveau (d'après Davies, 1994).

Tableau 1: Expression des molécules membranaires des cellules microgliales amiboïdes et ramifiées.

Ag de surface/récepteur	Cellules microgliales amiboïdes	Cellules microgliales ramifiées	Références
CR3	+++	+	<i>Ling et al., 1990</i>
CMH I	+++	+/-	<i>Ling et al., 1991</i>
CMH II	+/-	+/-	<i>Ling et al, 1991</i>
CD45	+++	+	<i>Ling et al, 1991</i> <i>Sedgwick et al, 1991</i>
CD64	+	+/-	<i>Rezaie et al, 1997</i> <i>Ulvestad et al, 1994</i>
CD68	+	-	<i>Rezaie et al, 1997</i>
ED1	+	-	<i>Milligan et al, 1991</i>

+++ : expression forte ; + : expression moyenne ; +/- : expression faible ; - : expression nulle

2.3.2.2 Les cellules microgliales ramifiées

Contrairement aux cellules microgliales amiboïdes qui sont mobiles et prolifératives, les cellules microgliales « ramifiées » sont immobiles et quasi-quiescentes (Lawson et al., 1992). L'une des propriétés les plus remarquables des cellules microgliales ramifiées est qu'elles réagissent à des stimuli variés pour devenir « activées ». Elles se dirigeront alors vers la lésion, proliféreront et participeront à la réparation des tissus tout en induisant des réactions immunitaires protectrices (Davis et al., 1994).

Les cellules microgliales activées sont des macrophages totalement actifs et ont un rôle très important dans la réponse immunitaire innée du SNC. La forme « activée » apparaît comme une cellule ramifiée, gonflée, caractérisée par un grand corps cellulaire avec des pseudopodes plus courts et larges (figure 8). Ce changement morphologique peut toutefois être variable selon le type du dommage ou d'infection (Finsen, 1993 ; Morioka, 1991 ; Streit 1999). Les cellules microgliales activées peuvent proliférer (Lawson et al., 1992). Chez des rats atteints d'une ischémie cérébrale, la population de ces cellules voit son nombre multiplié par sept (Kato, 2003). Certaines molécules, comme les facteurs de prolifération GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor) et M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor), les interleukines IL-1 et IL-3, ou encore le TNF α (Tumor Necrosis Factor- α), peuvent induire la prolifération de ces cellules (Sawada et al., 1990 ; Suzumura et al., 1990 ; Ganter et al., 1992 ; Lee et al., 1994). In vitro, les cellules microgliales peuvent être activées quand elles sont exposées à des virus, des parasites, des bactéries à Gram négatif ou à Gram positif, (Tableau 2). En effet, elles possèdent plusieurs types de récepteurs capables d'identifier les PAMPs des micro-organismes, tels que les TLRs (cf. paragraphe suivant).

Les cellules microgliales activées participent à l'induction de la neuroinflammation par la production de médiateurs proinflammatoires (cytokines, NO), à la phagocytose des éléments étrangers et des cellules neuronales apoptotiques ou endommagées, et à la régulation de la réponse des lymphocytes-T par la présentation d'antigènes (Streit, 1999 ; Aloisi, 2001 ; Hanish, 2002). Les cellules microgliales sont probablement les meilleures présentatrices d'antigènes de toutes les cellules composant la glie. En fonction du type de stimulation, les cellules microgliales produisent différents types de molécules qui auront divers effets biologiques (Tableau 2).

Tableau 2 : Activateurs conventionnels et endogènes des cellules microgliales ramifiées en culture ainsi que leurs principaux effets.

Activateurs	Effet ou production	Références
LPS	TNF α , IL-1 β , IL-6, iNOS/NO, MIP-1 α , BDNF, NGF	<i>Nakamura et al., 1999</i> <i>Neumann et al., 1998</i>
IFN γ	Augmentation expression du CD40, Augmentation production de NO et de TNF α induite par le LPS, et d'O ₂ induite par le PMA.	<i>Tan et al., 1999</i>
LPS/IFN γ	Apoptose des cellules microgliales convoyée par l'interaction Fas/FasL.	<i>Badie et al. 2000</i>
PMA	Apoptose des cellules	<i>Lee et al., 2001</i>
ATP	Microgliales ; O ₂ ⁻ ; iNOS/NO, TNF α , IL-1 β , IL-6.	<i>Hide et al., 2000</i> <i>Sanz et al., 2000</i>
Ganglioside	NO, TNF α .	<i>Pyo et al., 1999</i>
Thrombine	NO, TNF α , IL-6, IL-12, Mobilisation des ions calcium, prolifération.	<i>Moller et al., 2000</i> <i>Ryu et al., 2000</i>
Albumine	Production d'O ₂ induite par le PMA.	<i>Si et al., 2000</i>
Ions manganoux	iNOS/NO induite par le LPS.	<i>Chang et al., 1999.</i>
Ions potassium (fortes concentrations)	Production de NO et de TNF α induite par le LPS.	<i>Chang et al., 2000.</i>
GM-CSF	Prolifération	<i>Liva et al., 1999</i>
Endothéline	Augmentation des ions calcium intracellulaires	<i>McLarnon et al., 1999</i>
<i>Platelet-activating factor</i>	Augmentation des ions calcium intracellulaires	<i>Wang et al., 1999</i>

Cependant, il est important de préciser que les cellules microgliales activées ne présentent pas uniquement des effets bénéfiques (Aloisi, 2001). En effet, de par leurs propriétés immuno-régulatrices et leur capacité à synthétiser des molécules pouvant s'avérer toxiques, tel que le NO (cf. paragraphe suivant), les cellules microgliales activées peuvent contribuer à endommager le SNC (Yrjanheikki, 1998). Il est donc important de contrôler le degré et la durée de cette inflammation. Une activation microgliale excessive ou chronique des cellules microgliales est impliquée dans un certain nombre de maladies neurodégénératives, telles que les maladies d'Alzheimer et de Parkinson (Teismann et Schulz 2004 ; McGeer et McGeer 2004 ; Blasko et al., 2004).

Toutefois, l'activation des cellules microgliales peut être contrecarrée par la synthèse de facteurs de croissance comme le NGF, le BDNF ou la NT-3 (Neumann et al., 1998). Les prostaglandines inhibent la production de cytokines proinflammatoires, telles que l'IL-1 β et le TNF α , par ces cellules (Koppal et al., 2000). Certains stéroïdes, comme la dexaméthasone, ainsi que certains médiateurs neuronaux peuvent également avoir un effet désactivateur sur les cellules microgliales. Ainsi, le glutamate diminue la sécrétion de protéines proinflammatoires ou l'expression du CMH II par ces cellules (McCluskey et Lampson, 2001). Les astrocytes peuvent aussi réguler l'activation des cellules microgliales, notamment en inhibant l'expression de l'iNOS et la sécrétion d'IL-12 par ces cellules (Aloisi et al., 1997 ; Vincent et al., 1997). La cytokine antiinflammatoire TGF β sécrétée par les astrocytes serait responsable de cet effet (Vincent et al., 1997). Le schéma général d'activation des cellules microgliales est représenté dans la figure 9.

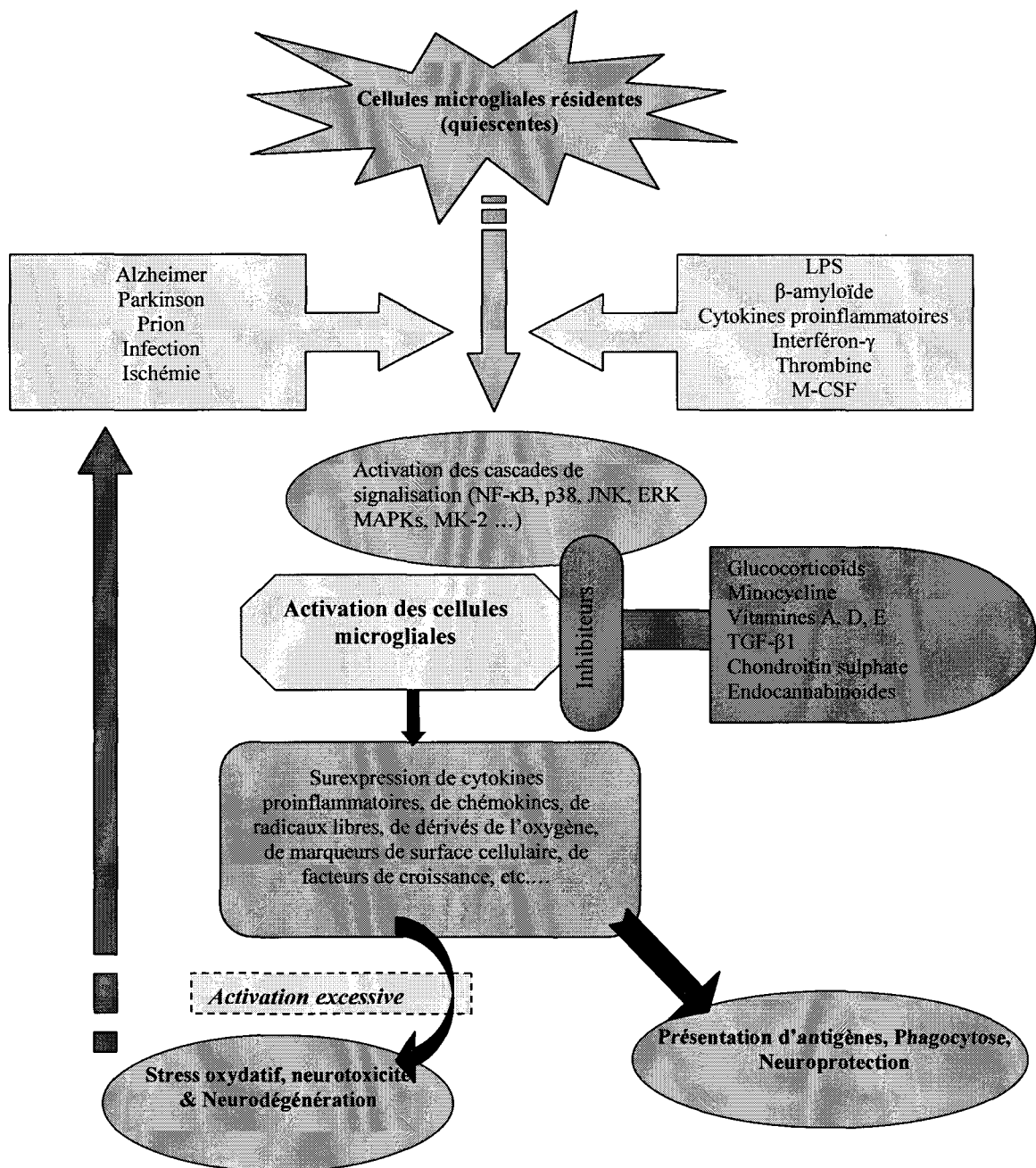


Figure 9 : Schéma général d'activation des cellules microgliales. Les cellules microgliales, sous forme ramifiées dans le système nerveux sain, peuvent être activées par un grand nombre de facteurs. Les cellules microgliales activées engendrent l'activation de différentes cascades de signalisation. Elles peuvent exprimer une grande variété de cytokines, de facteurs de croissance, de radicaux libres, et phagocyter les éléments pathogènes. L'activation chronique des cellules microgliales peut augmenter la neurodégénération à travers le relargage de molécules potentiellement cytotoxiques. Plusieurs molécules antiinflammatoires peuvent cependant inhiber l'activation de ces cellules et exercer ainsi une neuroprotection. (d'après la revue de Dheen et al., 2007)

3 LES EFFECTEURS MOLECULAIRES

La réponse immunitaire innée est basée sur l'existence d'effecteurs moléculaires. Ceux-ci regroupent les différents types de récepteurs impliqués dans la reconnaissance des micro-organismes ainsi que les molécules permettant leur élimination. Ces dernières, produites par les différents effecteurs cellulaires précédemment décrits, englobent la globalité des molécules impliquées dans l'élimination des éléments pathogènes de façon directe (peptides antibactériens ...) ou indirecte (chimiokines...) par le recrutement de cellules immunitaires.

3.1 Les récepteurs de reconnaissance des PAMPs

La réponse immunitaire innée du SNC doit pouvoir distinguer les micro-organismes pathogènes avant de pouvoir procéder à leur élimination. (Medzhitov et Janeway, 2000).

La membrane cellulaire de ces micro-organismes est composée de motifs moléculaires très conservés, appelés les PAMPs (Medzhitov et Janeway, 2000). Ces motifs, absents chez les cellules eucaryotes, regroupent les constituants des enveloppes des micro-organismes, tel le LPS (*Lipopolysaccharides*) des bactéries à Gram négatif, le LTA (*Acide lipoteichoic*) et les PGN (*Peptidoglycanes*) des bactéries à Gram positif, les lipoprotéines mycobactériennes lipoarabinomannane, le zymosan des levures ainsi que l'enveloppe cellulaire de différents champignons (Medzhitov et Janeway, 2000 ; Kaisho et Akira, 2004). Ces motifs peuvent être détectés par des récepteurs exprimés à la surface de la plupart des cellules immunitaires, ce sont les PRRs (*Pattern Recognition Receptors*). Ces récepteurs peuvent être répartis en 2 classes :

- (i) les récepteurs solubles, tels que le complément et les collectines.
- (ii) les récepteurs membranaires, tels que les MMRs (*Macrophages Mannose Receptors*), les récepteurs scavenger, les dectins, les TLRs (*Toll-like Receptors*) et les NLRs (*Nacht LRR Receptors*).

3.1.1 Les collectines

La présence de micro-organismes dans le SNC des vertébrés peut être abrogée par la présence de molécules solubles circulant librement dans le parenchyme cérébral. Les collectines sont une classe de lectines de type-C qui visent les structures glucidiques trouvées sur les microbes pathogènes envahissants. La liaison des collectines aux micro-organismes va entraîner leur agglutination et par conséquent accélérer leur élimination (Eggleton, 1998 ; Ezekowitz, 2003). Elles sont notamment composées du MBL (*Mannan Binding Lectin*), du SPA (*Lung Surfactant Protein A*). Ces collectines sont principalement synthétisées par les phagocytes et ont en commun la présence d'un domaine globulaire C-terminal, leur permettant de reconnaître les PAMPs, et un domaine N-terminal pouvant se lier aux cellules apoptotiques (Elward et Gasque, 2003). Le MBL et le SPA sont tous les deux capables de reconnaître une grande variété d'éléments pathogènes incluant les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, les mycobactéries, les virus ou encore certains parasites (Lu et al., 2002). Le MBL, grâce à son domaine CDR (*Carbohydrate Recognition Domain*), qui va spécifiquement reconnaître les glycoprotéines des membranes des micro-organismes (tels que le N-acétylglucosamine) (Hoffmann et al., 1999). La SPA sera, quant à elle, capable de promouvoir la phagocytose de nombreux microbes (LeVine et al., 1997). Dans le SNC, le MBL et le SPA sont exprimés par les astrocytes (Kuraya et al., 2003 ; Wagner et al., 2003). Une fois fixées aux éléments pathogènes, elles seront reconnues par les cellules macrophagiques du SNC et notamment par les cellules microgliales.

3.1.2 Le complément

Le système du complément est un composant essentiel de la défense immunitaire innée du SNC. Il va permettre la reconnaissance des agents infectieux et des cellules apoptotiques afin de promouvoir leur élimination (Barnum, 2002 ; Gasque et al., 2000). Ce système est constitué d'une cascade d'enzymes protéolytiques activées graduellement et débouchant soit à la phagocytose des micro-organismes soit à leur lyse grâce à la formation du complexe d'attaque membranaire (Song et al., 2000). Le système du complément est composé à la fois de protéines solubles et de protéines de surfaces exprimées par tous les types cellulaires du corps (Gasque et al., 2000 et 2002).

Dans le SNC, les neurones et les cellules gliales (astrocytes et cellules microgliales) sont connues pour synthétiser un système complet et fonctionnel du complément comprenant

les 3 voies d'activation: la voie classique, la voie alterne et la voie des lectines (Gasque et al., 2000). La voie classique est activée par le C1q soluble qui va reconnaître les complexes anticorps-antigènes ainsi que divers ligands présents sur la surface des micro-organismes (Gewurz et al., 1993). Le C1q est un PRR soluble très important impliqué dans le nettoyage des débris du SNC par sa capacité intrinsèque à se lier à un large panel d'agents toxiques incluant la région Fc des immunoglobulines (complexes auto-immuns), les neurones hypoxiques, les fibres β -amyloïdes et les cellules apoptotiques (Tenner, 1999 ; Mevorach, 1998 ; Korb, 1997). La voie alterne est activée, quant à elle, par les surfaces cellulaires des bactéries à Gram positif ou à Gram négatif, les cellules infectées par un virus, les levures et les parasites. Enfin, la voie des lectines, qui nécessite le recrutement de la MBP (*Mannose Binding Protein*) de la famille des collectines, peut interagir avec les résidus mannose ou N-acétylglucosamine (GlcNac) des micro-organismes.

Les différentes voies activant le complément aboutissent à l'activation d'une C3 convertase, point de départ de la voie effectrice, et conduisant à la formation d'un complexe d'attaque membranaire qui va s'insérer dans la bicouche phospholipidique du pathogène et engendrer sa lyse (Speth et al., 2002 ; Cabanas et al., 1999 ; Ehlers, 2000). Cette cascade d'activation mène à la formation de composés clivés, le C3a et le C5a, possédant des propriétés inflammatoires et chimioattractantes vis-à-vis des cellules phagocytaires (Boulay et al., 1997) mais également à la formation du C3b qui va se fixer aux cellules cibles. Les récepteurs du système du complément CR3 (CD11b/CD18) et CR4 (CD11c/CD18) qui sont exprimés à la surface des cellules phagocytaires pourront alors reconnaître ces composants. Les astrocytes, les cellules microgliales et les neurones peuvent exprimer la plupart des molécules du complément (Gasque et al., 2000). Les récepteurs CR1, CR3 et CR4 sont présents sur les cellules microgliales et sur les cellules de Kolmer du plexus choroïdien. Ils viennent ainsi s'ajouter aux stratégies de reconnaissance des micro-organismes du SNC (Perry, 1985 ; Nicholson-Weller et Klickstein, 1999). Cependant, l'activation du système du complément doit être étroitement réglée afin d'empêcher la destruction excessive des tissus nerveux (Gasque et al., 2000 ; Van Beek et al., 2000). Celui-ci peut, s'il est exprimé de façon excessive, avoir un effet néfaste principalement sur les oligodendrocytes et les neurones (Speth et al., 2002).

3.1.3 Le récepteur au mannose

Le récepteur au mannose, ou MMR (*Macrophage Mannose Récepteur*), est un récepteur transmembranaire encore appelé récepteur d'endocytose. Il contient plusieurs domaines de liaisons aux carbohydrates. Il va fixer les oligosaccharides ou les glycoprotéines avec une affinité plus ou moins forte (*mannose>fructose>glucose*) (Stahl et Ezekowitz, 1998). Le MMR va reconnaître les ligands mannosylés présents sur les membranes des bactéries à Gram positif et à Gram négatif, des parasites, des champignons, des levures. Il va également détecter les cellules de l'hôte infectées par des parasites ou des virus. Dans le SNC, le MMR est localisé sur les macrophages périvasculaires, sur les astrocytes, ainsi que sur les cellules microgliales. L'expression de ce récepteur peut être modulée par la présence de cytokines proinflammatoires tel que l'IFN γ (Burudi et al., 1999 ; Linehan et al., 1999).

3.1.4 Les récepteurs scavenger

Les récepteurs de type Scavenger sont des récepteurs très conservés présents à la surface des cellules myéloïdes des mammifères (Pearson, 1996). Ils sont divisés en deux classes. La classe A comprenant les récepteurs SR-AI/AII et SR-MARCO (*Macrophage Receptor with Collagenous structure*) et la classe B comprenant les récepteurs CD36 et le SR-BI. La classe A est constituée des glycoprotéines trimériques avec un domaine collagène responsable de la fixation des ligands. Le SR-AI est notamment capable de fixer un grand nombre de ligands, tels que les LPS ou les poly-anions présents à la surface des bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Pearson, 1996).

Dans le SNC des vertébrés, les cellules gliales expriment plusieurs de ces récepteurs. Les récepteurs SR-BI, SR-AI/AII, CD36 et SR-MARCO sont notamment exprimés par les cellules microgliales. Les astrocytes expriment, quant à eux, les récepteurs SR-BI et SR-MARCO (Alarcon et al., 2005 ; Husemann et al., 2002). Ces récepteurs scavenger ont un rôle très important dans la défense du SNC contre les micro-organismes pathogènes. SR-A est également connu pour participer à l'élimination des débris cellulaires après une lésion du SNC (Bell, 1994 ; Coraci, 2002 ; Husemann et al., 2002).

3.1.5 Le récepteur Dectin-1

La protéine Dectin-1 est un récepteur transmembranaire (28 kDa) de type CLR (*C-type Lectin Receptors*). Elle est composée d'un domaine intracellulaire contenant un motif ITAM (*Immunoreceptor Tyrosin-based Activation Motif*), d'un domaine transmembranaire, et d'un domaine extracellulaire glycosylé capable de reconnaître principalement les β -glucanes (polymères de glucose) qui sont des composants caractéristiques de la paroi de la plupart des champignons (ainsi que de certaines bactéries) (Palma et al., 2006 ; Ariizumi et al., 2000). Le récepteur Dectin-1 est d'ailleurs considéré comme le principal récepteur aux β -glucanes (Brown et al., 2002). Le zymosan, dont le β -glucane est l'un des constituants, est un ligand connu de ce récepteur.

Le récepteur Dectin-1 est exprimé à la surface des cellules myéloïdes (Robinson et al., 2006) et notamment à la surface des cellules macrophagiques où il est exprimé intensément (Taylor et al., 2002). Au sein du SNC, les cellules macrophagiques périvasculaires, les cellules microgliales ou encore les cellules macrophagiques périphériques infiltrées peuvent exprimer ce récepteur (Choucair et al., 2006).

Lors d'une stimulation au zymosan, celui-ci sera reconnu par le domaine extracellulaire de Dectin-1. Le domaine ITAM de sa partie cytoplasmique va alors activer la kinase Syk qui va phosphoryler la protéine CARD9. Cette dernière agira sur le complexe cytoplasmique Bcl10/Malt1 qui conduira à l'activation du facteur de transcription NF- κ B (Lee et Kim, 2007). Cette réaction en chaîne va alors conduire les cellules macrophagiques à produire des cytokines proinflammatoires et à phagocyter les éléments pathogènes (Brown, 2006 ; Underhill et al., 2005 ; Rogers et al., 2005).

Cependant, le récepteur Dectin-1 ne sera pas seul à être activé lors d'une stimulation au zymosan. Celui-ci peut également être reconnu par le TLR2. Ces récepteurs pourront donc agir en synergie et mener à la production de cytokines proinflammatoires, tels que le TNF α et l'IL-12, lors d'une stimulation par des champignons (Yadav et Schorey, 2006 ; Dillon et al., 2006 ; Brown et al., 2003). La fixation des β -glucanes par le récepteur Dectin-1 favoriserait même l'activation du TLR2 (Rothfuchs et al., 2007). En outre, les cytokines produites lors d'une reconnaissance combinée du zymosan par le TLR2 et le Dectin-1 seraient différentes de celles produites lors de la stimulation séparée de chacun de ces récepteurs (von Meyenn et al., 2006).

3.1.6 Le récepteur CD14 et la LBP

Le récepteur CD14 est une glycoprotéine membranaire présentant plusieurs régions répétitives riches en groupements leucines. (Heumann et Roger, 2002 ; Weber et al., 2003 ; Esen et Kielian, 2005). Le C14 existe sous deux formes, une forme membranaire (mCD14) et une forme soluble (sCD14) (Han et al., 1994). Cette dernière permet à certains types cellulaires dépourvus de mCD14, telles les cellules endothéliales cérébrovasculaires, de détecter les LPS (Tapping et Tobias, 1997). Le mCD14 est, quant à lui, inséré dans la bicouche phospholipidique des cellules myéloïdes, grâce à son groupement GPI (*glycosyl-phosphatidylinositol*).

Dans le SNC, le CD14 joue un rôle très important dans la reconnaissance des LPS (Dobrovolskaia et Vogel, 2002). Cette reconnaissance peut se faire directement ou par l'intermédiaire de la LBP (*Lipopolysaccharide Binding Protein*), une protéine plasmatique produite par le foie (Calvano et al., 1994 ; Myc et al., 1997). En effet, lors d'une infection systémique aux LPS, ces derniers peuvent, de par leurs propriétés amphiphiles, former des agrégats réduisant leur reconnaissance par le récepteur CD14 (Hailman et al., 1994). Or, la LBP, qui présente un site de fixation de forte affinité pour le LPS, va mener à la formation d'un complexe LBP-LPS. Celui-ci va délivrer un signal activateur aux cellules macrophagiques, via le récepteur CD14 présent à leur surface (Yu et al., 1997). La reconnaissance des LPS par le CD14 sera donc améliorée grâce à cette LBP. L'importance du complexe LBP-CD14 dans la réponse inflammatoire du SNC a été démontrée chez la souris. Ainsi, des cellules microgliales purifiées à partir de souris déficientes en CD14 montrent une réduction de la synthèse de cytokines proinflammatoires telles que le TNF α et le CXCL2 par rapport à des cellules normales (Esen et Kielian, 2005), et par conséquent une diminution de la réponse immunitaire innée.

La voie d'activation du CD14 nécessite le recrutement du TLR4. En effet, il va transmettre un signal activateur au TLR4 qui, par l'intermédiaire d'une cascade d'activation intracellulaire, mènera à l'activation du facteur de transcription NF-kB permettant l'expression de nombreux gènes impliqués dans la réponse inflammatoire (Nguyen et Benveniste, 2002 ; Laflamme et Rivest, 2001). Le TLR4 peut néanmoins être activé directement par les LPS (Poltorak et al., 2000).

En conditions normales, l'expression du CD14 par ces cellules macrophagiques du parenchyme nerveux est très faible. Les cellules macrophagiques localisées au niveau des OCVs (cellules de Kolmer) expriment ce récepteur de façon constitutive. La présence de LPS entraînent une forte augmentation du niveau d'expression du gène codant le CD14 par les cellules présentes dans les régions adjacentes aux OCVs et progressivement à celles localisées dans l'ensemble du cerveau (cellules microgliales) (Becher et al., 1996 ; Lacroix et al., 1998). Le CD14 est également fortement exprimé dans le cerveau de souris atteintes d'EAE (*Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale*).

3.1.7 Les Toll-like récepteurs (TLRs)

3.1.7.1 Généralités

Les TLRs (*Toll-like récepteurs*) sont impliqués dans la réponse immunitaire innée, que ce soit chez les invertébrés ou les vertébrés (Akira et al., 2001). La découverte des récepteurs de type Toll a permis une avancée considérable dans la compréhension des mécanismes de l'immunité innée. Les gènes codant les TLRs ont été initialement identifiés chez la *Drosophile* (*Drosophila melanogaster*) puis chez les mammifères, comme la souris ou l'homme (Lemaitre et al., 1996 ; Medzhitov et al., 1997). Ces TLRs peuvent reconnaître une grande variété de PAMPs (Lemaitre et al., 1997 ; Kopp et Medzhitov, 1999 et 2003 ; Akira, 2001 ; Kaisho et Akira, 2004). Ils sont les indicateurs principaux d'une invasion par des micro-organismes étrangers. A ce jour, 10 TLRs ont été identifiés chez l'homme (TLR 1 à 10) et 12 chez les souris (TLRs 1 à 9, et TLRs 11 à 13). Chez la souris, l'homologue du TLR10 est un pseudo gène (Konat et al., 2006). Au moins un agoniste a été identifié par récepteur, à l'exception du TLR10 humain et des TLR12 et TLR13 de souris (Kopp et Medzhitov, 2003 ; Takeda et al., 2003). La voie d'activation mais également le rôle biologique de ce TLR13, exprimé dans le SNC de la souris, sont d'ailleurs inconnus à ce jour.

Les TLRs sont des protéines transmembranaires. Ils sont composées d'un domaine extracellulaire riche en acide aminé leucine, le domaine LRR (*Leucine Rich Repeats*), d'un domaine transmembranaire, et d'un domaine cytoplasmique contenant une région conservée appelée le domaine TIR (*Toll-Interleukine-1 Récepteur*) (Medzhitov et al., 1997 ; Anderson, 2000 ; Barton et Medzhitov, 2003). Les domaines LRRs de ces récepteurs sont impliqués dans la reconnaissance de différents PAMPs (Kawai et Akira, 2006). Certains TLRs peuvent même se dimériser afin d'augmenter leurs capacités de reconnaissance de différents types de micro-

organismes (Ozinsky et al., 2000). Les principaux ligands connus des TLRs présents chez la souris sont énumérés dans le Tableau 3.

Le « noyau » de la signalisation de la voie des TLRs implique le recrutement des protéines IRAK4 et de TRAF6 par MyD88. Ces dernières agiront sur le complexe Ucb13/TAK1 et mener à l'activation de TAK1. Celle-ci va agir sur le complexe IKK (IKKa, IKKb, NEMO) qui va conduire à la phosphorylation et la dégradation d'IkB permettant la libération de NF- κ B. La protéine TAK1 peut également activer la voie MAPK menant à l'activation d'AP-1. IRF-5 peut quant à lui être activé par le complexe MyD88/IRAK-4/TRAF-6. Les protéines NF- κ B, AP1 et IRF5 sont des facteurs de transcription pouvant induire l'expression de beaucoup de gènes codant des molécules impliquées dans l'immunité telles que des cytokines, des enzymes, et d'autres molécules essentielles à l'élimination de microbes pathogènes, tels que les peptides antimicrobiens (Akira et al. 2006 ; Barton et Medzhitov 2003). MyD88 est une protéine très importante dans cette voie de signalisation (Medzhitov et al., 1998 ; Adachi et al., 1998). Cette voie d'activation est utilisée par la plupart des TLRs de mammifères à l'exception du TLR3 qui est un récepteur spécifique de l'ARN double brin viral. Ce récepteur présente en effet une voie d'activation entièrement MyD88-indépendant. Le récepteur TLR4, spécifique du LPS, possède également une voie annexe MyD88-indépendant. Dans ces voies MyD88-indépendantes, TRIF remplace MyD88 pour lancer une série séparée d'événements menant à l'activation du facteur de transcription IRF3 engendrant la production de molécules impliquées dans la réponse immunitaire telles que des IFN (Hoebe et al., 2003 ; Yamamoto et al., 2003). Ces différentes voies sont schématisées dans la figure 10.

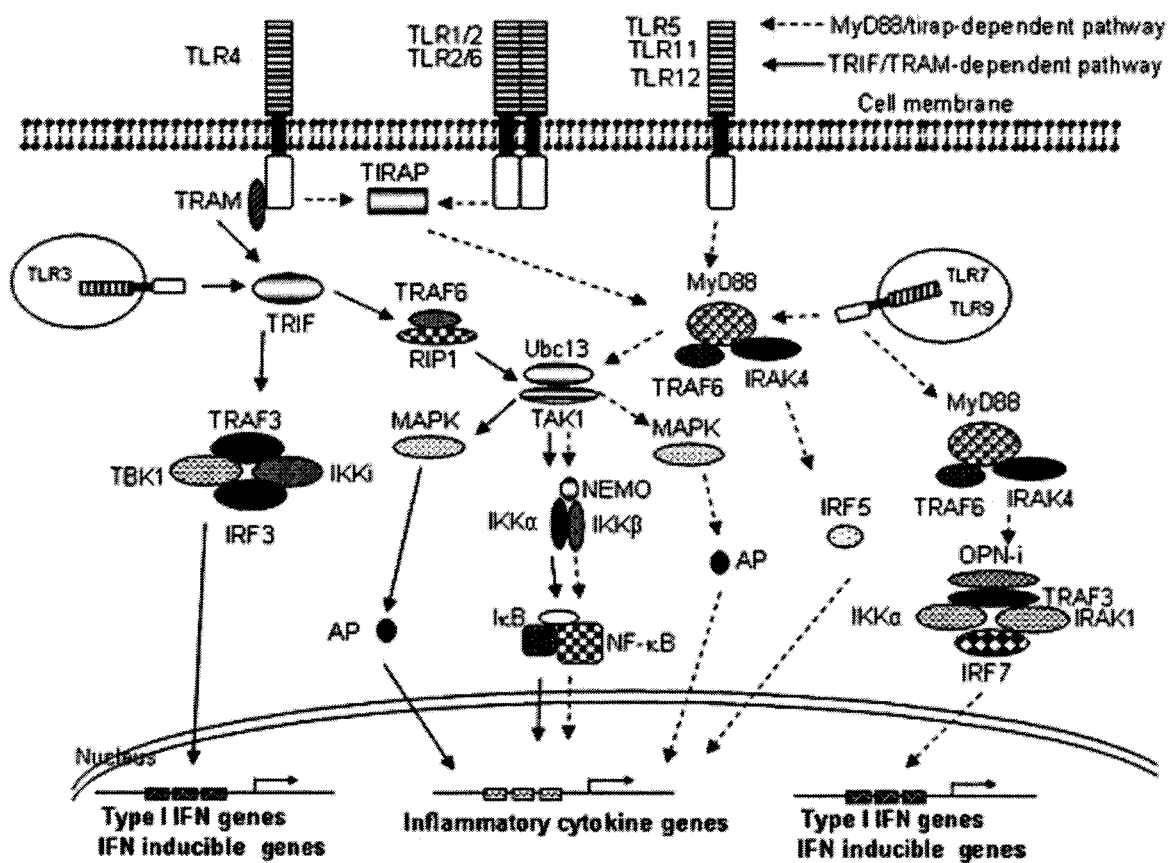


Figure 10 : Les différentes voies de signalisation des TLRs chez les vertébrés. (d'après Chen et al., 2007).

Tableau 3 : Les principaux ligands connus des Toll-like récepteurs (TLRs) chez la souris. Les ligands des TLR 12 et 13 sont inconnus.

	Ligands	Origine	Littérature	Localisation dans le SNC
TLR1/TLR2	<i>TLR1 complexé avec le TLR2</i>			
	Lipoproteins/triacylated lipopeptides	Bacteria, Mycobacteria	Takeuchi et al, 2002 ; Alexopoulou et al, 2002	cellules microgliales astrocytes
	Soluble Lipoproteins	Neisseria meningitides	Wyllie et al, 2000	
TLR2				
	Bacterial Lipoproteins (BLPs)	Bacteria	Brightbill et al, 1999 ; Underhill et al, 1999 ;Means et al, 1999	cellules microgliales astrocytes oligodendrocytes
	Lipoarabinomannan (LAM)	Mycobacteria		
	MALP-2 (Mycoplasmal Macrophage-activating Lipopeptide-2)	Mycoplasma	Takeuchi et al, 2000	
	Glycosylphosphatidylinositol (GPI)	Trypanosoma cruzi	Krishnegowda et al, 2005	
	Glycolipids	Trepanosema maltophilum	Opitz et al, 2001	
	Porins	Neisseria sp.	Massari et al, 2002	
TLR2/Dectin-1	<i>TLR2 interacts with Dectin-1</i>			
	Zymosan	Fungi	Gantner et al, 2003	cellules microgliales astrocytes
TLR3				
	Double-strandesRNA (dsRNA)	Viral	Alexopoulou et al, 2001	cellules microgliales astrocytes oligodendrocytes neurones
	Polynosine-polycytidylic Acid (poly(I:C))	Synthetic	Alexopoulou et al, 2001	
	mRNA	Host	Kariko et al, 2004	
	tRNA	Host/Fungi/?	Wang et al, 2006	
TLR4/CD14	<i>TLR4/MD-2 complexed with CD14 and/or LPS-binding Protein (LBP)</i>			
	Lipopolysaccharide(LPS)	Gram-negative bacteria (E. coli, Salmonella)	Huber et al, 2006	cellules microgliales astrocytes neurones
	LMW Oligosaccharides of Hyaluronic Acid (sHA)	Host	Termeer et al, 2002	
	Gycosinotolphospholipids (GIPLs)	Trypanosoma cruzi	Oliveira et al, 2004	
	Heat Shock Proteins (HSPs)	TLR2 vs TLR4	Netea et al, 2002	
TLR4	<i>TLR4/MD-2 in the absence of CD14 and/or LP-binding Protein (LBP)</i>			
	Lipopolysaccharide (LPS)	Gram-negative bacteria (E. coli, Salmonella)	Huber et al, 2006	cellules microgliales astrocytes neurones
	Lipid A (lacks core-polysaccharide: active component of LPS)	Gram-negative bacteria (E. coli, Salmonella)	Huber et al, 2006	
TLR5				
	Flagellin	Gram-negative bacteria	Gomez-Gomez et Boller, 2002 ; Hayashi et al, 2001	cellules microgliales astrocytes
TLR6/TLR2	<i>TLR6 complexed with TLR2</i>			
	MALP-2 (Mycoplasmal Macrophage-activating Lipopeptide-2) / Diacylated Macrophage-activating Lipopeptide-2	Mycoplasma	Takeuchi et al, 2000 ; Takeuchi et al, 2001	cellules microgliales astrocytes
	Diacylated Lipopeptide FSL-1	Part of the lipoprotein LP44 of Mycoplasma salivarium	Kiura et al, 2006 Hubschle et al, 2006 Okusawa et al, 2004	
	Diacylated Lipopeptide Pam2CSK4	Synthetic	Buwitt-Beckmann et al, 2005	
	Soluble Tuberculosis Factor (STF)	Mycobacteria	Bulut et al, 2001	
TLR7				
	R-848 (Resiquimod)	Synthetic	Hemmi et al, 2002 Jurk et al, 2002	cellules microgliales
	Single-stranded RNA (ssRNA) / Polyuridylic acid . K (Poly(U) . K)	Non-viral & viral ssRNA	Heil et al, 2004	
	U1snRNA	Host	Savarese et al, 2006	
	siRNA	Synthetic	Schlee et al, 2006	
TLR8				
	Single-stranded RNA (ssRNA) / Polyuridylic acid . K (Poly(U) . K)	Non-viral & viral ssRNA	Heil et al, 2004	cellules microgliales neurones
TLR9	<i>Toll-like Receptor 9 [TLR9] (intracellular)</i>			
	Unmethylated CpG DNA	Bacteria / Protozoa / viral	Hartmann et al, 2003 ; Takeshita et al, 2004	cellules microgliales
	CpG	Synthetic		
	Hemozoin	Protozoa (Malaria piment)	Coban et al, 2005	
TLR11				
	Profilin	Protozoa (Toxoplasma gandii)	Lauw et al, 2005	?
	Uronathogenic E. coli (UIPECs)	Bacteria	Zhang et al, 2004	

3.1.7.2 Les TLRs au sein du SNC

Au sein du SNC, les TLRs forment un lien entre le système immunitaire inné et adaptatif, spécialement en cas d'invasion par des pathogènes. Des expériences *in vitro* et *in vivo* ont montré qu'un grand nombre de TLRs sont exprimés au niveau du SNC notamment par les astrocytes, les neurones et les cellules microgliales (Bowman et al., 2003 ; Bsibsi et al., 2002 ; Esen et al., 2004 ; Kielian, 2002 ; Laflamme et Rivest, 2001). L'expression de ces TLRs varie selon le type cellulaire. Ainsi, les cellules microgliales expriment un grand nombre de TLRs alors que les astrocytes ou les neurones en expriment un nombre plus restreint (Bsibsi et al., 2006 ; Bowman et al., 2003 ; Farina et al., 2005 ; Carpentier et al., 2005 ; Olson et Miller, 2004).

Des études *in vitro* ont montré que les cellules microgliales, purifiées à partir du cerveau de souris ou de l'homme, expriment les TLRs 1 à 9 (Bsibsi et al., 2002 ; Kielian et al., 2002 et 2005 ; Laflamme et al., 2003 ; Olson et Miller, 2004). Ces cellules microgliales seront donc capables d'identifier une gamme très étendue de PAMPs (Akira et Hemmi, 2003 ; Sieling et Modlin, 2002 ; Takeda et al., 2003). Cependant, *in vivo*, seule l'expression des TLR2, TLR3 et TLR4 par ces cellules a été confirmée sur des coupes histologiques de cerveau de mammifères adultes (Laflamme et al., 2001 ; Bsibsi et al., 2002). L'expression de ces TLRs peut être induite par un grand nombre de stimulus inflammatoires, incluant l'IFN γ , les LPS, les PGN, ainsi que par des infections bactériennes ou virales (Olson et Miller, 2004 ; Kielian et al., 2002 et 2005). Une stimulation des cellules microgliales par des PGN entraîne l'activation du TLR2 et la production de nombreux facteurs proinflammatoires (NO, CXCL2, TNF α , IL-12) typiques de l'activation de MyD88 (Esen et Kielian, 2006). Le TLR2, exprimé à la surface des cellules microgliales et des oligodendrocytes, est considéré comme un acteur important en cas d'infection bactérienne du SNC (Konat et al., 2006 ; Bsibsi et al., 2002). Ainsi, lors d'une stimulation bactérienne systémique, des souris déficientes en TLR2 présentent une diminution de l'inflammation de leur SNC pouvant conduire à la mort (Koedel et al., 2004). A contrario, des expériences réalisées *in vitro* sur des cultures de cellules microgliales indiquent qu'une stimulation trop longue ou trop intense du TLR2 peut entraîner le relargage de grandes quantités de NO conduisant à l'apoptose des neurones (Lehnardt et al., 2006).

Le TLR9 n'a, quant à lui, été détecté que dans les cellules microgliales. Il peut être activé par des motifs bactériens tels que l'ADN viral ou les CpG et donner une réponse identique à celles des autres TLRs comprenant un relargage important de NO (Iliev et al.,

2004 ; Dalpke et al., 2002). Cependant, son activation pourrait également être bénéfique en favorisant la fixation des peptides amyloïdes impliqués dans la maladie d'Alzheimer (Tahara et al., 2006 ; Iribarren et al., 2006). De plus, dans le cas de tumeurs cérébrales, l'activation du TLR9 pourrait déclencher une immunité anti-tumorale en favorisant l'apoptose des cellules tumorales dans le cerveau (El Andaloussi et al., 2006).

A ce jour, les astrocytes sont connus pour exprimer les TLR1 à 6. Ils expriment notamment le TLR3 de façon très importante (Bowman et al., 2003 ; Bsibsi et al., 2002 ; Carpentier et al., 2005 ; Farina et al., 2005). En effet, en conditions infectieuses ou non, l'expression du TLR3 dans le SNC est localisée principalement au niveau des astrocytes. Les cellules microgliales peuvent également exprimer ce récepteur (Bsibsi et al., 2006 ; Farina et al., 2005). L'activation du TLR3 à partir de cultures d'astrocytes ou de cellules microgliales induit la production d'une grande quantité de cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF α et IFN β), de chimiokines (CCL2, CCL3, CCL5, CCL20 et CXCL10), de facteurs de croissance ainsi que d'autres médiateurs neuroprotecteurs (Bsibsi et al., 2006). Cependant, le TLR3 pourrait jouer un rôle différent des autres TLRs dans le SNC. Il a été montré que des cultures d'astrocytes humains stimulés par une grande variété de facteurs proinflammatoires non infectieux (tels que des cytokines proinflammatoires) présentent un taux d'ARNm codant le TLR3 environ 200 fois plus important que celui des cellules témoin, alors que l'expression d'autres TLRs demeure inchangée (Bsibsi et al., 2006). En outre, le TLR3, le TLR4 et le TLR8 font partis des rares TLRs exprimés par les neurones (Jackson et al., 2006 ; Préhaud et al., 2005).

L'activation du TLR4 dans le SNC tend à induire une dégénérescence des tissus nerveux ou une augmentation de leur sensibilité après une lésion. En effet, l'activation du TLR4 dans le SNC tend à maintenir l'inflammation (Chakravarty et Herkenham, 2005). Ainsi, l'addition de LPS sur des cultures de neurones de souris active ce TLR4 et provoque une forte perte neuronale (Lehnardt et al., 2003). De même, une intense stimulation du TLR4 présent à la surface des cellules microgliales peut conduire à leur apoptose (Ebert et al., 2005 ; Dalpke et al., 2002). Remarquablement, la plupart des fonctions engendrées par l'activation du TLR4 semble être coordonnées avec celle du TLR2, suggérant la présence de fonctions croisées entre ces deux TLRs (Jung et al., 2005 ; Laflamme et al., 2003). Le TLR8 pourrait, quant à lui, jouer un rôle dans le développement neuronale (Ma et al., 2006). Les cellules endothéliales cérébrovasculaires ne sont quant à elles pas connues pour exprimer les TLRs (Vadeboncoeur et al., 2003 ; Freyer et al., 1996).

3.1.8 Les *NOD-like récepteurs (NLRs)*

Les NLRs (*NOD Like Receptors* ou *NACHT-LRR Proteins*) sont des récepteurs intracellulaires. Tout comme les TLRs, les NLRs participent à la surveillance et à la défense de l'organisme contre les pathogènes. Cependant, là où les TLRs sont responsables de la détection extracellulaire microbienne, les NLRs peuvent, quant à eux, grâce à leur localisation intracellulaire, détecter les motifs microbiens présents dans le compartiment cytoplasmique des cellules (Philpott et Girardin, 2004 ; Martinon, 2004).

Les récepteurs NLRs regroupent les NODs, les NBS-LRR et les protéines CATERPILLER (Inohara, 2005 ; Ting et Davis, 2005). Ils sont formés d'un domaine NACHT central (Leipe, 2004) et d'une extrémité C-terminale contenant une série de répétitions riches en leucine (LRR) impliquée dans la reconnaissance des pathogènes (Tschopp et al., 2003). L'extrémité N-terminale est caractérisée par la présence de domaines effecteurs que sont les domaines CARD, PYRIN ou BIR (Inohara, 2005 ; Ting et Davis, 2005). Plus de 23 NLRs sont présents dans le génome humain.

Dans la famille des protéines NODs, deux membres, NOD1 et NOD2, ont pour l'instant un rôle démontré dans l'immunité du SNC (Strober et al., 2006). NOD1 va reconnaître spécifiquement les motifs PGN des bactéries à Gram négatif (Chamaillard et al., 2003), alors que NOD2 va reconnaître de façon plus générale les PGN de toutes bactéries (Girardin et al., 2003, Inohara et Nunez, 2003).

La voie de signalisation associée à ces récepteurs conduit à l'activation du facteur de transcription NF- κ B. (Philpott et Girardin, 2004) (Figure 10). Le domaine CARD de ces NODs va pour cela recruter la protéine RIP-2 (*Receptor Interacting Protein*) et la kinase I κ B (Bertin et al., 1999 ; Ogura et al., 2001 ; Girardin et al., 2001 ; Inohara et al., 2000). En ce qui concerne NOD2, son activation implique l'ubiquitinylation de NEMO par la protéine RIP-2 (Abbott et al., 2004). Plusieurs composants de la voie d'activation des TLRs, comme TRAF6, seraient impliqués dans la signalisation de NOD1 (Bertin et al., 1999). CARD-6 agirait quant à elle comme un répresseur de NOD1 (Stehlik et al., 2003). Tout comme certains TLRs, NOD1 et NOD2 peuvent induire la synthèse de certaines cytokines telles que l'IL-1 β et l'IL-18 (Martinon et Tschopp, 2005).

Peu d'études nous renseignent sur la présence des NLRs au sein du SNC. Toutefois, les protéines NOD1 et NOD2 s'avèrent être exprimés par les cellules microgliales et par les

astrocytes (Strober et al., 2006). Deux principales études, réalisées par l'équipe de Sterka, ont permis de démontrer que la protéine NOD2 était exprimée et produite par ces deux types cellulaires de manière constitutive (Sterka et al., 2006a et 2006b). Toutefois, cette expression est beaucoup plus importante dans les cellules microgliales que dans les astrocytes. La protéine NOD2 ainsi que la kinase RIP-2 sont surexprimées par ces deux types cellulaires en présence de bactéries pathogènes pour le SNC, telles que *Borrelia burgdorferi* et *Neisseria meningitidis* (Sterka et al., 2006a et 2006b). L'utilisation de ligands synthétiques spécifiques à NOD2, tel que le MDP (*muramyl dipeptide*), un analogue synthétique d'une sous-unité de peptidoglycane bactérien, entraîne une augmentation de la production de cytokines proinflammatoires (Sterka et al., 2006a et 2006b). La présence de ligands du TLR9 peut également induire une augmentation de l'expression de NOD2 par les astrocytes, ce qui ne serait par le cas des cellules microgliales. En effet, des cultures primaires de cellules microgliales stimulées au MDP voient tout de même leur production de cytokines proinflammatoires augmentée (Sterka et al., 2006a et 2006b). En ce qui concerne NOD1, peu d'informations nous renseignent, à ce jour, sur le rôle de ces protéines dans l'immunité innée du SNC.

L'ensemble de ces données montre donc que les TLRs et les NLRs induisent un certain nombre de réponses similaires, supposant que ces différents types de récepteurs pourraient agir en synergie dans la défense immunitaire innée du SNC, ou à contrario peuvent contribuer à engendrer une augmentation des dommages du SNC par la surproduction de molécules proinflammatoires. Au niveau périphérique, les récepteurs NOD1 et NOD2 sont impliqués dans la synthèse de peptides antibactériens (Viala et al., 2004 ; Kim et al., 2004 ; Kobayashi et al., 2005). Cependant, leur implication dans la synthèse des peptides antibactériens localisés au niveau du SNC (cf. paragraphe suivant) reste inexplorée.

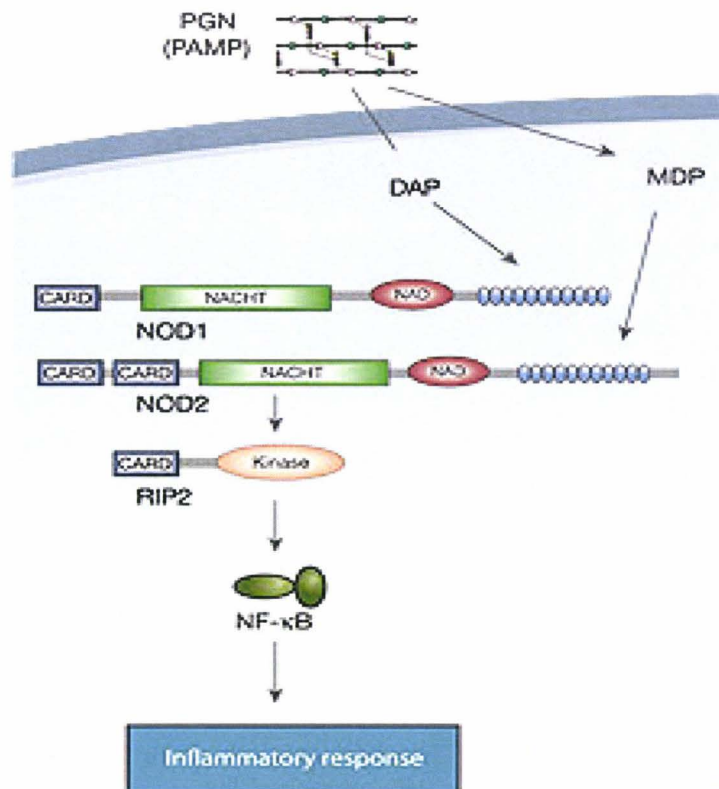


Figure 11 : Cascade d'activation de NOD1 et NOD2. (d'après Meylan et al., 2006).

3.2 Les médiateurs de la réponse immunitaire du SNC

3.2.1 *Les peptides antibactériens*

Depuis la découverte du premier peptide antibactérien par le Professeur Boman en 1980, plus de 800 autres molécules ont été caractérisées. Les peptides antimicrobiens (AMPs pour AntiMicrobial Peptides) sont des composants majeurs de la réponse immunitaire innée. Ils constituent le principal moyen de défense de nombreux organismes vivants et sont présents dans de nombreux phyla (Zasloff, 2002; Boman, 1995). Ils présentent un large spectre d'activité contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, les champignons filamenteux, les levures et même contre les protozoaires. (Radek et Gallo, 2007 ; Aley et al., 1994). Les AMPs sont généralement définis comme étant de petites protéines de moins de 100 acides aminés, souvent riches en résidus cystéines et arginine, cationiques (charge nette positive de +2 à +9), et présentant une hydrophobicité importante (~30 %). Ils sont classés en 4 groupes en fonction de leur structure secondaire : en feuillet- β (épingle à cheveux), en hélice α , en boucle (loop), ou linéaire (Park et Hahm, 2005).

Les deux plus grandes familles d'AMPs caractérisés chez les vertébrés sont représentées par les défensines et les cathélicidines. Les défensines sont des peptides de 3 à 5 kDa riches en résidus cystéines ayant une structure en feuillet- β . Chez l'homme, elles peuvent être divisées en deux groupes : les α -défensines (HNP-1 à HNP-4, HD-5 et HD-6), qui sont présentes au sein de certains granules sécrétoires des leucocytes ou de certaines cellules immunitaires spécialisées, et les β -défensines (HBD-1 à HBD-6) présentes au niveau des épithéliums de nombreux organes. Les défensines jouent un rôle prépondérant dans les pathologies infectieuses. Elles peuvent également moduler la réponse inflammatoire en présentant un effet chémoattractant vis-à-vis des monocytes et des cellules-T (Territo et al., 1989 ; Chen et al., 2004) et en stimulant l'expression de TNF α et d'IL-1 par ces dernières (Chaly et al., 2000). Les cathélicidines sont, quant à eux, des peptides antibactériens de structure hélicoïdale présentant un motif particulier, le domaine cathelin (cathepsin L inhibitor domain). A ce jour, une seule cathélicidine, la LL-37, a été identifiée chez l'homme (Durr et al., 2006). Comme les défensines, la LL-37 peut réguler la réponse inflammatoire et présente des activités chémoattractantes vis-à-vis de certaines cellules du système immunitaire adaptatif. La LL-37 est largement rependue dans l'ensemble du corps humain, au niveau des cellules épithéliales intestinales, respiratoires, de la peau mais également dans les leucocytes

(Durr et al., 2006). Une production de LL-37 est également détectée au niveau du liquide cébrospinal en cas de méningite.

Des peptides antibactériens appartenant à ces deux familles ont été mis en évidence au niveau du SNC des vertébrés. Ainsi chez l'homme, la défensine HBD-1 est exprimée constitutivement par les astrocytes, les cellules microgliales, et les fibroblastes des méninges. La HBD-2 s'avère, quant à elle, inductible et n'est détectée qu'au niveau des astrocytes stimulés par des LPS ou par des cytokines proinflammatoires (IL-1 β et TNF α) (Hao et al., 2001). Ainsi, d'après Hao et ses collaborateurs, les astrocytes seraient la source locale de production de défensines dans le cerveau (Hao et al., 2001).

Un homologue de la cathélicidine humaine LL-37 a récemment été identifié dans le cerveau de rat (Bergman et al., 2005). Cette molécule, nommée rCRAMP, présente notamment une activité antimicrobienne dirigée contre la bactérie à Gram négatif neuro-pathogénique *Neisseria meningitidis* (Bergman et al., 2005). Des analyses ont révélé la présence du peptide rCRAMP et de son transcrit dans différentes parties du SNC du rongeur (dans les bulbes olfactifs, le cervelet et le cordon médullaire). Des cultures primaires de cellules issues de l'hippocampe, du stratum, du cervelet et du cordon médullaire se sont toutes révélées exprimer le transcrit de rCRAMP (Bergman et al., 2005).

Ces différents peptides antibactériens pourraient donc posséder un rôle non négligeable dans la défense du SNC en cas d'invasion par des micro-organismes pathogènes. De plus, leur production pourrait contribuer à favoriser la migration des cellules immunitaires périphériques vers le SNC. Cependant, Il est important de préciser que lors de ces études, aucun transcrit ou peptide n'a été détecté dans les neurones. Ce qui tendrait à signifier que les neurones de vertébrés ne seraient pas impliqués dans la synthèse de peptides antibactériens. De plus, les voies d'activation conduisant à la production de ces peptides dans le SNC n'ont pas encore été identifiées.

3.2.2 Les cytokines et chimiokines

La réponse immunitaire innée engendrée au sein du SNC va permettre de faire face rapidement à une éventuelle infection par des micro-organismes. Cependant, l'aide du système immunitaire adaptatif est crucial à l'élimination totale de la plupart de ces micro-organismes que ce soit dans des organes périphériques comme dans le SNC. Pour cela, les cellules composant le SNC peuvent produire des chimiokines afin d'attirer les cellules immunitaires présentes *in situ* ou au niveau périphériques au site d'infection (Glabinski et Ransohoff, 1999 ; Hayashi et al., 1995 ; Hausler et al., 2002). La figure 12 présente, d'une façon générale, les principaux rôles bénéfiques des cytokines proinflammatoires produites au cours de la réponse immunitaire innée du SNC des vertébrés.

Dans le SNC, les chimiokines ont pour principale source les astrocytes et les cellules microgliales. Les cellules endothéliales cérébrovasculaires et les neurones peuvent également exprimer, mais de façon moins importante, certaines chimiokines, telles que CCL2 (MCP-1), CCL4 (MIP-1 β), CCL5 (RANTES) et CXCL10 (IP-10) (Shukaliak et Dorovini-Zis, 2000 ; Ambrosini and Aloisi, 2004). La production de chimiokines par les astrocytes et les cellules endothéliales est importante du fait que ces cellules sont des composants de la BHE.

De manière générale, ces différents types cellulaires se mettent à produire ces chimiokines lorsqu'ils sont stimulés par certains ligands des TLRs (LPS, polyI:C, PGN, CpG) ou par des cytokines proinflammatoires (l'IFN γ , le TNF α et l'IL-1 β) (Carpentier et al., 2005 ; Farina et al., 2005). Ces chimiokines diffuseront alors dans le parenchyme cérébral et seront reconnues par des récepteurs présents sur les cellules immunitaires locales (cellules microgliales) ou périphériques (Jiang et al., 1998 ; Albright et al., 1998). Les cellules ainsi recrutées participeront à l'élimination des éléments pathogènes.

Les récepteurs présents sur les cellules microgliales sont présentés dans le tableau 4. Les principales chimiokines produites par les cellules microgliales, appartenant aux familles de chimiokines CXC et CC, sont présentées dans le tableau 5.

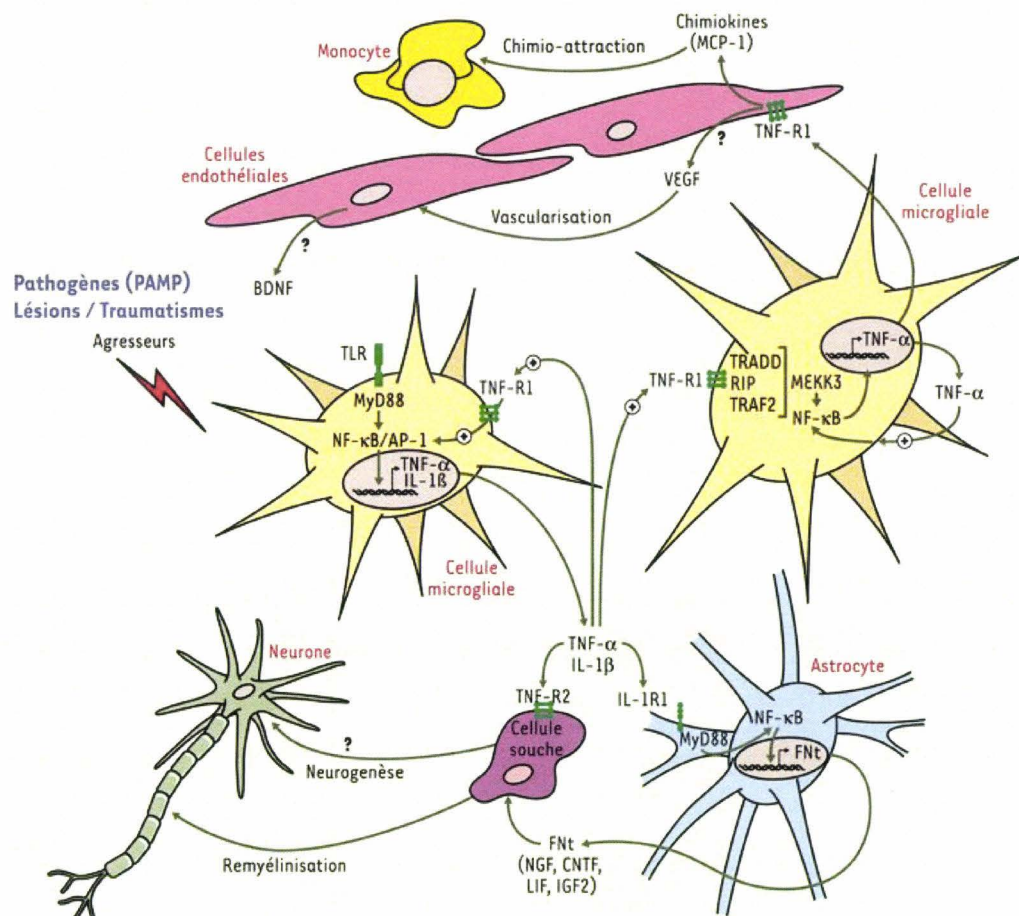


Figure 12 : Rôles bénéfiques des cytokines proinflammatoires au cours de la réponse immunitaire innée du SNC des vertébrés (d'après Blais et Rivest, 2003)

Tableau 4 : Récepteurs de chimiokines exprimés par les cellules microgliales en réponse à un stimulus infectieux (d’après Kielian, 2004).

Récepteur de chémokines		Ligands
Famille CXC	CXCR4	CXCL12/SDF-1
Famille CXC3CR1	CXC3CR1	CX3CL1/fractlakine
Famille CC	CCR2	CCL2/MCP-1, CCL7/MCP-3, CCL13/MCP-4
	CCR3	CCL5/RANTES, CCL7/MCP-3, CCL8/MCP-2, CCL11/eotaxin, CCL13/MCP-4
	CCR5	CCL3/MIP-1alpha, CCL4/MIP-1beta, CCL5/RANTES, CCL8/MCP-2

MIP : macrophage inflammatory protein ; MCP : monocyte chemoattractant protein ; RANTES : regulated upon T cell expressed and secreted; SDF: stromal cell-derived factor.

Tableau 5 : Chimiokines produites par les cellules microgliales en réponse à un stimulus infectieux (d’après Kielian, 2004).

Familles de chémokines		Nom commun	Nom systématique
CXC	ELR-containing	IL-8 (humain) MIP-2 (souris) KC (souris)	CXCL8 CXCL2 CXCL2
	ELR-non containing	IP-10	CXCL10
CC		TCA-3	CCL1
		MCP-1	CCL2
		MIP-1alpha	CCL3
		MIP-1beta	CCL4
		RANTES	CCL5

IL : interleukine ; MIP : macrophage inflammatory protein ; IP-10 : interferon gamma-inducible protein of 10 kDa ; MCP : monocyte chemoattractant protein ; RANTES : regulated upon T cell expressed and secreted

Les diverses chimiokines produites lors de la réaction inflammatoire peuvent présenter des activités chémoattractantes plus ou moins larges. En effet, alors que la CCL2/MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein*) possède un pouvoir chémoattractant vis-à-vis de l'ensemble des monocytes circulants (Karpus, 2001), la CXCL8 attire, quant à elle, spécifiquement les neutrophiles (Peterson, 1997 ; Hua, 2000). La chémokine CX3CL1, appelée également fractalkine est à la fois chémoattractante vis-à-vis des cellules microgliales, des cellules NK et des cellules T (Tong et al., 2000 ; Maciejewski-Lenoir et al., 1999). Elle est exprimée constitutivement par les neurones alors que les cellules microgliales expriment constitutivement son récepteur associé, le CX3CR1. Cela démontre l'existence d'une communication continue entre ces deux types cellulaires (Bacon et Harrison, 2000 ; Petrovsky et Harrison, 1998).

De nombreuses autres cytokines, n'appartenant pas aux différentes familles de chimiokines, seront également produites par le SNC lors de la réponse inflammatoire. Les plus étudiées d'entre elles sont les cytokines proinflammatoires TGF β 1, IL-1 β , IL-6, TNF α et EMAP II (*Endothelial Monocytes Activating Polypeptide II*) (Schluesener et al. 1999 ; Kreutzberg 1996 ; Aloisi 2001). Certaines seront exprimées de façon intense et constante par toutes les cellules microgliales activées, c'est notamment le cas du TGF β 1 (Kiefer et al., 1998) et d'EMAP II (Schluesener et al., 1999 ; Mueller et al., 2003). D'autres ne seront exprimées que par une partie de ces cellules, et ce pendant une courte durée, comme il en est le cas du TNF α (Gregersen et al., 2000). Or, si certaines de ces cytokines ne sont pas considérées comme des chimiokines en tant que telle, quelques unes présentent tout de même des effets chémoattractants sur les cellules immunitaires périphériques. C'est notamment le cas de la cytokine proinflammatoire EMAP II (Kao et al. 1992). Ce polypeptide d'environ 18 kDa dérive du clivage d'un précurseur proEMAP II, identique au complexe P43 qui est l'un des trois composants du complexe aminoacyl-tRNA synthétase (Shalak et al., 2001). Les cellules microgliales activées produisent intensément cette cytokine (Schluesener, 1999). Pour cette raison, elle est d'ailleurs utilisée en tant que marqueur d'activation des cellules microgliales lors d'une infection ou d'une lésion du SNC (Mueller et al., 2003 ; Schluesener et al. 1997 et 1999). La cytokine proinflammatoire EMAP II présente de nombreuses activités biologiques. Celles-ci sont résumées dans le tableau 6. Au sein du SNC, la cytokine proinflammatoire EMAP II apparaît comme un important modulateur de l'inflammation lors des réactions de l'immunité innée en induisant l'activation, l'attraction et la transmigration des

cellules macrophagiques périphériques vers le SNC (Kao et al., 1992 et 1994 ; Knies et al., 1998 ; Schluesener et al., 1997, 1999).

Certaines cytokines peuvent également présenter des activités antibactériennes. Ainsi, la cytokine CCL20/MIP3 α (*Macrophage Inflammatory Protein*) présente une activité antibactérienne comparable à celle du peptide antibactérien HBD2 (cf. paragraphe suivant). Les chimiokines CXCL9, CXCL10, CXCL11 et l'IFN γ sont actives contre la bactérie à Gram négatif *Escherichia coli* et contre la bactérie à Gram positif *Listeria monocytogenes* (Cole et al., 2001). La cytokine CXCL7, produite par les neutrophiles est, quant à elle, active contre la bactérie à Gram négatif *E. coli*, et contre les bactéries à Gram positif *Staphylococcus aureus* et *Cryptococcus neoformans*. D'une manière globale, des tests antibactériens réalisés *in vitro* à partir d'une trentaine de chimiokines, incluant des membres des familles CC, CXC et CX3C, ont démontré que plus de la moitié de ces cytokines possédaient une activité antibactérienne (Yang et al., 2003). Les différentes chimiokines possédant des activités antibactériennes sont résumées dans le tableau 7.

La synthèse de ces différentes cytokines peut cependant, si elle est trop importante, induire une neuroinflammation qui pourrait s'avérer délétère. En contre partie, le SNC va donc produire des cytokines antiinflammatoires dont le rôle principal sera d'inhiber les fonctions immunitaires des macrophages périphériques et des cellules microgliales. C'est notamment le cas du TGF- β et de l'IL-10 produits principalement par les astrocytes (Peress et al., 1996 ; Liu et al., 1994). Ainsi, l'ajout de ces cytokines sur des cultures de cellules microgliales préalablement activées par des LPS entraîne la diminution de leur capacité à exprimer des constituants du CMH II et à produire certaines cytokines proinflammatoires (O'Keefe et al., 1999 ; Ledebor et al., 2000). Ces résultats impliquent donc l'existence de mécanismes d'autorégulation de la production de cytokines dans le SNC.

Tableau 6 : Fonctions biologiques et propriétés de la cytokine EMAP-II et de son précurseur, la protéine P43 (d'après van Horssen, 2006).

<i>Effet(s) biologique(s), propriété(s)</i>	<i>proEMAP/p43</i>	<i>EMAP-II</i>	<i>Littérature</i>
Manipulation of EC coagulation properties		X	Kao et al, 1992
Upregulation of TF expression		X	Kao et al, 1992
Monocyte/macrophage, granulocyte chemotaxis		X	Kao et al, 1992
Proinflammatory response (footpad)		X	Kao et al, 1992
Directed leucocyte migration		X	Kao et al, 1994
Increase intracellular calcium levels		X	Kao et al, 1994
Release of von Willebrand factor by EC		X	Kao et al, 1994
Upregulation of E- and P-selectin by EC		X	Kao et al, 1994
Induction of TNF production by monocytes		X	Kao et al, 1994
Thrombohemorrhage in Meth A		X	Kao et al, 1994
Induction of TNF-sensitivity (i.v.) of MC-2 (i.t.)		X	Kao et al, 1994
Induction of TNF-sensitivity (i.v.) of B16, HT-1080 (i.t.)		X	Marvin et al, 1996
Auxiliary component of multi RS complex	X		Quevillon et al, 1997
Induction of TNF-sensitivity (i.v.) of TAV in human melanoma (EMAP-gene transfer)	X	X	Wu et al, 1999 Gnant et al, 1999
Association with (autoimmune) brain diseases, injury	X	X	Schluesener et al, 1997 ; Mueller et al, 2003 ; Brabeck et al, 2002
Neovascularization during lung development	X	X	Schwarz et al, 1999
High serum levels during pregnancy	X	X	Wellings et al, 1999
Inhibition of primary and metastatic tumor growth		X	Schwarz et al, 1999 Schwarz et Schwarz, 2004
Antiangiogenic, apoptosis of growing EC		X	Schwarz et al, 1999 Berger et al, 2000
Association with apoptosis-induced influx of leucocytes into reperused kidneys		X	Daemen et al, 1999
Apoptosis of corneal EC after transplantation		X	Liu et Gottsch, 1999
Position in multi RS complex near midpoint	X		Norcum et Warrington, 2000
Upregulation of TNF-R1 mRNA in EC		X	Berger et al, 2000
Improvement of photodynamic therapy effects		X	Ferrario et al, 2000
mRNA expression related to TNF-SAM2 effectively in glioblastoma patients		X	Yamamoto et al, 2000
Induction of proinflammatory genes (like TNF)	X		Ko et al, 2001 Park et al, 2002
Reduction of keratitis via anti-angiogenesis		X	Zheng et al, 2001
Binding to aATP synthase on tumor cells	X	X	Chang et al, 2002
Expression negatively regulated by PGE(2)	X		Battersby et al, 2002
Dose-dependent role in angiogenesis	X		Park et al, 2002
Induction of TNF-sensitivity (ILP) of BN175	X	X	Lans et al, 2002 Lans et al, 2004
Marker for microglial cells in brain		X	Mueller et al, 2003
Association with macrophages in uveal melanoma		X	Clarijs et al, 2003
Affects EC actin cytoskeleton (at high dose)		X	Keezer et al, 2003
Induction of lymphocyte apoptosis in solid tumors		X	Murray et al, 2004
Involved in rapamycin decreased inflammation		X	Nuhrenberg et al, 2005 Zohlhofer et al, 2004
Induction of vasodilatation via NOS		X	Tsai et al, 2004
Induction of fibroblast proliferation, wound repair	X		Parket al, 2005
Binds to heparan sulphate at low pH		X	Chang et al, 2005
Induction of DOC1 gene expression in EC		X	Tandle et al, 2005
Binding to a5b1 integrin, blocks adhesion of EC to FN		X	Schwarz et al, 2005
TNF-R1 and TRADD mobilization in EC		X	Van Horssen et al, 2006
Correlation with response of melanoma patients to TNF-based ILP		X	Van Horssen et al, 2006

Tableau 7 : Activité antibactérienne de différentes chimiokines. (d'après Yang et al., 2003).

<i>Chémokines</i>		<i>Activité anti-bactérienne</i>	
<i>Famille</i>	<i>Membre</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
CXC	CXCL1/Gro α	++++	+
	CXCL2/Gro β	+++	+
	CXCL3/Gro γ	+++	+
	CXCL6/GCP-2	-	-
	CXCL8/IL-8	-	-
	CXCL9/MIG	++++	++++
	CXCL10/IP-10	++++	+++
	CXCL11/I-TAC	+++	+++
	CXCL12/SDF-1	++++	++
	CXCL13/BCA-1	++++	++
	CXCL14/BRAK	++	+
CX3C	CX3CL1/fractalkine	-	-
C	XCL1/lymphotactin	++++	++
CC	CCL1/I-309	++++	+
	CCL2/MCP-1	-	-
	CCL3/MIP-1 α	-	-
	CCL5/RANTES	-	-
	CCL7/MCP-3	-	-
	CCL8/MCP-2	+	-
	CCL11/eotaxin	+++	++
	CCL13/MCP-4	+++	-
	CCL16/LEC	-	-
	CCL17/TARC	+++	++
	CCL18/PARC	++++	+++
	CCL19/MIP-3 β	++++	-
	CCL20/MIP-3 α	++++	++
	CCL21/SLC	++	+++
	CCL22/MDC	++++	+++
	CCL25/TECK	+++	++
	CCL27/CTAK	-	-

Pourcentage de bactéries tuées: +++, >80%; ++, 60%–79%; +, 40%–59%; -, 20%–39%; -, <20%.

GCP-2, Granulocyte chemotactic protein-2; BCA-1, B cell-attracting chemokine-1; BRAK, breast- and kidney-expressed chemokine; RANTES, regulated on activation, normal T expressed and secreted; LEC, lymphatic endothelial cell; TARC, thymus and activation-regulated chemokine; PARC, pulmonary and activation-regulated chemokine; SLC, secondary lymphoid-tissue chemokine; MDC, macrophage-derived chemokine; TECK, thymocyte-expressed chemokine; CTAK, cutaneous T-cell-attracting chemokine.

3.2.3 Les dérivés du monoxyde d'azote

Le NO (monoxyde d'azote) est synthétisé à partir de L-arginine par une famille d'enzymes, les NO synthases (NOS). Chez les vertébrés, il existe 3 NOS : la NOS neuronale (nNOS), la NOS inductible (iNOS), et la NOS endothéliale (eNOS) (Stuehr, 1999). La libération de NO joue un rôle essentiel dans de multiples fonctions physiologiques réparties dans l'ensemble de l'organisme.

Dans le SNC, le NO agit comme un neuromédiateur, participant à l'acquisition de la mémoire et coordonnant de nombreuses activités neuronales (Prast et Philippu, 2001). Il est également impliqué dans la vascularisation (Bogdan et al., 2000). Cette petite molécule diffuse facilement au travers des membranes et ne nécessite pas de récepteurs. Le NO peut être libéré en grandes quantités lors de certaines réactions immunitaires. Il est notamment impliqué dans la physiopathologie suivant une inflammation ou un choc septique. En effet, le NO possède des propriétés antibactériennes et antivirales car il va inhiber la transcription et dégrader les ARNs.

Les nNOS et eNOS sont exprimées de façon constitutive dans le SNC et participent à d'importantes fonctions physiologiques (Kim et al., 2000). La iNOS, qui est quant à elle inductible, est impliqué dans de nombreuses pathologies et infections du SNC. Les cellules microgliales ainsi que les astrocytes expriment fortement l'iNOS et produisent beaucoup de NO en réponse à diverses cytokines proinflammatoires (IL-12, IFN γ , TNF α) ou en présence de ligands des TLR9 et TLR2, cela *in vitro* (Olson et Miller, 2004 ; Ebert et al., 2005 ; Edwards et al., 2000 ; Esen et al., 2004 ; Esen et al., 2006 ; Iliev et al., 2004 ; Dalpke et al., 2002). Il est probable que les cellules microgliales contribuent à la production de NO *in vivo*. Cependant il est difficile d'évaluer la part de cette production par ces cellules par rapport à celle des astrocytes ou des macrophages périvasculaires.

Outre le fait que la production de NO soit un facteur non négligeable dans la défense du SNC contre les micro-organismes pathogènes, il peut également s'avérer particulièrement toxique pour le SNC en contribuant à la destruction des tissus nerveux. Le NO peut notamment entraîner l'apoptose ou la nécrose des neurones et des astrocytes en provoquant la libération d'acides aminés excitateurs, tel que le glutamate (Leist et al., 1997 ; Stuehr, 1999). La neurotoxicité du NO est due à sa capacité à réagir avec l'anion superoxyde pour former un oxydant puissant, le péroxynitrite (ONOO $^-$). Il s'agit du produit de combinaison du monoxyde

d'azote NO et de l'anion superoxyde (O^-) produit par les cellules microgliales suite à la détection de composés bactériens ou par les neurones suite à une augmentation de la concentration en calcium cytosolique (Brown et Bal-Price, 2003). Le peroxy-nitrite est une molécule cytotoxique très réactive impliquée dans des pathologies allant de l'athérosclérose aux maladies neurodégénératives. Cette molécule va inhiber la respiration mitochondriale en agissant sur les complexes respiratoires et sur l'ATP synthétase (Borutaite et al., 2000). Il peut également engendrer des dommages au niveau de l'ADN des cellules en agissant sur la poly ADP-ribose polymérase (PARP), qui est une enzyme de réparation de l'ADN (Novelli et al., 1988). Un autre dérivé du NO, le N_2O_3 , formé par l'interaction du NO avec l'oxygène, peut également avoir des effets toxiques sur les neurones. Il va nitrosyler les résidus aminés ou thiols des protéines ce qui va altérer leurs fonctions physiologiques et mener à une mort neuronale (Brown et Bal-Price, 2003). De manière générale, une libération excessive de NO induit la nécrose des cellules et non leur apoptose. En effet, de par son action sur la production mitochondriale d'ATP, les cellules auront une énergie limitée et parfois non suffisante pour déclencher les mécanismes d'apoptose. A terme, la nécrose va conduire à augmenter l'inflammation du tissu nerveux. Il est donc nécessaire que la synthèse de NO soit limitée lors de la réponse inflammatoire. Les astrocytes pourraient en partie jouer ce rôle de régulateurs notamment en induisant l'expression de cytokines antiinflammatoires telles que le $TGF\beta$ et l'IL-10 (Pousset et al., 2000). Ces cytokines peuvent diminuer de la production de NO, notamment en inhibant l'expression de la iNOS (Vincent et al., 1997).

IMMUNITÉ DU SYSTÈME NERVEUX CENTRAL DES INVERTEBRÉS

Durant les trente dernières années, les invertébrés se sont avérés être de formidables outils en neurosciences et en immunologie (Clarac et Pearlstein, 2007). Beaucoup d'importantes découvertes ont ainsi pu voir le jour et permettent de mieux comprendre les processus neurobiologiques tels que la conduction axonale, ou encore la transmission synaptique (voir revue de Sattelle et Buckingham, 2006). L'utilisation des invertébrés a également permis de mieux comprendre les mécanismes de l'immunité innée présents chez les vertébrés, de par la caractérisation des voies de signalisation régulant la production des peptides antibactériens ou encore la découverte de certains récepteurs impliqués dans la reconnaissance des micro-organismes pathogènes (Hoffmann et Reichhart, 2002). Chez les invertébrés, l'immunité adaptative n'existe pas. Leur défense repose donc totalement sur une réponse immunitaire innée.

Cependant, et encore à l'heure actuelle, très peu de données nous renseignent sur l'immunité intrinsèque du SNC des invertébrés. Dans ce chapitre, nous passerons en revue les quelques acteurs immunitaires connus chez ces animaux. Alors que certains d'entre eux sont directement présent au niveau du SNC, d'autres sont des éléments propres à l'immunité périphérique et dont l'implication dans la protection du SNC reste spéculative.

1 LES EFFECTEURS CELLULAIRES

Chez les vertébrés, le SNC est en association directe avec un grand nombre de cellules macrophagiques, qu'il s'agisse de macrophages professionnels ou non (Hauwel et al., 2004). Une telle association a également été décrite chez certaines espèces d'invertébrés. Ainsi, plusieurs études ont montré que les cellules microgliales étaient également présentes au sein du SNC de certains arthropodes, telle que la blatte *Periplaneta americana* (Howes et al., 1993), de certains mollusques, telle que la planorbe *Planorbarius corneus* (Pezurri et al., 2004), ainsi que chez certains annélides, telle que chez la sangsue médicinale *Hirudo medicinalis* (von Bernhardt et Muller, 1995). De nombreuses études ont permis de montrer que le comportement et le rôle de ces cellules microgliales apparaît très proche de celui observé chez les vertébrés. En effet, ces cellules d'invertébrés répondent rapidement aux

dommages du système nerveux. Elles sont alors capables de se déplacer et de s'accumuler au niveau du site de lésion de leur chaîne nerveuse. Une fois à destination, ces cellules phagocytent les débris cellulaires occasionnés (von Bernhardt et Muller, 1995). Chez certains invertébrés, comme chez la sangsue médicinale, ces cellules microgliales seraient également impliquées dans les processus de régénération de la chaîne nerveuse en libérant certaines substances favorisant la croissance axonale (Duan et al., 2005 ; von Bernhardt et Muller, 1995).

La sangsue médicinale *H. medicinalis*, grâce à l'organisation particulièrement favorable de son système nerveux, s'est avérée être un modèle idéal quant à l'étude du comportement et du rôle de ces cellules microgliales dans la réponse immunitaire du SNC des invertébrés (Duan et al., 2005 ; von Bernhardt et Muller, 1995 ; McGlade-McCulloh et al., 1989). Plusieurs études ont ainsi montré que les phénomènes migratoires de ces cellules dépendaient notamment d'une production de monoxyde d'azote (NO) libéré lors de l'inflammation du système nerveux. Le NO est en effet fortement libéré au niveau du site de lésion lors des cinq premières minutes suivant un dommage de la chaîne nerveuse (Shafer et al., 1998 ; Kumar et al., 2001). Cette production de NO est d'ailleurs corrélée avec une surexpression d'eNOS par les cellules gliales entourant les connectifs lésés ainsi que par les cellules microgliales accumulées au site de lésion (Shafer et al., 1998). Des expériences ont ainsi montré, grâce à l'utilisation d'un anticorps spécifique bloquant l'action de cette eNOS, que l'accumulation des cellules microgliales au niveau du site de lésion était réprimée sans pour autant que leur capacité migratrice soit inhibée (Chen et al., 2000). Ces résultats suggèrent donc que le NO agirait sur l'accumulation des cellules microgliales au site de lésion par le biais d'un mécanisme dose dépendante. En effet, la libération de NO pourrait activer et attirer les cellules microgliales vers le site de lésion. Une fois sur place, la migration de ces cellules serait stoppée par l'importante concentration de NO localisée au niveau de la lésion, entraînant ainsi leur accumulation (Duan et al., 2003).

Comme nous l'avons vu précédemment, la libération de NO est un phénomène également observé chez les vertébrés chez qui il pourrait également participer à l'activation et au recrutement des cellules microgliales. Toutefois, chez les vertébrés, la production d'autres molécules, telles que des chémokines, participeraient également au recrutement des cellules microgliales. Même si l'on peut supposer l'implication de telles molécules chez les invertébrés, à ce jour aucune molécule identifiée dans le SNC des invertébrés n'a été rapportée comme ayant une activité chémoattractante vis-à-vis des cellules microgliales.

D'autres similitudes entre les vertébrés et les invertébrés peuvent aussi être rapportées, notamment en ce qui concerne l'infiltration dans le système nerveux de cellules immunitaires périphériques. Chez les invertébrés, les cellules immunitaires circulantes sont représentées par les hémocytes. Chez certains mollusques, comme l'aplysie (*Aplysia californica*), il a été montré qu'une ligation du nerf nocicepteur entraînait une réaction inflammatoire menant à une hyperexcitabilité nerveuse localisée. Cette inflammation se traduirait par le recrutement des hémocytes périphériques au niveau de la lésion (Ottaviani et Franceschi, 1996). Ce phénomène est donc comparable au recrutement leucocytaire observé chez les vertébrés. De plus, des expériences de stimulation des nerfs nocicepteurs et des neurones de l'aplysie par des LPS ont également été réalisées. Ces résultats indiquent que la présence de LPS pourrait aussi conduire à une hyperexcitabilité des nerfs, des neurones ainsi que des cellules microgliales présentes dans les connectifs (Clatworthy et Grose, 1999). Les observations ont également indiqué que cette hyperexcitabilité pouvait être amplifiée lors du recrutement des hémocytes circulants (Clatworthy et Grose, 1999). En outre, il a été démontré que les hémocytes accumulés au niveau de l'infection étaient capables d'exprimer une cytokine-like homologue au TGF β des vertébrés (Franchini et al., 1996 ; Farr et al., 1999). Celle-ci serait impliquée dans l'excitabilité nerveuse chez l'aplysie (Zhang et al., 1997). Chez les vertébrés, le TGF β est connu pour jouer un rôle important dans la réponse immunitaire innée du SNC (Gorelik et al., 2002 ; Letterio et Roberts, 1998). Ces expériences ont donc démontré que la présence de bactéries pathogènes au niveau du SNC de l'aplysie pouvait mener à la mise en place d'une réaction inflammatoire similaire à celle observée chez les vertébrés et entraînant le recrutement de cellules immunitaires présentes au niveau périphérique de l'animal. Ainsi, les hémocytes recrutés auraient un rôle à la fois dans la phagocytose des éléments pathogènes mais également dans la production de facteurs proinflammatoires impliqués dans la réponse immunitaire et visant à combattre l'infection.

L'importance du recrutement hémocytaire a également été démontré chez la drosophile *Drosophila melanogaster*. Au cours de son embryogénèse, les hémocytes sont en permanence recrutés au niveau de son SNC. Ces cellules participent à la phagocytose des corps apoptotiques et ainsi éviter l'accumulation des débris cellulaires pouvant altérer le bon développement de son SNC (Sonnenfeld et Jacobs, 1995). Toutefois, cette fonction n'est pas uniquement menée par les hémocytes. Ainsi, certaines cellules gliales présentes au niveau du SNC de la drosophile, telles que les cellules gliales sub-périneurales peuvent englober les débris cellulaires d'une manière comparable à celle observée par les cellules microgliales de vertébrés (Sonnenfeld et Jacobs, 1995). Les hémocytes et les cellules sub-périneurales jouent

donc un rôle majeur dans le développement du SNC de la drosophile. De plus, ces mêmes types cellulaires sont également impliqués dans l'homéostasie du SNC chez l'adulte (Kretzschmar et Pflugfelder, 2002). Cependant, à ce jour, aucune étude n'a montré que ces cellules puissent être impliquées dans la défense immunitaire du SNC de cet animal lors de l'invasion de celui-ci par des micro-organismes.

2 LES EFFECTEURS MOLECULAIRES

2.1 Les récepteurs

Certaines familles de récepteurs connus chez les vertébrés sont également impliquées dans la protection du SNC des invertébrés. Ainsi, une étude a montré que les cellules gliales de drosophile exprimaient des récepteurs homologues à la famille des récepteurs scavenger de vertébrés (Abrams, 1992). Ces récepteurs pourraient jouer un rôle dans la reconnaissance des PAMPs, comme il en est le cas chez les vertébrés.

De nombreux homologues de la famille des TLRs ont également été identifiés chez les invertébrés. Toutefois, peu d'entre eux s'avèrent être exprimés au niveau du SNC de ces animaux. Chez la crevette *Litopenaeus vannamei*, le récepteur IToll, homologue au récepteur Toll de *Drosophila melanogaster*, a récemment été caractérisé (Yang et al., 2007). Au cours de cette récente étude, des expérimentations réalisées par RT-PCR ont permis de montrer que ce récepteur été exprimé chez la crevette au niveau des hémocytes, du cœur, des différentes parties du système digestif, des nerfs périphériques, des organes reproducteurs, mais également au niveau du cerveau (Yang et al., 2007). Cependant, les résultats de cette étude n'indiquent pas de façon précise la localisation du site d'expression de ce gène au sein du SNC de ce crustacé.

A ce jour, l'étude la plus détaillée a été réalisée chez le nématode *Caenorhabditis elegans*. Un récepteur, nommé Tol-1, homologue au récepteur Toll de drosophile, a été identifié chez ce nématode. Chez l'adulte, l'expression du gène *tol-1*, codant le récepteur Tol-1, est confinée au système nerveux de l'animal et plus particulièrement au niveau des neurones pharyngiens (Pujol et al., 2001). Au cours de cette étude, Pujol et ses collaborateurs ont d'abord démontré que ce gène était indispensable au bon développement du système nerveux de ce nématode. Toutefois, il serait également impliqué dans la défense immunitaire du SNC chez l'adulte. En effet, les individus appartenant à la souche sauvage sont capables

d'exercer un bactériotropisme négatif afin de fuir les bactéries pathogènes présentes dans leur environnement (Pujol et al., 2001 ; Pradel et al., 2007). Or, des individus adultes pour lesquels le gène *tol-1* a été réprimé par ARN interférence perdent cette faculté d'évitement (Pujol et al., 2001). Pujol et ses collaborateurs suggèrent donc que *tol-1* serait un gène dont le produit identifierait les microbes pathogènes et qu'il n'induirait non pas la synthèse de molécules antibactériennes mais une réaction comportementale préventive permettant à *C. elegans* et de fuir les bactéries qui lui seraient pathogènes (Pujol et al., 2001).

D'autres acteurs impliqués dans l'immunité des organes périphériques (le corps gras des insectes par exemple) ou dans la circulation (sang ou liquide coelomique) ont été retrouvé dans le système nerveux des invertébrés sans que leur fonction immunitaire n'est été clairement établie (Lemaître et al., 1997). C'est notamment le cas de plusieurs protéines appartenant à la famille des lectines (Pace et al., 2002) ainsi que de certains membres appartenant à la famille Rel tels que Dif et Cactus, une molécule homologue de I κ B, connus comme étant des régulateurs transcriptionnels de plusieurs peptides antibactériens. Ces molécules ont été notamment localisé au niveau du système nerveux de la larve de drosophile (Cantera et al., 1999; Pace et al., 2002).

2.2 Les cytokines

De nombreuses molécules apparentées aux cytokines des vertébrés ont été identifiées chez les invertébrés, en particulier chez les échinodermes, les annélides et les mollusques. La présence de telles molécules impliquerait donc l'existence chez ces animaux, d'une communication moléculaire qui pourrait être similaire à celle observée entre les différents types cellulaires composant le parenchyme nerveux des vertébrés. Cependant, peu d'études relatent de la présence de ces cytokines au niveau du SNC des invertébrés ainsi que de leur fonction au cours de la réponse immunitaire innée.

L'étude de Sonetti et Peruzzi a notamment permis de mettre en évidence la présence de molécules homologues à la famille des cytokines de vertébrés, telles que l'IL1 β et le TNF α , dans le système nerveux de la planorbe *Planorbarius corneus*. Alors que ces deux cytokines s'avèrent être exprimés de façon constitutive par les neurones, les cellules microgliales de ce mollusque n'exprimeraient quant à elles ces molécules qu'une fois stimulées par des LPS (Sonetti et Peruzzi, 2004). Ces données sont cohérentes avec celles obtenues chez les vertébrés montrant également une augmentation de l'expression de ces deux

molécules par les cellules microgliales suite à une stimulation aux LPS (Koppel et al., 2000). Cependant, la fonction de ces molécules dans la réponse immunitaire de la planorbe reste encore indéterminée.

Chez la sangsue *Hirudo medicinalis*, un homologue de la protéine humaine CRIP (Cystein Rich Intestinal Protein), la *HmCRIP*, a été identifié dans le SNC et plus précisément au niveau des neurones sérotonergétiques (Emes et al., 2003). Chez les rongeurs, la protéine CRIP, initialement identifiée au niveau de l'intestin, pourrait selon plusieurs auteurs être un facteur important dans le règlement de la réaction immunitaire inflammatoire. En effet, elle serait notamment impliquée dans la modulation des cytokines de types Th1 (IL-2 et IFN γ) et Th2 (IL-6 et IL-10) (Cousins et Lanningham-Foster, 2000). En effet, lors de la réaction inflammatoire, la surexpression de CRIP inhiberait la synthèse des cytokines de type Th1 et induirait celle de type Th2 (Cousins et Lanningham-Foster, 2000). Ceci pourrait induire le recrutement de cellules immunitaires vers le SNC (Lanningham-Foster et al., 2002). Chez *Hirudo*, *HmCRIP* est rapidement surexprimée suite à une lésion du SNC (dès 6 heures). Emes et ses collaborateurs suggèrent donc que *HmCRIP* jouerait, comme chez les vertébrés, un rôle dans la modulation de l'environnement antiinflammatoire exercé au sein du SNC de la sangsue et participerait à la mise en place de la défense immunitaire. Ils suggèrent également qu'elle pourrait favoriser la réduction des dommages cellulaires de la chaîne nerveuse (Emes et al., 2003).

Une cytokine homologue au TGF β des vertébrés a été identifiée chez *C. elegans*. Cette molécule, appelée DBL-1, est notamment exprimée au sein du système nerveux de l'animal, et principalement au niveau de quelques neurones pharyngiens. Cette molécule serait impliquée dans la régulation de la taille des nématodes au cours du développement (Morita et al., 1999). Cependant, suite à une stimulation par les LPS, l'expression du gène *dbl-1* dans le système nerveux est augmentée, suggérant ainsi que les neurones puissent être activés par la présence de bactéries à Gram négatif. Cette hypothèse a notamment été corrélée par le fait que des individus mutants récessifs pour ce gène s'avèrent présenter une plus faible résistance lorsqu'ils sont placés en présence de la bactérie à Gram négatif *Serratia marcesens* (Mallo et al., 2002). Chez ce nématode, DLB-1 se fixe sur le récepteur membranaire sérine/thréonine kinase composé par la dimérisation de SMA6 et de DAF4, qui va alors phosphoryler le complexe protéique cytoplasmique Smad (composé de SMA3/SMA2/SMA4). Celui-ci va alors interagir avec le facteur de transcription MEF-2, d'une façon encore mal comprise, pour activer la synthèse de certaines molécules impliquées dans la réponse immunitaire innée telles

que certains lysozymes, comme par exemple la molécule LYS-8 (Millet et Ewbank, 2004). L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que DLB-1 pourrait jouer un rôle primordial dans la réponse immunitaire inductible chez *C. elegans*, comme il en est le cas pour le TGF β chez les vertébrés, et ce notamment au niveau du SNC. Cependant, les différents gènes codant pour les éléments moléculaires impliquées dans la cascade d'activation de DLB-1 ne seraient exprimés que dans l'intestin et dans l'hypoderme de l'animal mais pas au niveau de son système nerveux (Wang et al., 2002 ; Millet et Ewbank, 2004).

Quelques études ont également porté sur l'identification de molécules homologues au TNF. L'une d'entre elle, la TNF-like nommée Eiger, est exprimée dans le SNC de la drosophile (Igaki et al., 2002). Chez les vertébrés, le TNF est une cytokine libérée lors d'une réaction inflammatoire, cependant sa surproduction peut engendrer une altération des tissus nerveux. L'action d'Eiger dans le SNC de la drosophile semblerait être similaire à celui du TNF chez les vertébrés. En effet, une surexpression du gène codant pour Eiger induirait la dégénérescence des cellules nerveuses oculaires (Igaki et al., 2002).

Certains systèmes nerveux, ou cellules nerveuses d'invertébrés, sont également capables de réagir à des cytokines natives ou recombinantes d'origine mammalienne. Ce type d'expériences impliquerait donc l'existence de récepteurs communs entre les vertébrés et les invertébrés. Chez la lymnée (*Lymnaea stagnalis*), l'utilisation d'IL-2 et d'IL-4 recombinantes humaines peuvent moduler les courants chlorures induits par le GABA. Alors que l'IL-2 va agir en réduisant ce courant, l'IL-4 va quant à elle l'augmenter (Sawada et al., 1992). Chez l'aplysie (*Aplysia kurodai*), l'ajout de TNF recombinant peut diminuer la conductance potassique de certains neurones (Sawada et al., 1990). Le TGF β va, quant à lui, favoriser l'excitabilité neuronale (Zhang et al., 1997). Chez le gastéropode *Onchidium sp*, le TNF α et l'IL-1 d'origine humaine exercent un effet hyper-polarisateur sur certains neurones de ce mollusque en jouant sur les courants sodiques (Mimura et al., 1994). Certaines cytokines peuvent également jouer sur le comportement des cellules microgliales. C'est notamment le cas de la cytokine antiinflammatoire IL-10 humaine qui inhiberait les capacités migratrices de ces cellules vers le site de lésion chez la moule *Mytilus edulis* (Stefano et al., 1999).

2.3 Les dérivés du monoxyde d'azote

Tout comme chez les vertébrés, plusieurs études ont démontré que le NO était impliqué dans les phénomènes immunitaires du système nerveux des invertébrés. Des NO

synthases (NOs) ont ainsi été détectées et/ou caractérisées dans le système nerveux d'insectes telle que la drosophile (Muller, 1997; Sengupta et al., 2003), de mollusques telle que l'aplysie (Moroz, 2000), ou encore d'annélides telle que la sangsue médicinale (Shafer et al., 1998). Chez ces invertébrés, le NO s'avère être particulièrement impliqué dans l'accumulation des cellules microgliales au niveau du site de lésion du système nerveux et ce d'une manière dose dépendante, comme nous l'avons expliqué précédemment.

Chez l'escargot d'eau douce *Planorbarius corneus*, des études ont montré que les neurones et les cellules microgliales étaient capables d'induire la synthèse d'iNOS dans le cas d'un stress immunitaire engendré suite à une stimulation par des LPS (Pezurri et al., 2004). Ces résultats suggèrent que la production et la régulation du NO par le système nerveux des invertébrés serait un facteur primordial de la réponse immunitaire induite par un stress bactérien. Cependant, l'expression de nNOS dans les neurones ne varie pas en cas de stimulation (Pezurri et al., 2004).

Chez les invertébrés, le NO semble également intervenir dans les processus de régénération du système nerveux. Il permettrait notamment de favoriser le développement des cônes de croissance (Haase and Bicker, 2003; Wright et al., 1998), et des neurites (Di Cosmo et al., 2000; Van Wagenen and Rehder, 2001).

2.4 Les molécules antibactériennes

La présence de molécules à activités antibactériennes, tels que des peptides antibactériens, n'a pas été clairement mise en évidence dans le système nerveux des invertébrés.

Récemment, l'analyse de la banque d'EST embryonnaire réalisée à partir du SNC de l'aplysie a montré la présence d'une molécule présentant une importante homologie avec la théromacine (Moroz et al., 2006). La théromacine est un peptide antibactérien précédemment identifié chez la sangsue *Theromyzon tessulatum* et s'exprimant au niveau des cellules graisseuses en contact avec la cavité coelomique de l'animal (Tasiemski et al., 2004). Cependant, encore aucune étude ne nous renseigne quant au rôle du à l'expression de cette théromacine-like dans le système nerveux de l'aplysie.

Plusieurs neuropeptides et hormones peuvent présenter des similarités structurales et fonctionnelles avec les peptides antibactériens. Les neuropeptides sont des molécules

présentant un rôle important dans la signalisation synaptique de tous systèmes nerveux. Certaines de ces molécules peuvent être impliquées dans la réponse immunitaire innée du SNC que ce soit chez les vertébrés ou chez les invertébrés. Plusieurs de ces molécules ont été identifiées au niveau du SNC des invertébrés. Cependant, le rôle que pourraient avoir ces différentes molécules dans la réponse immunitaire du SNC chez ces animaux est encore mal connu.

Ainsi, le peptide B, une molécule provenant de la maturation du neuropeptide proenképhaline A, a été caractérisé chez la sangsue *Theromyzon tessulatum* (Tasiemski et al., 2000). Cette molécule présente une forte homologie avec le peptide B bovin et partage la même activité dirigée contre les bactéries à Gram positif (Tasiemski et al., 2000). Chez la sangsue théromyzon, la proenképhaline A s'avère être présentes au niveau des neurones et des cellules circulantes. Cependant, la maturation de cette molécule, menant à la libération le peptide B, n'a pas encore été démontrée au sein des neurones de cet invertébré.

L'analyse du génome de *C. elegans* a notamment permis d'identifier 32 gènes codant pour des NLPs (Neuropeptides-like protéines) (Nathoo et al., 2001). Quelques NPLs recombinantes ont été fabriquées. L'une d'entre-elles, la NPL-31 s'est avérée posséder une activité antifongique contre *Drechmeria coniospora*, *Neurospora crassa*, et *A. fumigatus* (Couillault et al., 2004). Cette molécule serait induite suite à l'activation du récepteur TIR-1, qui est homologue au SARM de vertébrés (Liberati et al., 2004). La NLP-31 pourrait jouer un rôle dans la défense immunitaire de ce nématode (Couillault et al., 2004). Cependant, alors que certaines NLPs sont exprimées par les neurones de l'animal adulte, d'autres, telle que la NLP-31 ne le sont pas (Nathoo et al., 2001). De plus, le gène *tir-1* ne s'avère être exprimé qu'au niveau de l'hypoderme de l'animal mais pas au niveau des neurones.

CHAPITRE I

Implication des neurones et des cellules gliales dans la réponse antibactérienne du système nerveux central de la sangsue médicinale

Afin d'assurer sa protection contre d'éventuels agents microbiens, le SNC des vertébrés est capable de mettre en place une réponse immunitaire innée très élaborée. Celle-ci sera principalement assurée par les cellules gliales capables de produire un large panel de molécule impliquées dans la réaction immunitaire, telles que des cytokines, des chémokines ou encore des peptides antimicrobiens. Ces derniers sont considérés comme des composants clés de la réponse immunitaire innée, que ce soit chez les vertébrés comme chez les invertébrés. A ce jour, trois peptides antimicrobiens ont été mis en évidence au sein du SNC des mammifères. Il s'agit des défensines HBD-1 et HBD-2 et de la cathélicidine rCRAMP (Hao et al., 2001 ; Bergman et al., 2005). Ces différentes molécules, exprimées par les cellules microgliales et/ou par les astrocytes, pourraient jouer un rôle non négligeable dans la défense du SNC de ces animaux lors d'une infiltration par des micro-organismes.

L'objectif principal de ce travail était de déterminer si les peptides antimicrobiens participaient également aux mécanismes immunitaires mis en place au sein du SNC de la sangsue médicinale *Hirudo medicinalis* comme il en est le cas chez les mammifères.

Pour cela, nous avons dans un premier temps recherché la présence de peptides antimicrobiens dans des extraits de SNC de sangsue. Pour ce faire, des expériences de purification par RP-HPLC combinées à des tests antibactériens ont été réalisées. Cette approche a abouti à l'isolement et à la caractérisation de deux nouveaux peptides antimicrobiens: la neuromacine et l'*Hm*-lumbricine. La neuromacine est une molécule présentant une forte homologie avec la théromacine précédemment décrite chez la sangsue *Theromyzon tessulatum* (Tasiemski et al., 2004). L'*Hm*-lumbricine est, quant à elle, une molécule homologue à la lumbricine-1 isolée initialement chez le lombric *Lumbricus rubellus* (Cho et al., 1998). Des expériences d'HIS et de RT-PCR réalisées sur cellules uniques montrent que ces deux molécules sont exprimées par les neurones et par les cellules microgliales de la sangsue. Par ailleurs, des analyses par PCR quantitative indiquent que l'expression des gènes codant pour ces peptides est augmentée lors d'une stimulation

bactérienne. Enfin, des expériences d'immunohistochimie, réalisées sur des chaînes nerveuses axotomisées et stimulées par des bactéries, montrent une synthèse de ces peptides au niveau du site de lésion de la chaîne nerveuse, entre autres par les cellules microgliales s'y étant accumulées. De manière originale, l'utilisation d'un modèle de chaînes nerveuses partiellement déplétées en cellules microgliales indique également que l'accumulation de peptides au site d'axotomie résultait également d'une production neuronale.

Cette étude a donc permis de démontrer que le SNC de la sangsue médicinale *H. medicinalis* était capable de mettre en place une réponse immunitaire passant par une production de peptides antibactériens.

De plus, notre travail démontre pour la première fois une synthèse de peptides antibactériens par les neurones d'un invertébré.

Neurons and glia contribute to the antibacterial response by the CNS of the medicinal leech

D. Schikorski, V. Cuvillier Hot, M. Leippe^ζ, E. Macagno^ψ, M. Salzet and A. Tasiemski*

Laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides, CNRS FRE2933, Groupe immunité antimicrobienne, Université des Sciences et Technologies de Lille1, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

ζ Department of Zoophysiology, Zoological Institute, University of Kiel, Olshausenstr. 40, 24098 Kiel, Germany.

ψ Section of Cell and Developmental Biology, Division of Biological Sciences, University of California, San Diego, La Jolla, California 92093-0380, USA.

The nucleotide sequences reported in this paper have been submitted to the GenBank™/EBI Data Bank with accession numbers EU156754, EU156755, EU156756 and EU164975

*Address correspondence to: Aurélie Tasiemski, Laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides, CNRS FRE2933, Groupe immunité antimicrobienne, Université des Sciences et Technologies de Lille1, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France. Fax : (333) 20.43.40.54. Phone: (333) 20 33 59 57; Email: aurelie.tasiemski@univ-lille1.fr

ABSTRACT

Unlike mammals, the leech central nervous system (CNS) has a strong capacity to restore normal function following trauma. The potential roles of two newly characterized antimicrobial peptides in the antiinfectious process of the leech CNS were addressed. Our data provide evidence that microbial components differentially induce the transcription, by neurons as well as microglial cells, of both antimicrobial peptide genes, the products of which accumulate rapidly at sites in the CNS undergoing regeneration following axotomy. These data are the first reporting the neuronal synthesis of antimicrobial peptides and their participation in the neural immune response in an invertebrate CNS. Thus, the leech CNS appears as an excellent model system for studying the interactions between neural immunity and neural repair mechanisms.

INTRODUCTION

Because of its multiple vital functions, it is critical that the central nervous system (CNS) be successfully defended against pathogens. Until recently, this organ was considered to be immunologically inert and isolated from the peripheral immune system. However, it is now well established that immune surveillance and inflammatory responses do occur within this compartment ¹. Indeed, in response to either cerebral injury or systemic bacterial infection, the CNS launches a well organized immunological reaction that encompasses both neural components and peripheral immune system cells. Within the mammalian CNS, resident glial cells, including astrocytes and microglia, have been shown to initiate a characteristic innate immune response by producing and releasing antimicrobial peptides, cytokines and chemokines ². These circulating molecules promote the destruction of the invading bacteria, the permeabilization of the blood brain barrier (BBB), and the recruitment of peripheral leukocytes to the CNS and the activation of their effector functions, including further production of cytokines as well as phagocytosis by peripheral macrophages. The specific outcome of this neuroinflammatory response, which has both beneficial and detrimental aspects, depends on the context of the insult and on the duration of the inflammation. On the positive side, increased immune activity rapidly initiates the killing of bacteria and the removal of apoptotic cells and cellular debris, while also playing an important role in neuroprotection and repair by inducing the production of neurotrophic factors. In fact, several recent observations suggest that induction of regeneration of normal CNS function may depend critically upon the co-initiation of an immune response ³. On the negative side, excessive and/or chronic glial reactivity, in conjunction with the presence of adaptive immune cells within the CNS, can damage the CNS by inducing neuronal death and by blocking axonal myelination. An important question that remains unanswered is how the vertebrate immune system can be both friend and foe to the damaged tissue. Some of the difficulty in obtaining an answer probably lies in the conflation of the innate and adaptive immune responses, which makes the vertebrate immune response quite complex and difficult to dissect.

In this context, we have begun a detailed study of the immune response that can be evoked in the injured CNS of an invertebrate, namely the medicinal leech (*Hirudo medicinalis*), in which the immune response appears to lack a deleterious component. Invertebrates, being devoid of adaptive immunity, are excellent model systems for exploring the molecular basis of innate immunity. For example, the initial evidence for the pivotal role

of the Toll receptor family in immunity was discovered in *Drosophila*, and only later in mammals ⁴. Another example is the discovery of the first antimicrobial peptides by Hans Boman in the butterfly *Hyalophora cecropia* ⁵. Antimicrobial peptides are now considered as important effectors of the innate immune systems of both invertebrates and vertebrates ⁶.

Most reports on immune effectors in invertebrates have tended to focus on their involvement in the systemic antiinfectious response. However, some studies have described the presence of immune molecules in the nervous systems of insects and nematodes, both members of the ecdysozoan group. Indeed, several Toll-like receptors (TLR) and some molecules of the TLR signalling pathway have been detected in glial and neuronal cells of *Drosophila*, and appear to have a role in neural development in the larvae ⁷. In *Caenorhabditis elegans*, an ortholog of the *Drosophila* toll gene was shown to be expressed in pharyngeal neurons, where it participates in defensive behaviour by discouraging the worm from ingesting pathogenic bacteria ⁸. In the medicinal leech, a member of the lophotrochozoan group, Emes *et al.* (2003) reported that several central neurons express HmCRIP, an ortholog of the mammalian Cysteine Rich Intestinal Protein (CRIP) that is known to regulate the inflammatory response through control of Th1/Th2 differentiation in rodents ⁹.

Several features make the CNS of the medicinal leech particularly attractive as a model system for the exploration of interactions between the nervous and immune systems. These features include simplicity, a fixed number of neurons, and consistency from animal to animal, which allow the recognition, characterization and repeated study of identified neurons, at all developmental stages and following specific perturbations, such as mechanical or septic trauma ¹⁰. The leech CNS is comprised of a fixed number of midbody segmental ganglia linked to each other by longitudinal nerves known as connectives. Most segmental ganglia have a complement of ~400 neurons and 8 giant glial cells, along with a large population of microglial cells.

In the context of the observations we report here, however, the most important feature is the capacity of the medicinal leech CNS to regenerate and restore normal function in response to injury. If the nerve cord of this annelid is crushed or partially cut, axons grow across the lesion and conduction of signals through the damaged region is restored within a few days, even when the nerve cord is removed from the animal and maintained in culture. By contrast, when the mammalian spinal cord is injured, regeneration of normal connections generally fails. In the leech, the process of regeneration begins with a rapid activation of

microglial cells leading to their accumulation at the lesion site. Like their counterparts in the mammalian brain, leech microglial cells are involved in phagocytosis of damaged tissue ¹¹ .

The leech nerve cord consists of a chain of interconnected segmental ganglia that resides within the ventral blood sinus. It is encapsulated by a tough fibrous sheath that may, like the mammalian blood-brain barrier, limit the exchange of macromolecules and cells with the blood which continuously bathes it. The virtually intact CNS (except for the cut lateral nerves) can be easily removed from the animal and maintained in culture for weeks in the absence of peripheral immune system components and blood cells that might infiltrate the CNS after injury. Consequently, studies can be focused exclusively on the immune response of the CNS itself.

In the study reported here, we sought to determine whether the injured leech CNS is able to regenerate connections *ex vivo* in the presence of bacteria isolated from the natural environment of this annelid, and if so, whether this involves an antiinfectious process which relies on antimicrobial peptides. Two novel antibacterial peptides, neuromacin and *Hm-lumbricin*, were isolated from the medicinal leech nervous system and molecularly characterized. We obtained evidence that microbial components differentially induce the transcription of both genes in the leech CNS. We also found that neuromacin and *Hm-lumbricin*, which are expressed by microglial cells and by neurons themselves, accumulated at the cut ends of nerves, a location where they might maximally exert their antimicrobial activity. To the best of our knowledge, this is the first report describing the role of antimicrobial peptides in neural immunity and regeneration in the CNS of an invertebrate.

RESULTS

More successful regeneration of the leech CNS under septic than under sterile conditions

Sectioning of one side of the paired connective nerve linking adjacent segmental ganglia was performed on excised nerve cords maintained in culture (shown schematically in Fig. 1A). To monitor the progress of nerve repair, micrographs of the damaged nerve cords were taken every 24 h, in the presence or absence of bacteria. Under sterile conditions, as documented in Figure 1B, restoration of the connective nerve across the cut begins at ~4 days post-axotomy (panel J4) and is finished 4 days later. This is in line with the observations reported by Müller *et al*¹², who demonstrated that even the synaptic connections and normal functions of axotomized leech neurons were restored after 8 days. In comparison, nerve repair is evident sooner in the presence of bacteria, reconnection starting after 2 days or 3 days with live or heat-killed bacteria (Fig. 1C and 1D). In the case of incubation with live bacteria, however, signs of degeneration are soon present (Fig. 1C, panels J4), probably as a consequence of the uncontrollable expansion of the bacterial population in the rich culture medium, which becomes deleterious for the CNS. By contrast, incubation with a defined amount of heat-killed bacteria appears to promote the regeneration process relative to sterile conditions.

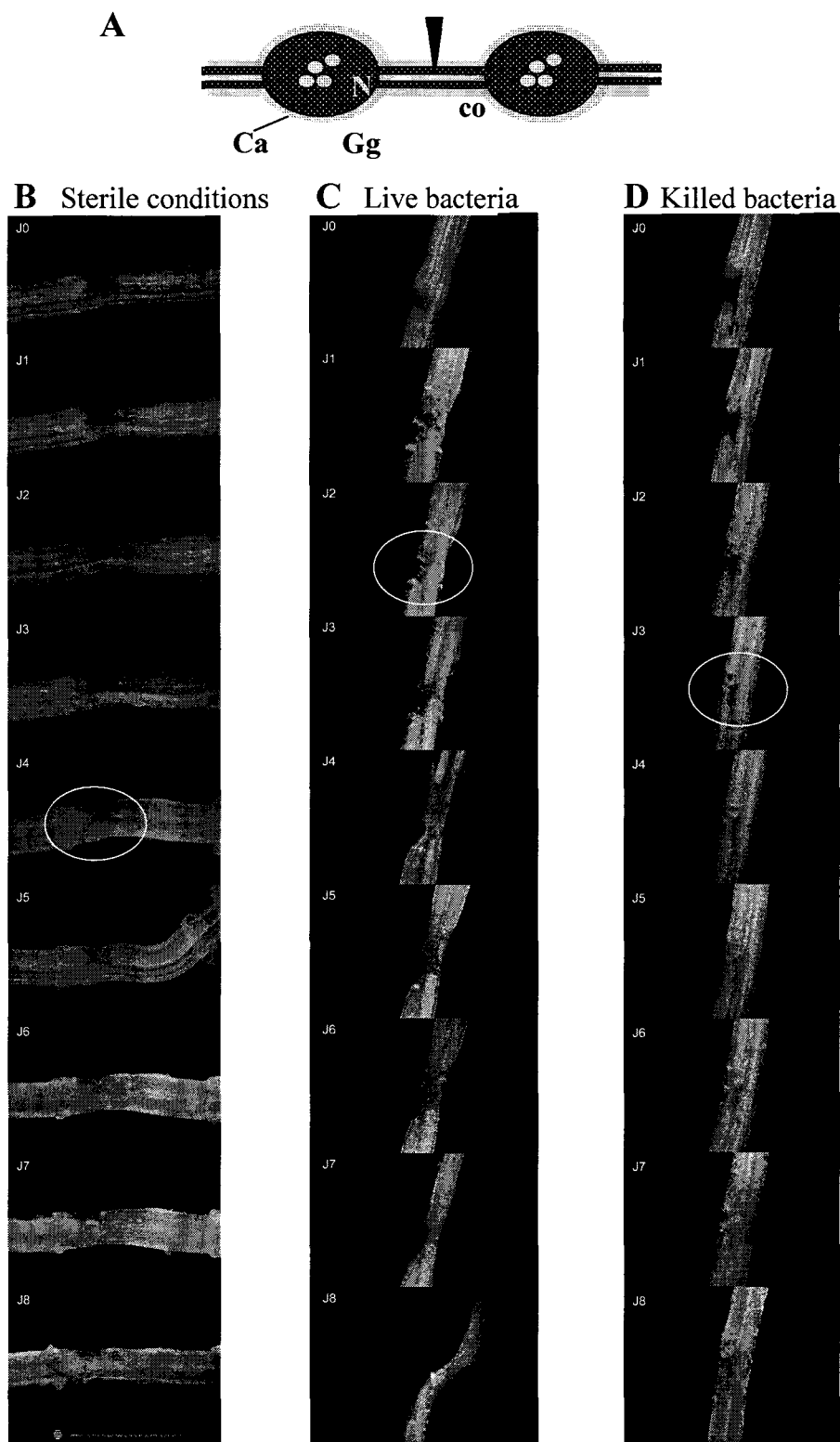


Figure 1: Effects on nerve regeneration of exposure of excised leech CNS to live or heat-killed bacteria (A) Diagram of the leech CNS in culture preparation. Neuron cell bodies (N) within ganglia (Gg) project axons into connectives (co) towards adjacent ganglia. V indicates the location of the cut of one of the two connectives linking two segmental ganglia. Microglial cells, evenly distributed in the nerve cord, are represented by dots. The nervous system is protected by a fibrous capsule (Ca). (B-D) Sequential micrographs, taken 24 hr apart, from one (J1) to eight days (J8) post-axotomy, documenting the regeneration of the severed connective nerve. (B) Preparation in sterile culture medium, (C) incubated with live bacteria, and (D) incubated with killed bacteria.

Purification and molecular characterization of antimicrobial peptides produced by the leech CNS

Neuromacin and *Hm*-lumbricin were isolated from a preparation of 100 nerve cords of *Hirudo medicinalis* under acidic conditions (Fig. 2). Identification and characterization of both molecules were performed by combining N-terminal sequencing by Edman degradation and MALDI-TOF mass spectrometry. To obtain information on the precursors, cDNA cloning was carried out (Fig. 3). Amino acid sequences deduced from the cDNAs allowed the conclusion that neuromacin and *Hm*-lumbricin are both cationic peptides with calculated pI of 8.49 and 9.16, respectively. Data bank analysis (BLAST program in Swiss-Prot) revealed that the primary structure of neuromacin was 67% identical to that of theromacin, an antibacterial peptide previously isolated by our group from the body fluid of the leech *Theromyzon tessulatum*¹³. Neuromacin was named according to its apparent homology to theromacin and its production being restricted to the nervous system. Searches in databases from Genbank and EST libraries revealed the presence of putative neuromacin-like gene products, often named theromacin-like in various invertebrate species such as the mollusks *Aplysia californica* and *Biomphalaria glabrata* and the annelid *Lumbricus rubellus* (Fig. 4A).

Blast analysis results (Fig. 4B) show that *Hm*-lumbricin shares 78% sequence identity with lumbricin-1, an antimicrobial peptide originally isolated from the earthworm *Lumbricus rubellus*, and 81% sequence identity with PP-1, a lumbricin-1-like gene product cloned from another earthworm, *Pheretima tschiliensis*^{14, 15}.

Precursor sequences were also deduced from the cDNA sequences (Fig.3). Signal PVI software analysis revealed that the N-terminal Asp of neuromacin is preceded by a putative signal peptide comprising Met₁-Pro₂₃ (Fig. 3A). This leads to the notion that neuromacin may be generated through conventional processing mechanisms and can be secreted to the extracellular medium. By contrast, *Hm*-lumbricin precursor lacks a typical signal sequence making its extracellular presence unlikely. It is noteworthy that several molecules devoid of a signal peptide have been shown to be secreted. For example, PP1, a lumbricin-like peptide found in *P. tschiliensis*, has been detected in the mucus it secretes¹⁴. In vertebrates, the rat PEBP was shown to be secreted into epididymal fluid despite lacking a signal peptide¹⁶.

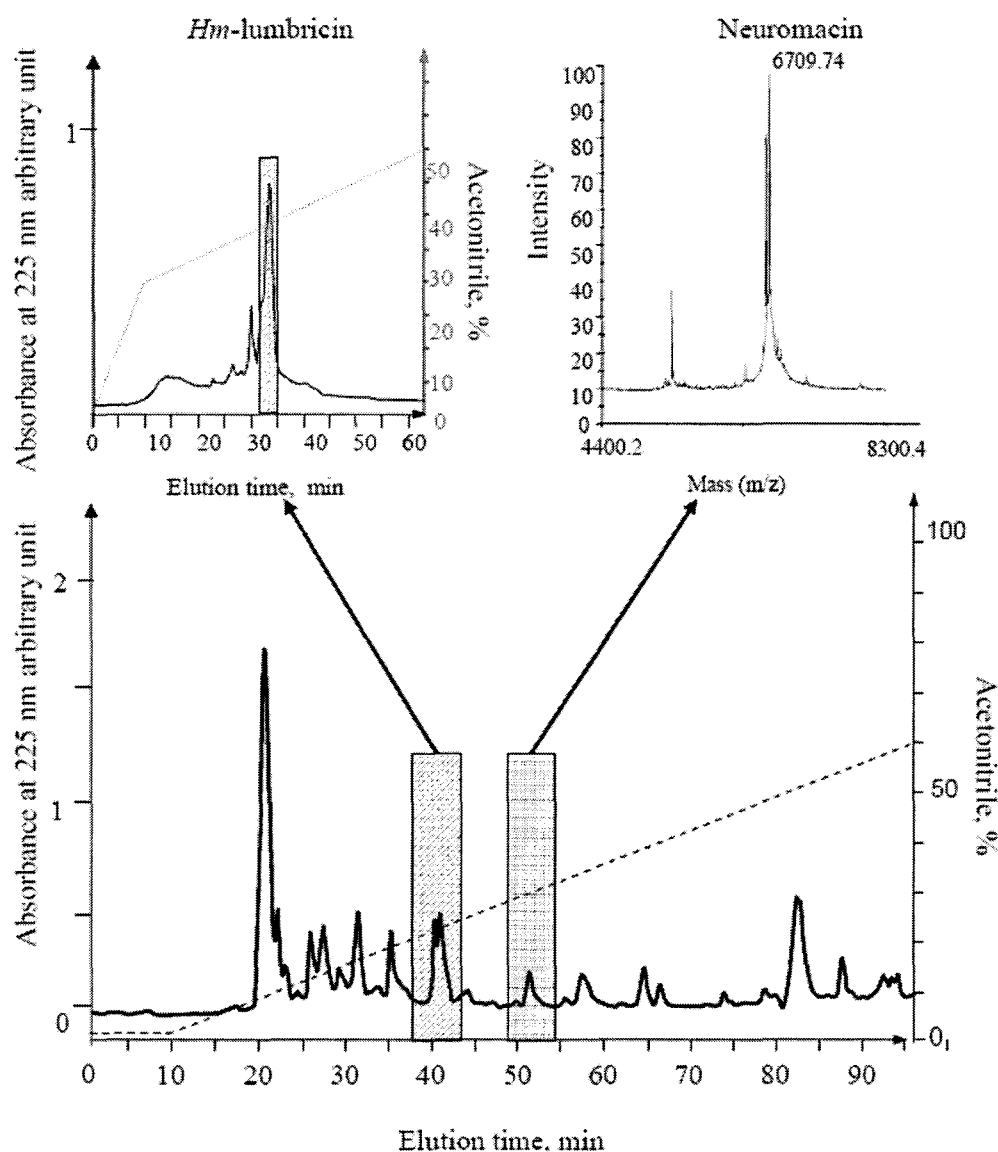


Figure 2: RP-HPLC of acidic extract obtained from leech nerve cords. After prepurification by solid phase extraction, the 60% ACN eluted material was loaded onto a C18 column (250x4 mm, Vydac). Elution was performed with a linear gradient of acetonitrile in acidified water (dotted line), and absorbance was monitored at 225 nm. Each individually collected peak was tested for its antimicrobial activity by solid plate assays. Two fractions containing neuromacin and *Hm-lumbricin* were found to be active. These fractions were further purified by two additional RP-HPLC purification steps and exact mass of purified peptides was determined by MALDI TOF-MS (left inset) Second RP-HPLC step of *Hm-lumbricin*. (right inset) Analysis of neuromacin by MALDI TOF-MS shows a m/z value of 6,709.74 MH⁺.

A

```

atggtctcttctcaacaagttgctctgctttgctctggtcttcatgatcttcggtgagttc
M A L L N K L L C F A L V F M I F G E F
gtgactcgggattgctacgaggactggagcaggtgcacgcctggaacgtcattcctgact
V T P D C Y E D W S R C T P G T S F L T
ggaatcctgtggaaagattgccacagccgttgcaaggaactcggtcacaggggagggaaga
G I L W K D C H S R C K E L G H R G G R
tgtgtggattcaccaagcaaacactgccttgagtcctcaagaacaacaaacagtgatcat
C V D S P S K H C P G V L K N N K Q C H
tgctactgatctgaagaattgttgaaatatgttgagattctggaaggacagtgaccatg
C Y
atttgtgattttctttaaaaatcacttagttaagtaaaaacattggcgatgattacgctt
acataataaagtattattttgcgattgcaccattccaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

B

```

atggttcagcaagtaacgagaggcaaaaggacaaaagaagttacggtgaaagggttcagcatg
M F S K Y E R Q K D K R S Y G E R F S M
ttcacaggccctcagttcatttcgcccccgagaggatcaaaccacaacaaattctccag
F T G P Q F I S P P E R I K P N K I L Q
tgggatggggaggggcatgccatttacgccacgtcgggggctgcagccgagtaaggagag
W D G E G M P I Y A T S G A A A E
cogattggcgactgaccagccaatatgaccaggcaatgacaagccaggatatttttggag
taattcgacattcagagacgggtccttaaaatgtctccaatgatttgtggaatcgattcga
gttttgaattaaacgatatctcaataaaatatcggttaaatttttgcaatttcgtcacca
aatattaatgtcaataaaatagttctttctaaagcgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

Figure 3: *Neuromacin* (A) and *Hm-lumbricin* (B) cDNAs. Deduced amino acid sequences of the ORF are shown under the nucleotide sequences. Signal peptide is in italics. Initiation and stop codons are framed. Polyadenylation signals are underlined.

A

<i>T.tessulatum</i>	AY434032	-----GCFEDWSRCSPTSRGTGVLWRDCDSYCKVCFKADRG-ECFDSP	43
<i>H.medicinalis</i>	EU164975	-----GCFEDWSRCSPTASATGVLWRSYCKVCFKADRG-ECYDSP	43
<i>L.rubellus</i>	DR008243	-----GCIYEDWSRCTPSTSWLTGILWKSCTNRCKE--QGHRGGNCRDSP	42
<i>Neuromacin</i>	EU156754	-----DCYEDWSRCTPGTSFLTGILWKDCHSRCKE--LGHRGGRCVDS	42
<i>B.glabrata</i>	CK989857	-----NVIGRCWDTSRCSSTWSRWFTGRVWLTRDGKCRE--LGKRGNCVMTF	46
<i>A.californica</i>	DQ489547	MDKKAANGGKEKGPLEACWDEWSRCTGWSSAGTGVLWKSDDQCKK--LGKSGGECVLT	58
		*::****: : **:* .*: ..*.*:*	

<i>T.tessulatum</i>	AY434032	SLNCPQR-LPNNKQCRCINARTAKDNRNPTCWA	75
<i>H.medicinalis</i>	EU164975	SLNCPHR-LPNNKQCRCINARTAKDNRNPTCWA	75
<i>L.rubellus</i>	DR008243	S-PCPG--LQNNKQCYCF-----	57
<i>Neuromacin</i>	EU156754	SKHCPGV-LKNNKQCHCY-----	59
<i>B.glabrata</i>	CK989857	S-TCPLS--SEAFQCQCYT-----	62
<i>A.californica</i>	DQ489547	S-TCPFTRTDKAYQCQCKK-----	76
		* ** : ** *	

B

<i>Lumbricin-1</i>	AF060552	MSLCISDYLYLTLTFSKYERQDKRPYSERKNQYTGPGQFLYPPERIPPQKVIKWNEEGLP	60
<i>PP-1</i>	AY167144	-----MYSKYERQDKRPYSERKDQYTGPGQFLYPPDRIPPSKAIKWNEEGLP	47
<i>Hm-lumbricin</i>	EU156756	-----MFSKYERQDKRSYGERFSMFTGPGQFISPPERIKPNKILQWDGEGMP	47
		:*****.*.*. :*****: **:*.*.*:***:***:	

<i>Lumbricin1</i>	AF060552	IYEIPGEGG---HAEPAAA-	76
<i>PP-1</i>	AY167144	MYEVLPGAGAKTAVEAAAE	67
<i>Hm-lumbricin</i>	EU156756	IYATS-----GAAAE	57
		:* ***	

Figure 4: Sequence comparisons of neuromacin and *Hm-lumbricin*. (A) Neuromacin (EU156754) was compared to theromacin, an antimicrobial peptide firstly characterized from the leech *Theromyzon tessulatum* (AY434032) and later from the medicinal leech (EU164975), the earthworm *Lumbricus rubellus* (DR008243) and the molluscs *Aplysia californica* (DQ489547) and *Biomphalaria glabrata* (CK989857). (B) *Hm-lumbricin* (EU156756) was compared to lumbricin-1, an antimicrobial peptide initially characterized from the earthworm *Lumbricus rubellus* (AF060552) and the Asian worm *Pheretima tschiliensis* (AY167144).

Biological activity of neuromacin and *Hm*-lumbricin

In liquid growth inhibition assay, the purified neuromacin was active against *Micrococcus nishiiyamentis* (MIC 1.95-3.8 μ M; MBC 7.8-15.6 μ M). No activity was found towards the Gram negative *A. hydrophila* at the same concentration. To investigate the mode of action of neuromacin against Gram positive bacteria, we used *B. megaterium* and the fluorescent dye SYTOX Green. Results of this assay demonstrate that neuromacin rapidly permeabilizes bacterial membranes and is thus potently active against these Gram-positives (Fig 5A). Since neuromacin contains four histidine residues in its primary structure (in contrast to none in theromacin), we evaluated the effect of a more acidic pH, at which the histidine residues are protonated, on the membrane-permeabilizing activity (Fig. 5B). The efficacy of neuromacin to induce membrane lesions in viable bacteria was found to be weaker at pH 5.2 than at pH 7.4. Within the measurement period, the activity of neuromacin against the target bacterium tested appeared to be over one order of magnitude lower than those for the well-known antimicrobial peptides cecropin P1 and magainin II. Similar activity against the Gram-negative representative *E. coli* was not detected up to a neuromacin concentration of 25 μ M (data not shown). We also measured the pore-forming activity of neuromacin to further characterize its mode of action by using a minimalistic membrane system. More precisely, we monitored the dissipation of a membrane potential induced in liposomes composed of azolectin, a crude phospholipid mixture from soy bean. Pore-forming activity was not detected at final concentrations up to 2 μ M, whereas the positive control alamethicin gave a very strong signal at 50 nM (data not shown).

Based on the amino acid homologies with lumbricin-1 (Fig 4B), we speculate that *Hm*-lumbricin and lumbricin-1 must have similar antimicrobial properties. Notably, the N-terminal sequence, which is the most conserved part between lumbricin 1 and *Hm*-lumbricin, has been shown by Cho *et al* to exhibit a stronger activity than the entire lumbricin-1 against fungi, Gram positive and Gram negative bacteria, without exerting any hemolytic activities¹⁴.

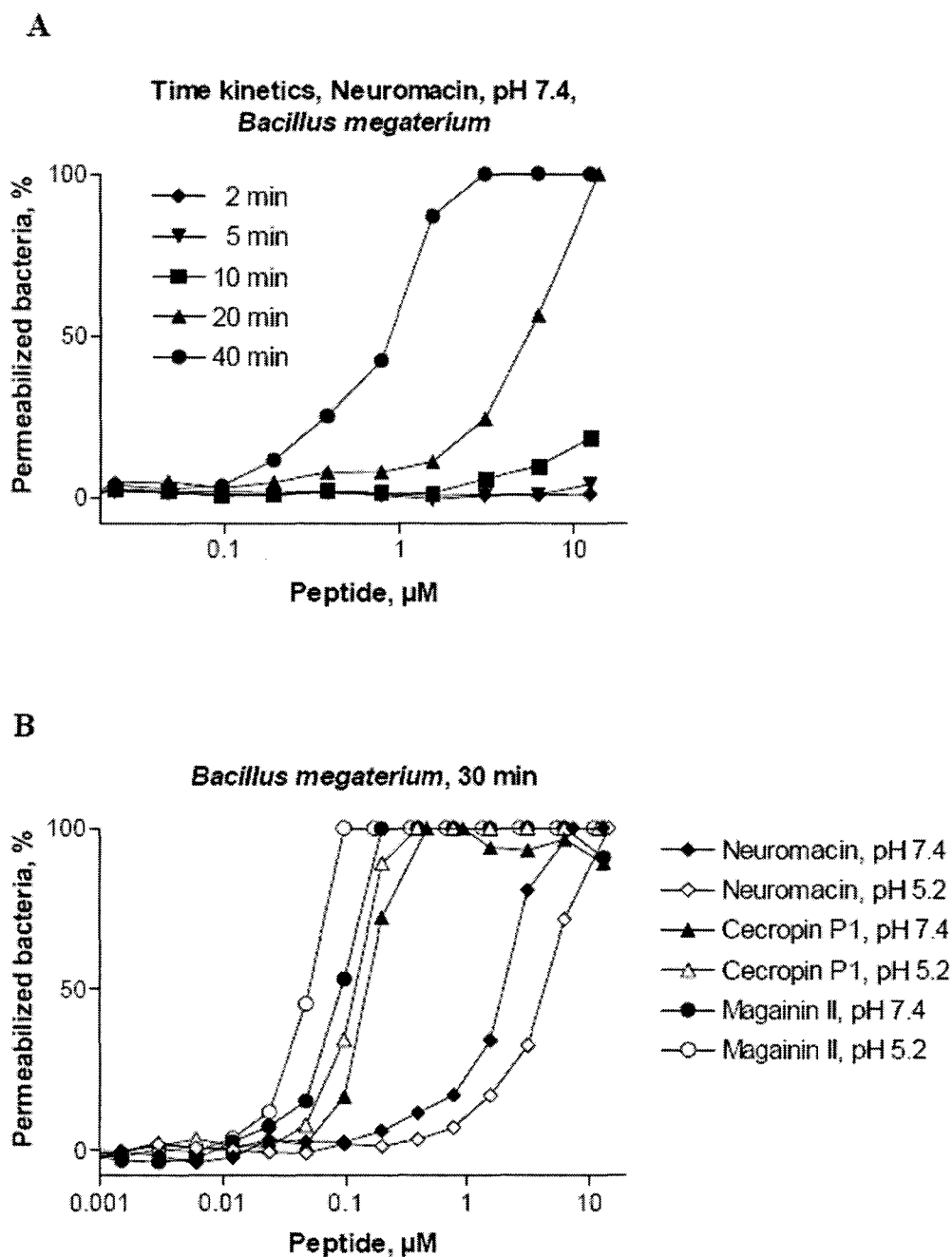


Figure 5: Membrane permeabilization of *B. megaterium* induced by neuromacin. Membrane damage of the bacteria was measured fluorometrically using the dye SYTOX Green. The binding of the dye to the DNA in membrane-compromised target cells resulted in an increase of fluorescence. Antibacterial activity of the peptides is expressed as a percentage of permeabilized bacteria. (A) Time kinetics of membrane permeabilization induced by neuromacin measured for different doses at various incubation periods. (B) Membrane permeabilizing effects of neuromacin (rhombs) in comparison with cecropin P1 (triangles) and magainin II (circles) after 30 min of incubation of *B. megaterium* with each peptide at various concentrations, at pH 5.2 (open symbols) and at pH 7.4 (closed symbols).

Synthesis of antimicrobial peptides by neurons and by microglial cells

Gene expression sites of neuromacin and *Hm-lumbricin* were investigated by single cell RT-PCR and by ISH (Fig. 6). Interestingly, both genes are expressed in neurons after septic exposure of the CNS. This is the first reported observation of the transcription of antimicrobial peptides by neurons in an invertebrate. Neuromacin and at a lower level *Hm-lumbricin* transcripts were also detected in microglial cells.

Specific induction of antimicrobial peptides genes in the leech CNS

Gene expression patterns of neuromacin and *Hm-lumbricin* during an induced immune response were investigated by real time PCR. As illustrated in figure 7A, neuromacin and *Hm-lumbricin* transcript levels were rapidly enhanced by bacterial challenge, but no significant changes were measured following axotomy under sterile conditions, indicating that the induction was not due to the axotomy itself, but rather to the incubation of the nerve cords with bacteria.

We have further attempted to analyze whether the leech nervous system was able to discriminate among different microorganisms. The data presented in Figure 7B indicate that treatment of the nerve cord with the gram positive bacterium *M. nishiiyamentis* induces an increase in both *Hm-lumbricin* and neuromacin mRNA levels, the first more pronounced than the second. In contrast, no significant change in neuromacin expression but a large increase in the level of *Hm-lumbricin* transcripts was observed following challenge with zymosan, a component of yeast membrane. This distinct pattern of induction appears to correlate with the activity of the peptides encoded by these genes. Indeed, the neuromacin gene, which encodes a product with anti-Gram positive activity, is induced by Gram positive bacteria, and the *Hm-lumbricin* gene, which encodes an anti-Gram positive and anti-fungal peptide, is induced by both Gram positives and zymosan. These results suggest that the leech CNS responds to infection with a pathogen-specific pattern of gene expression.

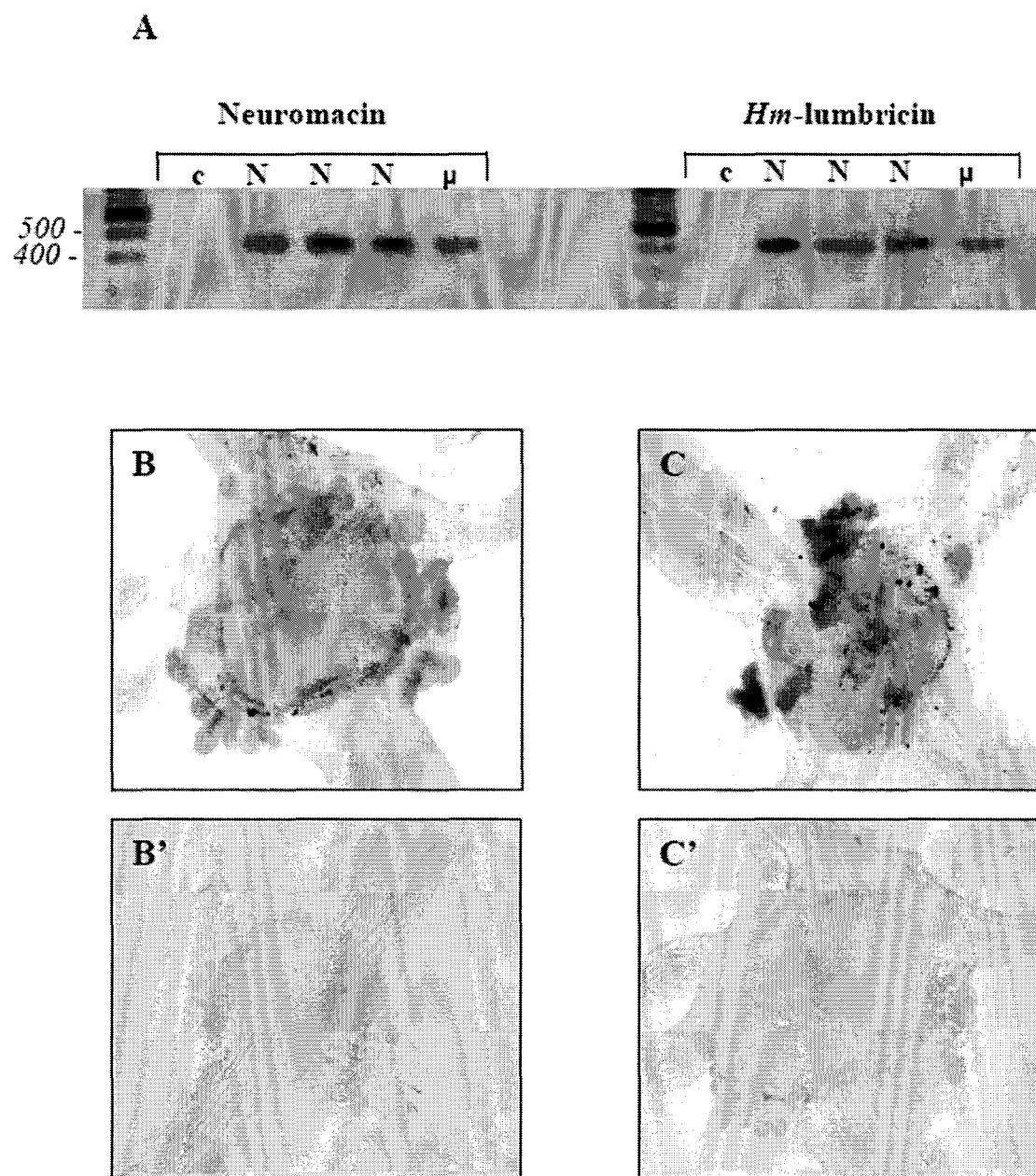


Figure 6: Analysis of neuromacin and *Hm-lumbricin* gene expression sites in isolated cells and in bacteria challenged nerve cords. Neuromacin (A) and *Hm-lumbricin* (B) transcripts were amplified by RT-PCR from single neurons (N) and from single microglial cells (μ) isolated from challenged nerve cords. The amplifications were performed with an oligodT as reverse primer to avoid any amplification of the genomic DNA. ISH with digoxigenin dUTP labeled neuromacin (B) and *Hm-lumbricin* antisense riboprobes (C) from nerve cords incubated for 6 hours with bacteria. No signals were detected with the neuromacin (B') and *Hm-lumbricin* (C') sense riboprobes.

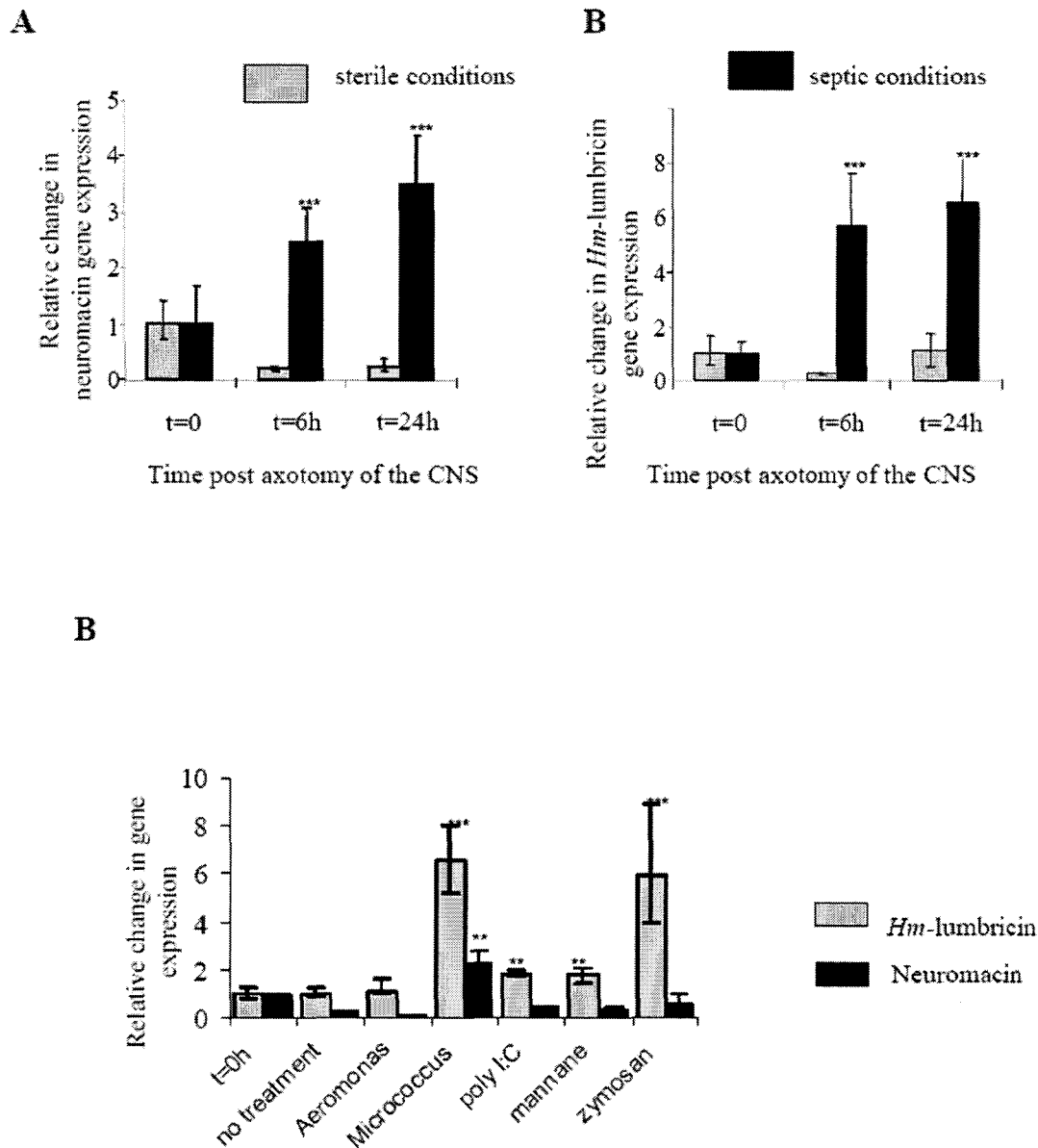


Figure 7: Quantification of the levels of expression of neuromacin and *Hm-lumbricin* in leech nerve cords by real time PCR analysis using the $\Delta\Delta C_t$ method. Analysis of RNA levels in an axotomized CNS was assessed 0, 6 h, and 24 h, after addition of a mix of heat killed *A. hydrophila* and *M. nishiyamentis* to the medium. (A) and 0h and 6h in presence of various microbial components (B). A plot of the log cDNA dilution versus ΔC_t was generated for each target gene tested to validate the qPCR experiments. The slopes of regression lines for neuromacin and *Hm-lumbricin* were 0.0698 and 0.0864 respectively suggesting equivalent efficiencies of amplification (data not shown). Treatment of triplicate data. Reference (18S) and targets were amplified in separate wells (n>10 in all cases). ***, P<0.001; **, P<0.01; for each conditions, the difference between the controls (t=0h) and the challenged nerve cords (t=6h) is highly significant (T-test).

Accumulation of antimicrobial peptides at the site of axotomy

To get further information on possible roles of both antimicrobial peptides in the immune response of the leech CNS, double staining was performed on challenged nerve cords at $t=0$ h and $t=6$ h post-axotomy by using Hoechst 33258 and either the anti-*Hm-lumbricin* polyclonal antibody or the anti-neuromacin polyclonal antibody (Fig. 8 and Fig. 9). Challenge with *M. nishiiyamentis* was chosen because of its efficacy to induce the expression of both *Hm-lumbricin* and neuromacin genes. By contrast with the CNS fixed immediately after dissection, nerve cords fixed 6 h after septic challenge present a strong immunoreactivity with both antibodies at the lesion, along with an accumulation of microglial cells as revealed by nuclear staining with Hoechst 33258 (Fig. 8A, 9A). Microglial cells are resident cells evenly distributed in leech ganglia and in the bundle of axons that connect them. After damage to the CNS, these cells have been shown by Müller and co-workers to migrate to the site of the lesion, where they accumulate¹⁷. There, microglial cells phagocytose damaged tissue and produced laminin, an extracellular matrix molecule known to promote neurite outgrowth in the leech and in vertebrates¹¹. Immunolocalization of both peptides at the axotomized site where microglial cells accumulate suggests a production and a release of *Hm-lumbricin* and neuromacin by these cells. Six hours post-challenge, neuromacin but not *Hm-lumbricin*1 was also strongly immunolocalized in microglial cells covering the segmental ganglia (insets Fig. 8A). It has been shown that nearly all microglial cells are able to move, but that after the cord has been crushed, only 15-40% of them migrate to the injured site¹⁸. We hypothesize that the induction of neuromacin synthesis is relevant to the global population of microglial cells, whereas the induction of *Hm-lumbricin* synthesis only pertains to the cells recruited to the lesion site.

Interestingly, ISH combined with single cell RT-PCR demonstrated the presence of neuromacin and *Hm-lumbricin* mRNAs in neurons. In order to determine whether the detection of both peptides at the lesion site could also reflect a neuronal production, we have developed an *ex vivo* model of leech CNS almost completely devoid of microglial cells. Each segmental ganglion of the medicinal leech nerve cord is enclosed in a capsule. As revealed by nuclear staining with Hoechst 33258 (Fig. 8B and 9B), mechanical destruction of the capsule resulted in a marked reduction, within a few hours, in the numbers of microglial cells surrounding the nerve cord. With these conditions, the accumulation of microglial cells at the axotomized site does not occur anymore. As presented in figures 8 and 9, neuromacin and *Hm-lumbricin* were immunolocalized in neuronal cell bodies of the ganglia and at the lesion

site 6 h post challenge whereas none of the peptides were detected at $t=0$. Confocal microscopy analysis (insets Fig. 8B and 9B) more precisely evidenced an accumulation of both peptides in the axons of the injured connectives. Thus, the presence of both *Hm-lumbricin* and *neuromacin* at the axotomized site implicates peptide production by neurons and by the microglial cells recruited at the lesion site.

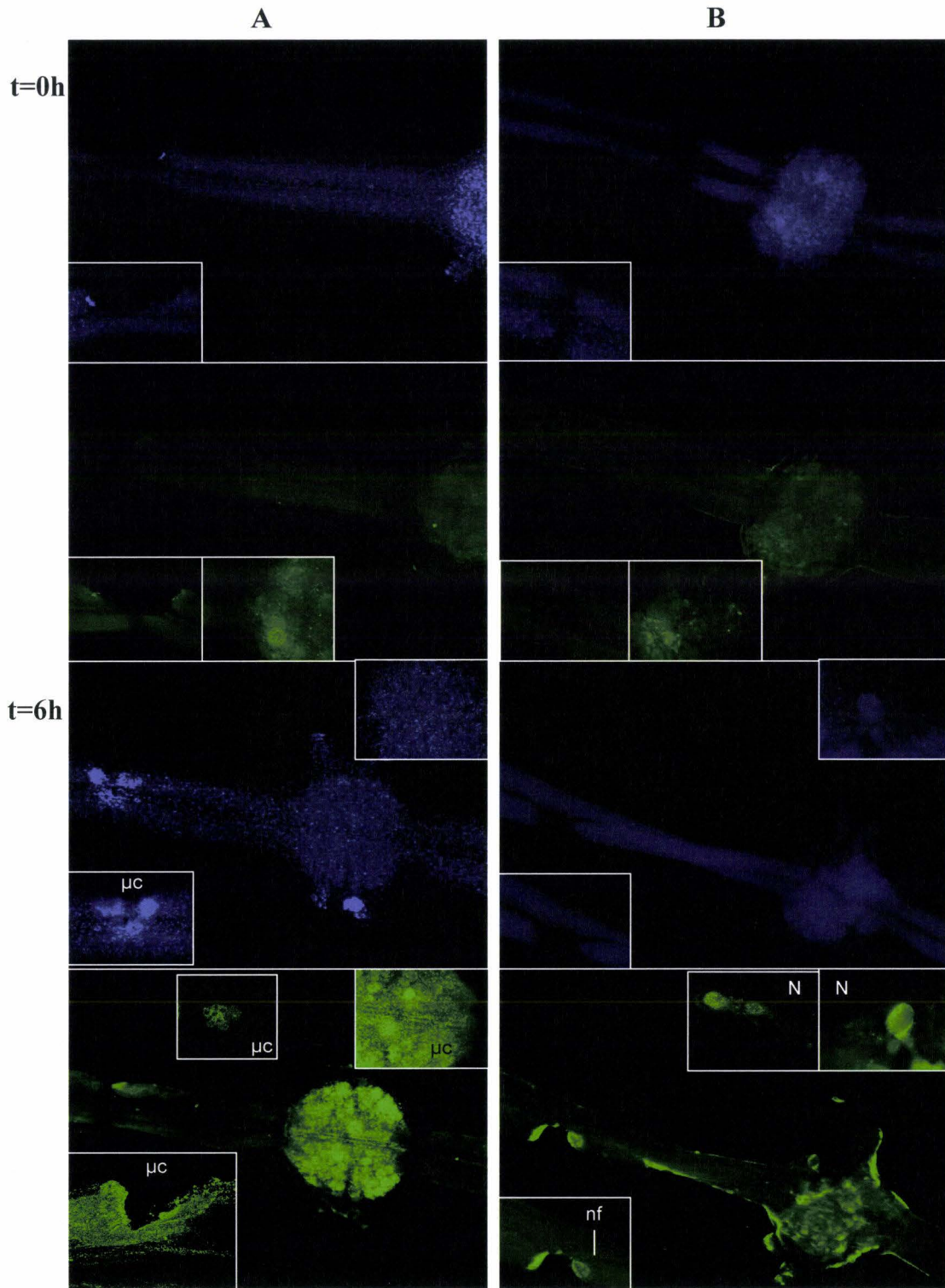


Figure 8: Appearance of neuromacin immunoreactivity post-axotomy in presence of bacteria at the lesion site of the connective (↓), in microglial cells (μc), in nerve fibers in the connectives (nf) and in neuron cell bodies in the ganglia (N). Nerve cords (column A) and nerve cords depleted in microglial cells (column B) were double stained with the neuromacin antibody (green) and with the fluorescent nuclear dye Hoechst 33342 (blue). Pictures in the top half correspond to the nerve cords immediately fixed post-axotomy ($t=0h$). Pictures in the bottom half show bacterially challenged nerve cords fixed 6h post-axotomy ($t=6h$).

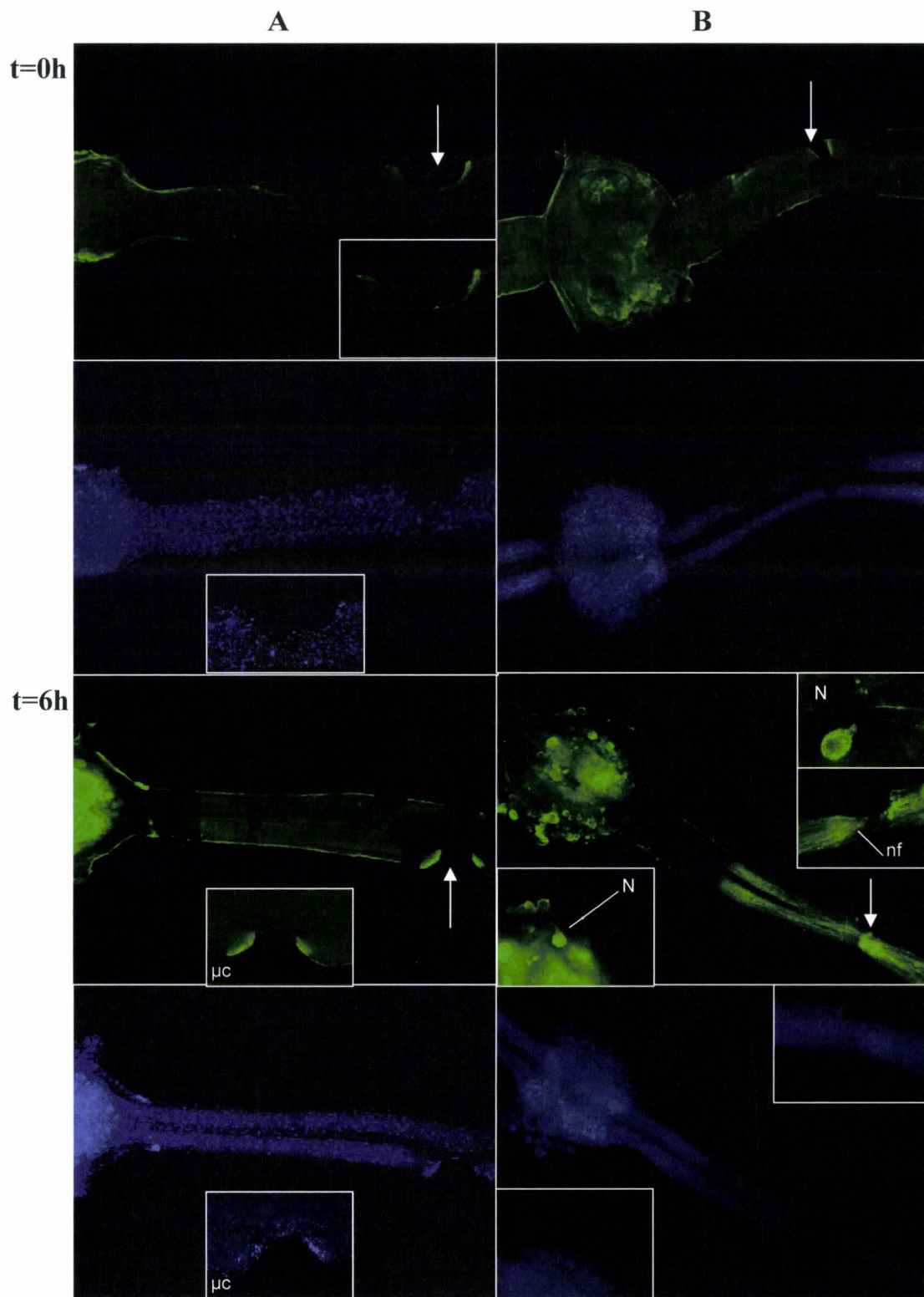


Figure 9: Appearance of *Hm*-lumbricin immunoreactivity post-axotomy in presence of bacteria at the lesion site of the connective (↓), in microglial cells (μc), in nerve fibers in the connectives (nf) and in neuron cell bodies in the ganglia (N). Nerve cords (column A) and nerve cords depleted in microglial cells (column B) were double stained with the neuromacin antibody (green) and with the fluorescent nuclear dye Hoechst 33342 (blue). Pictures in the top half correspond to the nerve cords immediately fixed post-axotomy (t=0h). Pictures in the bottom half show bacterially challenged nerve cords fixed 6h post-axotomy (t=6h).

DISCUSSION

Altogether these results provide direct evidence of the existence of infection-inducible antimicrobial peptides in the CNS of an invertebrate. Two newly characterized antimicrobial peptides, *Hm-lumbricin* and *neuromacin*, have been shown to be produced by microglial cells and, surprisingly, by neurons themselves in response to CNS injury.

Neuromacin is a relative of *theromacin*, a cysteine-rich antimicrobial peptide previously identified by our group from the body fluid of the leech *Theromyzon tessulatum*¹³. *Theromacin*, which has also been characterized in the medicinal leech (*Hm-theromacin*), possesses a longer C-terminal domain than *neuromacin*. That probably results in two different conformations, resulting in different biological activities for the two peptides. Further investigation of this relationship between structure and function is warranted. *Hm-theromacin* and *neuromacin* present a differential tissue expression. *Hm-theromacin* is expressed by a peripheral tissue functionally resembling the insect fat body, whereas *neuromacin* expression is restricted to the nervous system. Curiously, only *neuromacin*-like molecules have been found in other invertebrates, such as mollusks and other annelids. Thus far, the larger *theromacin* appears to be unique to leeches. Neither *neuromacin*-like nor *lumbricin*-like molecules have been found in the genomes of ecdysozoan invertebrates such as *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*, underlining the importance of enlarging the number of invertebrate models dedicated to study innate immunity.

Neuromacin, like *theromacin*, displayed potent activity against Gram-positive bacteria¹³. For antimicrobial peptides in general, a two-step mechanism is proposed to explain their killing effect on microorganisms. Most cationic peptides bind to the target cell surface due to their content of negatively charged phospholipids or other moieties. Many of them subsequently disturb the membrane integrity^{19 20}. Likewise, killing of bacteria by *neuromacin* was accompanied by permeabilization of the bacterial membranes comparable to the action of *cecropin P1* and *magainin II*, although apparently not as rapidly as these other antimicrobial peptides. The outer membrane of gram-negative bacteria may constitute a barrier that hinders the peptide from reaching the target, *i.e.* the cytoplasmic membrane.

The importance of *neuromacin* and *Hm-lumbricin* in the antiinfectious immunity of the leech CNS is emphasized by the presence of their transcripts in neuronal cells and by the fact that their gene expression is upregulated by some microbial components. Admittedly, a

neuromacin-like peptide reported as theromacin-like has recently been detected by sequencing cDNA libraries from the CNS of the mollusk *A. californica*, but the roles and the production sites of the peptide were not detailed²¹. In *C. elegans*, several genes encoding neuropeptide-like proteins named NLP-29, NLP-31 and NLP-33, the sequences of which were deduced from an *in silico* analysis of an EST library, have been shown to be induced in the hypodermis by fungal infection²². In contrast to most of the *nlp* family members, these genes were not detected in neurons using GFP reporter genes²³. The neuromodulatory effects of the predicted members of the NLP family are still unclear in *C. elegans* but, interestingly, the chemically synthesized NLP-31 exhibited antifungal activity²².

In humans, antimicrobial peptides, such as defensins, have been shown to be produced in the central nervous system. HBD1 mRNA appeared to be constitutively expressed by astrocytes, microglia and meningeal fibroblasts but not by neurons, whereas HBD2 mRNA expression is inducible in astrocytes upon lipopolysaccharide (LPS), IL-1- β or TNF challenge²⁴. The human defensin gene *lap* is expressed in the choroid plexus, which produces cerebrospinal fluid. By immunohistochemical analysis, the rat homologue of the human cathelicidin LL-37 was detected in specific CNS regions, such as some neurons in the olfactory bulb and the grey matter²⁵. The enhancement of *Hm*-lumbricin and neuromacin transcript levels after bacterial challenge suggests a regulation of these antimicrobial peptide genes similar to that of the human HBD2 in the CNS²⁴. Moreover, multiple examples of neuropeptides, such as the α -Melanocyte stimulating hormone in human and proenkephalin A-derived peptides in both mammals and/or leeches, have also been described to possess antimicrobial properties *in vitro*^{26 27}. Thus, as in humans, antimicrobial peptides may be involved in the innate immune system of the leech CNS.

A difference in neuromacin and *Hm*-lumbricin gene expression was observed after infection with different microbial components, suggesting that the antibacterial response of the medicinal leech CNS is specific to the antigens presented. This was not expected, given that in the leech *T. tessulatum* our previous work demonstrated the non-specificity of the humoral antimicrobial response to infection¹³. This ability to discriminate pathogens might be relevant to the use, in the experiments presented here, of bacteria naturally living in the environment of the leech. The perception mode of infection by leeches remains unknown. In many species, including flies and mammals, molecular components of a particular group of pathogens can be recognized by TIR-domain containing receptors that act as sentinels. Their activation triggers an intracellular signaling pathway followed by the up-regulation of defense

genes²⁸. We have recently detected the presence of a Toll-like receptor in the leech nervous system, and preliminary observations on the effects of silencing this gene suggest that this receptor is involved in the induction of a gene coding for a chemo-attractant protein, but not in the induction of either the *Hm-lumbricin* or the *neuromacin* genes (unpublished data).

Having determined the gene expression sites and demonstrated their up-regulation, we then sought to characterize further the regulation of the peptides synthesis by immunohistochemistry. Our results indicated an increase in the amounts of both peptides in the challenged CNS. This enhancement occurred in the ganglia and at the axotomized sites, but only in the presence of bacterial components. No change was observed under sterile conditions (data not shown). *Hm-lumbricin* and *neuromacin* peptides accumulated in the microglial cells recruited to the lesion site. Unlike what happens in the mammalian brain, this accumulation is known to be the result of cell migration and does not reflect microglial cell division in response to leech CNS injury¹⁸. However, the synthesis of antimicrobial peptides by the leech microglial cells confirms once again the functional similarity of these invertebrate cells with human microglial cells. Moreover, by developing a preparation of leech CNS depleted in microglial cells, we have demonstrated that the accumulation at the axotomized site of both peptides is also due to a neuronal production.

In conclusion, our data show for the first time that an invertebrate CNS is able to mount a specific antibacterial response by discriminating some pathogen components. We have also visually demonstrated that, as in mammals, the leech nervous system uses a common panel of proteins to initiate regrowth programs and an antimicrobial response. The relative simplicity of the leech CNS in combination with its having complex mechanisms to react to infection suggests that the study of the neural immunity in *H. medicinalis* will contribute to a better understanding of the connection between the immune system and the central nervous system in mammals.

MATERIALS & METHODS

Collection and treatment of the nerve cords: Adult leeches, *Hirudo medicinalis* species, weighting 2-3g were purchased from a commercial supplier (Ricampex, France). Animals were kept in artificial pond water and starved up to 3 weeks before use. Leeches were anaesthetised in 10% ethanol-spring water for 20 min and the nerve cords were removed according to the protocol of Nicholls and Baylor 1968. After three successive baths in antibiotics, cords were placed in Leibowitz-15 (L-15, Gibco) culture medium supplemented with 2% fetal calf serum, 0.6% glucose and gentamicin (10mg/ml) ²⁹. Connectives between ganglia were injured in a standard manner using a pair of sterilized fine iridectomy scissors. Axotomized nerve cords were separately incubated in L-15 medium containing different microbial components: 3×10^7 CFU/ml of heat killed or live bacteria, 10 µg/ml of polyI:C (InvivoGen), 100 µg/ml of zymosan (InVivogen,) and 100 µg/ml of mannane (InvivoGen) for different time (t=0 to t=8 days) at room temperature. Incubations without microbial components or bacteria were performed in the same conditions as controls. All the steps were performed under sterile conditions.

Nerve cords depleted of microglial cells were obtained 6 hours after having opened the capsule surrounding the ganglia with fine scissors.

Microorganisms: The Gram-positive and Gram-negative bacteria *Micrococcus nishiiyamentis* and *Aeromonas hydrophila* respectively were isolated from the natural environment of *Hirudo medicinalis*. These bacterial colonies, which are present in the water, were selected from agar plate under aerobic conditions at room temperature using a random isolation grid. The Gram-positive bacteria *Bacillus megaterium* was used for the SYTOX Green assay.

Time-lapse movies on axotomized nerve cords: Dissected nerve cords (three per conditions) were pinned in a dish coated with silicone rubber (Sylgard 184) containing supplemented L-15 medium under sterile conditions. One connective of each nerve cord was cut and a mix of either live or heat-killed *A. hydrophila* and *M. nishiiyamentis* (3×10^7 CFU/ml) was added to the culture medium. Controls were performed in the absence of bacteria. Pictures were taken every 24 hours for 1 week (objective X5) using a LEICA inverted microscope DMIRE2. Images were taken using the Bioposition V3.0 software developed on the Matrox MIL7.5

Base Library by Gilles Courtand from the CCMIC (Centre Commun de Mesures Imagerie Cellulaire) of the University of Lille 1.

Antimicrobial assays: After each purification step, antibacterial activity was monitored by a solid plate assay as described in previous studies ²⁷. The minimal inhibitory concentration (MIC) and the minimal bactericidal concentration (MBC) were determined according to the method of Hancock (<http://cmdr.ubc.ca/bobh/showmethod.php?methodid=79>). Permeabilization of bacterial membranes and pore-forming activity were assayed as previously described ^{30, 31}

Purification and identification of the peptides: 100 nerve cords were homogenized in phosphate buffered saline pH 7.5. Liquid was immediately centrifuged at 10,000g at 4°C for 20 min and the supernatant was acidified by adjusting the pH to 3.9 with 1 M HCl. Centrifugation (10,000g at 4°C for 20 min) was then used to clarify the supernatants, which were loaded onto Sep-Pak C18 Vac cartridges (Waters). Elution steps were performed with 2% and 60% acetonitril (ACN) in 0.01% trifluoroacetic acid water. The pre-purified fractions were then lyophilized, reconstituted in pure water and tested for antimicrobial activity as described below. Only the 60% ACN eluted fractions were active and submitted to purification by reversed-phase high pressure liquid chromatography (RP-HPLC). All the purification steps were carried out on a Beckman™ Gold HPLC system.

Step 1: Aliquots of the 60% Sep-Pak fractions were subjected to RP-HPLC on a Sephasyl C18 column (250 x 4.1 mm, 218TP54 Vydac™). Elution was performed with a linear gradient of 2-62 % ACN in acidified water over 90 min at a flow rate of 1 ml/min. Fractions corresponding to absorbance peaks were collected in polypropylene tubes, lyophilized, reconstituted in water and tested for antimicrobial activity.

Step 2: Active fractions were further loaded onto a C18 column (250 x 2.1 mm, 218TP52 Vydac™) with a gradient consisting in 2-25% ACN in acidified water for 10 min and 25-35% ACN for 40 min at a flow rate of 0.2 ml/min. Fractions were collected and treated as above.

Step 3: One additional step was performed on a narrow bore C18 reversed phase column (150 x 2 mm, Waters) at a flow rate of 0.2 ml/min using the ACN gradient described in the step 2. The purity assessment and the molecular mass determination of the peptides were carried out by matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight (MALDI-TOF) instrument (DE STR PRO, Applied Biosystems™). N terminal sequencing of the purified peptides was

performed by automated Edman degradation on a pulse liquid automatic peptide sequenator (Beckman™).

cDNA cloning: Complete cDNA for *Hm-lumbricin* was obtained from an expressed sequence tag (EST) library created from the nervous system of *Hirudo medicinalis* (http://www.cns.fr/externe/English/Projets/Projet_PE/PE.html). *Hm-lumbricin* cDNA was amplified from the cDNA prepared for neuromacin by polymerase chain reaction (PCR) using the sense oligonucleotide 5'-ATGGAGGAGGAAATTGAAGAACTCC-3' and the antisense oligodT primer.

cDNA for neuromacin was cloned using two steps PCR amplification:

Step 1: Reverse-transcriptase PCR (RT-PCR): Total RNA from leech nervous system was extracted using Trizol (Life Technologies). RNA (3 µg) was transcribed into single stranded cDNA using oligo(dT)₁₈-adaptator primer, 5'-CGAGTCGACATCGATCG(T)₁₈-3' (Kit superscript Tm, GIBCO/BRL, protocol of the manufacturer). One fourth of the reaction was amplified by PCR using the oligodT primer and degenerate sense oligonucleotide pool whose sequence is deduced from Asp1-Trp6 with a designed 5' flanking sequence 5'-GA(C/T)TG(C/T)TA(C/T)GA(A/G)GA(C/T)TGG-3'. PCR was performed for 25 cycles using one unit of Taq polymerase (Appligene quantum) in 1.5 mM of MgCl₂. The cycling parameters were: 94°C for 1 min., 50°C for 1 min. and 72°C for 1 min.

-Step 2: Rapid Amplification of 5' cDNA End. Reverse-transcription was performed using antisense oligonucleotides 5'-CAGTCAGGAATGACGTTCCAGGCG-3' deduced from the neuromacin cDNA sequence previously obtained. After first strand cDNA synthesis and addition of a poly-d(C) tail at its 3' end using a terminal transferase (GIBCO, protocol of the manufacturer), PCR was performed with an oligodG anchor primer and internal antisense primers deduced from the cDNA obtained in step 1: 5'-TCCCCTGTGACCGAGTTC-3'. PCR parameters were identical to those described in step 1.

All PCR products were ligated into the PGEMT easy vector (according to the protocol provided by the manufacturer) and transformed into competent *Escherichia coli* JM 109 cells (Promega).

Plasmids DNA were sequenced with a FM13/RM13 sequencing kit (Pharmacia Biotech) according to the manufacturer's instructions.

Gene expression analysis

RNA isolation and real time PCR analysis: Twenty leeches were used per conditions. Nerve cords incubated in the presence or absence of killed bacteria, poly I:C, mannane or zymosan (see above for details) were crushed, in 2ml tubes prefilled with Qiazol reagent (Qiagen, France) and 1.4 mm ceramic beads, by shaking the mixture twice for 45 s at 6500 rpm in a Precellys®24 homogenizer (Bertin distributed by Ozyme, France). RNA extraction was performed according to the manufacturer and extracted total RNA was treated with RQ1Dnase1 (Promega, France) to prevent contaminations with genomic DNA. First strand cDNA was generated from 2 µg of total RNA using random primers (Promega, France) and Superscript III reverse transcriptase (RT) kit (Invitrogen, France) in a final volume of 60 µl. Omitting RT or RNA from the reaction mixture resulted in non amplification control and non template control respectively. cDNA were treated with RNaseH (Promega, France) to optimize the amplification.

Real time PCR were performed with the Quantitect SYBRgreen PCR kit (Qiagen, France) by combining 1µl of cDNA, 0.8 µM of each primer and 1X of SYBRgreen reagent in a final volume of 25µl. The primers were designed with the Primer3 Input software (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) according to the conditions described in the PCR kit.

Hm-lumbricin: 5'-CCAATCGGCTCTCCTTACTC-3', 5'-ACAGGCCCTCAGTTCATTTC-3';
Neuromacin: 5'-GTGGACGCCTGGAACGTCAT-3', 5'-CTTGAGGACTCCAGGGCAGT-3'

18S: 5'-TGCGGTTATTTTCGATTGTCA-3', 5'-AGACAAATCGCTCCACCAAC-3'

Real time PCR was conducted on an Applied Biosystem 5700 using hot start with cycle conditions, 40 cycles: 94°C, 15 s; 56°C, 30 s and 72°C, 30 s, followed by a final 72°C extension for 3 min. Analysis of relative gene expression data was performed using the $\Delta\Delta C_t$ method. A plot of the log cDNA dilution versus ΔC_t was generated for each target gene tested to validate the qPCR experiments. The slopes of regression lines for neuromacin and *Hm-lumbricin* were 0.0698 and 0.0864 respectively suggesting equivalent efficiencies of amplification (data not shown)³²

In situ hybridization: Nerve cords were fixed in a solution containing 4% paraformaldehyde at 4°C overnight. Plasmids containing the coding region of neuromacin and *Hm-lumbricin* probes were used as templates for the synthesis of the probes. Digoxigenin (DIG)-UTP-labeled antisense and sense riboprobes were generated from linearized cDNA plasmids by *in*

vitro transcription using RNA-labeling-kit (Roche™). DIG-labeled riboprobes (40-100 ng per slide) were hybridized as previously described¹³. Slides were observed under a Zeiss™ Axioskop microscope. As a control, antisense riboprobes were replaced by sense riboprobes.

Single cell RT-PCR: Single cell RT-PCRs were carried out on fresh dissociated neurons and microglial cells. Cells were individually collected using a patch-clamp micromanipulator³³. Patch pipettes were filled with the internal pipette solution (10 µl of 140 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1.1 mM EGTA and 10 mM Hepes, pH 7.25). Neurons and microglial cells were aspirated under visual control. The pipette content (~8 µl) was ejected into a 0.2 ml PCR microtube without touching the wall, immediately frozen with nitrogen azote and kept at -80°C until use. A new patch pipette was used for each new collection. The RT reaction was performed with one single cell using oligodT(18) primer according to Roudbaraki *et al*³³. The following sense primers were designed to amplify with an oligodT(34) primer CGAGTCGACATCGATCG(T)₁₈ a PCR size product under 500bp : Neuromacin: 5'-CTCTTCTCAACAAGTTGCTCTGC-3' and *Hm*-lumbricin: 5'-CAGCAAGTACGAGAGGCAAAAGGACA-3'

PCR was performed by using 4 µl RT template according the protocol of the AmpliTaq Gold (Applied Biosystems). The conditions of DNA amplification included an initial denaturation step of 10 min at 95°C, 45 cycles of 45 s at 95°C, 45 s at 60 C, and 45 s at 72° C; and finally 5 min at 72° C. The PCR products were loaded onto a 1% agarose gel.

Immunohistochemical procedures

Polyclonal antisera: Because of the high conservation between neuromacin and theromacin epitopes, the theromacin antiserum was used for our analysis. This rabbit antibody recognizes a synthetic peptide corresponding to theromacin (Gln₄₉-Arg₆₃) as previously described (refs). The *Hm*-lumbricin antiserum was produced in the laboratory. The chemically synthesized region of *Hm*-lumbricin (Gln₅-Pro₃₀) was coupled to ovalbumin and used for the immunization procedure of two New Zealand White rabbits (Saprophyte Pathogen free) according to the protocol of Camus *et al*.

Whole mount immunohistochemistry: Nerve cords depleted or not of microglial cells were fixed overnight at 4°C in 4% paraformaldehyde at different times after bacterial exposure. Membranes were permeabilized by incubating the samples in PBS containing 1% Triton X-100 for 24 h at room temperature. Non-specific background staining was blocked with a PBS

solution containing 1% Triton, 3% normal goat serum (NGS) and 1% ovalbumin for 8 h at room temperature. Samples were then incubated with either rabbit neuromacin antibodies (1:800) or rabbit *Hm-lumbricin* antibodies (1:200) diluted in the AB solution (PBS containing 1% BSA 0,05% Triton 1% NGS 1% NDS 1% Ovalbumin) overnight at 4°C. Primary antibodies were removed and samples were incubated with Alexa Fluor 546 conjugated to goat anti-rabbit secondary antibody (Invitrogen) diluted 1:4000 in the AB solution. As a control, the immunolabeling procedure was carried out with the preimmune serum. Slides were mounted and were examined under a Leica laser-scanning microscope (TCS NT) equipped with a Leica (DMIRBE) inverted microscope and an argon-trypton laser. Tagged molecules were excited at a wavelength of 568nm. Images were acquired as single transcellular optical sections and averaged over 16 scans per frame.

ACKNOWLEDGMENTS

The technical assistance of Céline Wichlacz, Annie Desmons, Christelle Van-Camp and Mathilde Verstraete is gratefully acknowledged. We thank Heidrun Ließegang for her technical assistance in measuring permeabilization of bacterial membranes and pore-forming activity and Henning Fedders for evaluating the data of these assays. We also thank Dr Anna Paula Teixeira (INRA UR IASP site 311, France) for N-terminal sequencing. The authors are indebted to Dr Christian Slomianny (INSERM U800, USTL, Lille1, France) and Gilles Courtand (CCMIC, USTL, Lille1, France) for access to the confocal microscope and the Cellular Imaging Center. We also thank the Genoscope for the EST sequencing facilities. This work was supported by the CNRS, the MNERT, and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 617, TP 18).

REFERENCES

1. Wrona, D. Neural-immune interactions: an integrative view of the bidirectional relationship between the brain and immune systems. *J Neuroimmunol* 172, 38-58 (2006).
2. Becher, B., Prat, A. & Antel, J. P. Brain-immune connection: immuno-regulatory properties of CNS-resident cells. *Glia* 29, 293-304 (2000).
3. Gendelman, H. E. Neural immunity: Friend or foe? *J Neurovirol* 8, 474-9 (2002).
4. Hoffmann, J. A. The immune response of *Drosophila*. *Nature* 426, 33-8 (2003).
5. Steiner, H., Hultmark, D., Engstrom, A., Bennich, H. & Boman, H. G. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* 292, 246-8 (1981).
6. Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389-95 (2002).
7. Wharton, K. A., Jr. & Crews, S. T. CNS midline enhancers of the *Drosophila* slit and Toll genes. *Mech Dev* 40, 141-54 (1993).
8. Pujol, N. et al. A reverse genetic analysis of components of the Toll signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* 11, 809-21 (2001).
9. Emes, R. D., Wang, W. Z., Lanary, K. & Blackshaw, S. E. HmCRIP, a cysteine-rich intestinal protein, is expressed by an identified regenerating nerve cell. *FEBS Lett* 533, 124-8 (2003).
10. Kristan, W. B., Jr., Calabrese, R. L. & Friesen, W. O. Neuronal control of leech behavior. *Prog Neurobiol* 76, 279-327 (2005).
11. Masuda-Nakagawa, L. M., Muller, K. J. & Nicholls, J. G. Accumulation of laminin and microglial cells at sites of injury and regeneration in the central nervous system of the leech. *Proc Biol Sci* 241, 201-6 (1990).
12. Muller, K. J. & Carbonetto, S. The morphological and physiological properties of a regenerating synapse in the C.N.S. of the leech. *J Comp Neurol* 185, 485-516 (1979).
13. 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* 279, 30973-82 (2004).
14. Cho, J. H., Park, C. B., Yoon, Y. G. & Kim, S. C. Lumbricin I, a novel proline-rich antimicrobial peptide from the earthworm: purification, cDNA cloning and molecular characterization. *Biochim Biophys Acta* 1408, 67-76 (1998).
15. Wang, X., Wang, X., Zhang, Y., Qu, X. & Yang, S. An antimicrobial peptide of the earthworm *Pheretima tschiliensis*: cDNA cloning, expression and immunolocalization. *Biotechnol Lett* 25, 1317-23 (2003).
16. Jones, R. & Hall, L. A 23 kDa protein from rat sperm plasma membranes shows sequence similarity and phospholipid binding properties to a bovine brain cytosolic protein. *Biochim Biophys Acta* 1080, 78-82 (1991).
17. Morgese, V. J., Elliott, E. J. & Muller, K. J. Microglial movement to sites of nerve lesion in the leech CNS. *Brain Res* 272, 166-70 (1983).
18. McGlade-McCulloh, E., Morrissey, A. M., Norona, F. & Muller, K. J. Individual microglia move rapidly and directly to nerve lesions in the leech central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 1093-7 (1989).
19. Zasloff, M. Antibiotic peptides as mediators of innate immunity. *Curr Opin Immunol* 4, 3-7 (1992).
20. Shai, Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers* 66, 236-48 (2002).
21. Moroz, L. L. et al. Neuronal transcriptome of aplysia: neuronal compartments and circuitry. *Cell* 127, 1453-67 (2006).

22. Couillault, C. et al. TLR-independent control of innate immunity in *Caenorhabditis elegans* by the TIR domain adaptor protein TIR-1, an ortholog of human SARM. *Nat Immunol* 5, 488-94 (2004).
23. Nathoo, A. N., Moeller, R. A., Westlund, B. A. & Hart, A. C. Identification of neuropeptide-like protein gene families in *Caenorhabditis elegans* and other species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 14000-5 (2001).
24. Hao, H. N., Zhao, J., Lotoczky, G., Grever, W. E. & Lyman, W. D. Induction of human beta-defensin-2 expression in human astrocytes by lipopolysaccharide and cytokines. *J Neurochem* 77, 1027-35 (2001).
25. Bergman, P. et al. The antimicrobial peptide rCRAMP is present in the central nervous system of the rat. *J Neurochem* 93, 1132-40 (2005).
26. Brogden, K. A., Guthmiller, J. M., Salzet, M. & Zasloff, M. The nervous system and innate immunity: the neuropeptide connection. *Nat Immunol* 6, 558-64 (2005).
27. Tasiemski, A. et al. Proenkephalin A-derived peptides in invertebrate innate immune processes. *Brain Res Mol Brain Res* 76, 237-52 (2000).
28. Imler, J. L. & Zheng, L. Biology of Toll receptors: lessons from insects and mammals. *J Leukoc Biol* 75, 18-26 (2004).
29. Ready, D. F. & Nicholls, J. Identified neurones isolated from leech CNS make selective connections in culture. *Nature* 281, 67-9 (1979).
30. Herbst, R. et al. Pore-forming polypeptides of the pathogenic protozoon *Naegleria fowleri*. *J Biol Chem* 277, 22353-60 (2002).
31. Leippe, M., Ebel, S., Schoenberger, O. L., Horstmann, R. D. & Muller-Eberhard, H. J. Pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 7659-63 (1991).
32. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods* 25, 402-8 (2001).
33. Roudbaraki, M. et al. Target cells of gamma3-melanocyte-stimulating hormone detected through intracellular Ca²⁺ responses in immature rat pituitary constitute a fraction of all main pituitary cell types, but mostly express multiple hormone phenotypes at the messenger ribonucleic acid level. Refractoriness to melanocortin-3 receptor blockade in the lacto-somatotroph lineage. *Endocrinology* 140, 4874-85 (1999).

CHAPITRE II

Caractérisation et implication de la cytokine proinflammatoire

Hm-EMAPII dans la protection et la réparation du SNC

de la sangsue médicinale *Hirudo medicinalis*

Chez les vertébrés, comme chez la sangsue médicinale, le SNC est composé de cellules microgliales. Ces cellules considérées comme la population cellulaire macrophagique résidente du SNC, migrent rapidement jusqu'au site de lésion du SNC où elles participent à l'élimination des débris cellulaires (Aloisi, 2001 ; McGlade-McCulloh et al., 1989 ; von Bernhardi, 1999). Chez les vertébrés, les cellules microgliales activées sont impliquées dans la mise en place de la réponse immunitaire innée du SNC, notamment par leur capacité à produire de nombreuses cytokines proinflammatoires (Kreutzberg 1996 ; Kielian, 2004).

Au cours de cette étude, nous avons recherché, dans les banques d'EST de système nerveux de sangsue *H. medicinalis*, l'existence de molécules comparables à celles produites par les cellules microgliales de vertébrés, ceci afin d'étudier leurs rôles dans la réponse immunitaire du SNC de cet invertébré.

Notre attention a été retenue par la présence d'une molécule présentant une importante identité avec la cytokine proinflammatoire humaine : EMAPII (*Endothelial Monocyte-Activating Polypeptide II*). Cette protéine est issue du clivage d'un précurseur, la protéine P43 (complexe P43/EMAPII). Chez les mammifères, EMAPII est considéré comme un profond modulateur de la réponse immunitaire innée. Différentes expériences utilisant des anticorps reconnaissant EMAPII montrent un immunomarquage accru des cellules microgliales lors de pathologies du SNC (Mueller et al., 2003 ; Brabeck et al., 2002). Après avoir caractérisé l'ADNc complet codant le précurseur p43, nous avons étudié le rôle de la protéine *Hm-EMAPII* au cours de la réponse immunitaire du SNC de la sangsue médicinale.

La séquence protéique déduite de l'ADNc d'*Hm-EMAPII* montre 58% d'identité avec son homologue humaine (*hEMAPII*). L'utilisation d'un anticorps polyclonal dirigé contre la molécule *hEMAPII* nous a permis de confirmer l'existence de la forme clivée d'*Hm-EMAPII* et de son précurseur *Hm-P43/EMAPII* dans le SNC de la sangsue médicinale, suggérant ainsi qu'un mécanisme de clivage comparable à celui observé chez les vertébrés puisse avoir lieu chez notre modèle. Des expériences d'HIS et d'immunocytochimie indiquent que, comme

chez les vertébrés, cette cytokine est exprimée et produite par les cellules microgliales et par les neurones de sangsue. Des analyses par PCR quantitative montrent que le niveau d'expression du gène *Hm-p43/EMAPII* est induit à la fois lors d'une lésion de la chaîne nerveuse mais également lors d'une stimulation de celle-ci par des bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Ce gène semble donc être impliqué dans les processus de régénération du SNC de la sangsue mais également dans la mise en place de la réponse immunitaire innée induite lors d'une infection bactérienne. Des analyses d'immunohistochimie, réalisées sur des chaînes nerveuses axotomisées et cultivées ou non en conditions aseptiques, mettent en évidence une importante synthèse de cette molécule au niveau du site de lésion du système nerveux notamment par les cellules microgliales s'y étant accumulées. Enfin, des tests de chimotaxie réalisés en conditions hétérologues ont permis de révéler que la protéine recombinante *hEMAPII* possédait un effet chémoattractant vis à vis des cellules microgliales de sangsue, ce qui n'a, à notre connaissance, encore jamais été démontré que ce soit chez les invertébrés ou chez les vertébrés.

L'ensemble de ces résultats a permis de mettre en évidence la première cytokine proinflammatoire présente dans le système nerveux de la sangsue médicinale *H. medicinalis*. Celle-ci participerait aux processus de défense de la chaîne nerveuse de la sangsue mais également à sa réparation. Elle serait notamment impliquée dans le recrutement des cellules microgliales au site de lésion de la chaîne nerveuse. Or, chez la sangsue, ces cellules sont capables de phagocyter les débris cellulaires mais seraient également capables de produire des molécules de la matrice extracellulaire favorisant ainsi le développement des cônes de croissance (Masuda-Nakagawa et al., 1993).

Molecular cloning and lesional expression of *Hm* Endothelial Monocyte Activating Polypeptide II (*Hm*-EMAP II) following experimental injury in the nervous system of the medicinal leech *Hirudo medicinalis*.

David Schikorski*, Virginie Cuvillier-Hot, Michel Salzet and Aurélie Tasiemski

Laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides, FRE CNRS 2933, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59650 Villeneuve d'Ascq, France

*Address correspondence to: David Schikorski, Laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides, CNRS FRE2933, Groupe immunité antimicrobienne, Université des Sciences et Technologies de Lille1, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France. Fax : (333) 20.43.40.54. Phone: (333) 20 33 59 57; Email: david.schikorski@ed.univ-lille1.fr

ABSTRACT

The medicinal leech *Hirudo medicinalis* is able to regenerate its central nervous system (CNS) following injury. In both mammals and leeches, traumas of the CNS lead to a rapid activation of microglial cells which accumulate at the lesion site. In mammals, activated cells express the Endothelial Monocyte Activating Polypeptide II (EMAPII). In leeches, we demonstrated that such phenomenon also occurs. In fact, an *Hm*-EMAP II has been cloned from a nerve cord cDNA library and shares 58% sequence identity with its human counterpart. Western blot analysis revealed that, like in mammals, *Hm*-EMAP II is released from a larger precursor named *Hm*-p43/EMAP II. *In situ* hybridization and immunohistochemistry analyses evidenced that *Hm*-EMAP II is mainly produced by neurons and by the microglial cells recruited at the lesion site. Moreover, quantitative PCR analyses showed an enhancement of *Hm*-EMAP II mRNA levels after bacterial challenge. Interestingly, the human EMAP II recombinant protein appears to exert a chemotactic effect on leech microglial cells suggesting a similar chemoattractant activity of *Hm*-EMAP II.

Taken together, these data suggest for the first time that *Hm*-EMAP II could be involved in the regeneration process of the leech nerve cord at least through a chemotactic effect on microglia. Thus, leech appears to be a particularly interesting model for studying such integrative biological phenomenon as neural regeneration.

INTRODUCTION

In mammalian central nervous system (CNS) microglial cells are known to contribute to the brain immune response (Kreutzberg 1996; Shrikant and Beneviste, 1996). After CNS injury or pathogen infections, microglia are the first cell type arriving at the trauma site or the infected area from adjacent tissues. Microglial cells are traditionally considered as a resident macrophagic cells population of the nervous system. They are involved in both innate and adaptive immune responses and appeared to be the principal source of proinflammatory and immune regulatory cytokines in the CNS. In normal conditions, these cells are quiescent and scattered throughout the CNS. After injury, they rapidly become activated by all inflammatory stimuli (Nakamura, 2002; Piehl and Lidman, 2001; Davalos et al., 2005). They first adopt a macrophage-like morphology, become amoeboid and are then recruited to the lesion site where they participate to the elimination of cellular remains by phagocytosing cells debris (Kreutzberg, 1996; Aloisi, 2001; Giulian, 1989; Streit, 1995; Hanisch, 2002). Rapidly, activated microglia get involved in the neuroinflammation processes by synthesizing a large panel of proinflammatory mediators including NADPH oxidase (Mander et al., 2006; Qin, 2006), NO synthetase (NOS) (Qin, 2006), scavenger receptors, the MHC class II molecules (Husemann, 2002; Coraci, 2002), and numerous cytokines implicated in the regulation of the local inflammatory response and the outcome of pathogen infections (Kielian, 2004). Paradoxically, many of the numerous bioactive factors produced by microglia can be deleterious for the CNS tissues, leading to neuronal or glial cell loss (Barron, 1995; Hanish, 2002; Kreutzberg, 1996; Mayer, 2005; Block and Hong, 2005; Streit and Kincaid-Colton, 1995). The harmful or beneficial effects due to microglial cell activities depend on a variety of factors which prove to be very complex to study overall.

Among chemokines expressed by microglial cells, the proinflammatory and antiangiogenic cytokine EMAP II (Endothelial-Monocyte-Activating-Factor II) is now considered as an useful marker to evaluate the activation of microglial cells in neuroinflammatory diseases (Mueller et al., 2003; Schluesener et al., 1999; Brabeck, 2002). The mature form of the EMAP II protein stems from a proEMAP II precursor, which corresponds to the multi-synthetase complex P43/EMAP II, component of the aminoacyl-tRNA synthetase complex (Shalak, 2001). EMAP II was initially isolated from methylcholanthrene A-induced fibrosarcoma cells as a multifunctional polypeptide (Kao et al 1992). Numerous studies have described the pleiotropic activities of EMAP II (van Horssen et

al., 2006). It was shown a modulator of inflammatory reactions of the brain innate immune response (Kao, 1992; 1994) and suggested to participate in a broad set of brain diseases in mammals (Schluesener et al., 1997 and 1998). Moreover, pathophysiological EMAP II expression is an indicator of CNS injury ensuing from inflammation or neurodegeneration (Mueller, 2003).

Depending on the type of CNS injury, vertebrate microglial cells give various responses, leading to contradictory outcomes from positive regeneration processes to negative degeneration fate. Nowadays, studying the effects of various molecules in the course of degeneration phenomena in vertebrate CNS appears as a challenge, mainly because of its intrinsic complexity. Unlike vertebrates, invertebrate species display an outstanding ability to repair their CNS. For this reason, we were interested in studying mechanisms of regeneration and protection of the CNS in a simple model, the leech *Hirudo medicinalis*. Indeed, leeches have the ability to repair and to restore functions by re-establishing neuronal connections after CNS injury (Chiquet and Nicholls, 1987). During regeneration of the leech CNS, microglial cells have been shown to be physically associated with axons sprouts (Blackshaw et al., 1997; Babington et al., 2005). Interestingly, like in mammals, leech microglial cells accumulate within minutes at the lesion site (McGlade and McCulloh, 1989), produce laminin to promote axons growth (von Bernhardt et Muller, 1995), and participate to the cellular debris removal while becoming amoeboid phagocytes (von Bernhardt, 1999). In this context, we focused our interest on the first chemokine isolated from the CNS of the medicinal leech, the *Hm-P43/EMAP II* complex which is highly similar to its human counterpart. We have dissected in a simpler model the potential role of this cytokine in the context of CNS regeneration in aseptically and septic contexts. We established that this cytokine could act as a potent microglial cells chemoattractant factor.

RESULTS

Molecular cloning of *Hm*-P43/EMAP II

The complete nucleotidic sequence of *Hm*-P43/EMAP II complex was carried out using a two-step PCR approach based on EST library (Fig. 1A). Translation of the open reading frame gives a 318-amino acid residue. Data bank analyses (BLAST program in NCBI) reveal 44 % of homology between amino acid sequences of *Hm*-P43/EMAP II and the human complex P43/EMAP II (accession number B55053). Alignment of these two protein sequences denotes that the C-term region corresponding to the mature *h*EMAP II presents 58 % of identity with its leech counterpart (Fig. 1B, underlined sequence). Because of the high identity level between *Hm*-EMAP II and *h*EMAP II, we chose to use the human polyclonal antibody anti-*h*EMAP II to detect leech protein during this study. However, *h*EMAP II antibody detects both P43/EMAP II and mature EMAP II molecules (Journeay and Singh, 2007; Guo et al., 2007). Indeed, Western blot analysis revealed that two bands, respectively around ~18 kDa and ~35 kDa, are detected by *h*EMAP antiserum in protein extract from the leech CNS (Fig. 2), corresponding to the predicted mass of the entire protein *Hm*-P43/EMAP II (35,185.37 Da) and to the hypothetical cleaved *Hm*-EMAP II form respectively (18,746.70 Da) (Fig. 1B, underlined). This result confirmed (i) that the polyclonal human antibody specifically recognizes its leech counterpart, and (ii) that the complex *Hm*-P43/EMAP II and its cleaved form are both produced in the leech CNS. This is the first report of the existence of the mature *Hm*-EMAP II protein in an invertebrate.

Synthesis of *Hm*P43/EMAPII by neurons and by microglial cells

Gene expression site of *Hm*-P43/EMAP II and immunolocalization of *Hm*-EMAP II and/or its precursor (*Hm*-P43/EMAP II) protein were investigated in the leech CNS. Experiments of FISH realised on dissociated neurons and microglial cells shown that *Hm*-P43/EMAP II gene is expressed in both cells (Fig. 3-1). Moreover, a specific accumulation of *Hm*-P43/EMAP II transcripts is evidenced by microglial cells accumulated at the axotomized site of the nerve cord cultured during 24 hours (Fig. 3-3). In parallel, immunological analyses revealed that *Hm*-EMAP II protein and/or its precursor is localized also in both neurons and microglial dissociated cells (Fig. 3-5).

A

```

M A S K T A L M R S L Q E K S L R A D N A L A Y L K Q      27
ATG GCA TCT AAA ACT GCT TTA ATG CGT TCT CTT CAA GAG AAA TCA CTG CGA GCC GAT AAT GCT CTT GCT TAT TTG AAA CAG      81

Q F E Q L K K L A V T S A C A H Q E E C Y K A E N E K      54
CAA TTC GAA CAA CTC AAG AAA CTG GCC GTG ACT TCT GCT TGC GCA CAC CAA GAG GAA TGT TAC AAG GCT GAA AAT GAA AAA      162

L R N E V T E L R T K L I E V E T K N G L K Q V P L P      81
CTG AGG AAT GAA GTA ACT GAG TTG AGA ACA AAA TTG ATT GAG GTT GAG ACA AAA AAT GGA TTG AAG CAG GTC CCT CTG CCA      243

E N L K S S Q T P A S A N V P T V Q D K P L E K Q H V      108
GAG AAC TTG AAA TCA TCT CAA ACT CCA GCT TCT GCT AAT GTA CCA ACT GTC CAG GAT AAG CCT TTG GAG AAG CAG CAT GTC      324

N K V E K Q Q G E K V E K A T K K E D K S T K K Q A N      135
AAC AAA GTT GAG AAA CAG CAA GGT GAG AAG GTA GAA AAG GCT ACT AAA AAA GAA GAC AAG AGT ACT AAG AAG CAA GCC AAT      405

Q P Q P P K A E K S D K G S E Q P P A S V D V S R L N      162
CAA CCT CAG CCA CCA AAG GCA GAA AAG TCT GAC AAG GGC TCT GAG CAG CCT CCT GCC TCT GTT GAT GTT TCC AGG TTG AAC      486

M K I G K I V A V D K H P D A D S L Y V E Q V D L G E      189
ATG AAG ATT GGA AAG ATT GTG GCA GTG GAC AAG CAC CCC GAC GCC GAC TCC TTG TAC GTC GAG CAG GTG GAC CTC GGA GAG      567

G K N R T I I S G L V K H V P I E Q M Q G R L A V F L      216
GGA AAG AAC AGG ACG ATC ATC AGT GGT CTG GTT AAG CAC GTC CCC ATC GAA CAA ATG CAA GGA AGA TTA GCC GTT TTC CTC      648

T N L K P A K M R G I M S E G M I M C A N V P E K V E      243
ACA AAC TTG AAA CCG GCA AAG ATG AGG GGC ATC ATG TCA GAA GGC ATG ATC ATG TGC GCT AAC GTG CCC GAA AAG GTG GAA      729

I I E P P A G A A I G D R V I V E G Y P G E P D E M L      270
ATC ATC GAA CCT CCC GCT GCA GCT ATA GGA GAC AGA GTA ATT GTC GAG GGA TAT CCA GGT GAC CCA GAT GAG ATG TTG      810

N P K K K T W E S I M P D L Q A N G E G F A T Y K G A      297
AAC CCA AAG AAG AAG ACT TGG GAG TCT ATC ATG CCA GAC CTT CAG GCA AAC GGG GAG GGC TTT GCG ACA TAC AAG GGG GCT      891

L W K I E G K G Y F M A P T V R N G Q I K *      319
CTT TGG AAG ATC GAG GGC AAG GGA TAT TTC ATG GCC CCG ACG GTC AGG AAC GGC CAA ATC AAA TAA      957

```

B

```

Hm-P43/EMAPII      MASKTALMRS LQEKSLRADNALAYLKQQFEQLKKLAVTSACAHQE ECKYAENEKL RNEVT 60
hp43/EMAPII      MANNDVILKRL EQKGAEADQII EYLKQQVSL LKEKAILQATLREEKKLRVENAKL KKEIE 60
                  **.: **: : **:*. **: : *****. **: *: .* **: :. ** **::*:

Hm-P43/EMAPII      ELRTKLIEVETK NGLKQVPLPENL KSSQTPASANVPTVQDKPLEKQHVNKVEKQQGEKVE 120
hp43/EMAPII      ELKQELIQAEIQNGVKQIRFPS-----GTPLHANS-MVSENVIQSTAVTTVSSG TKEQIK 114
                  **: :*:.* **:*: **:*. ** ** *: :. :. *..* **::

Hm-P43/EMAPII      KATKKEDKSTKKQANQPQPPKAEKSDKGSEQPPASVDVSR LNMKIGKIVAVDKHPDADSL 180
hp43/EMAPII      GGDEKKAKEKIEKKGEKKE-KKQSQIAGSADS-KPIDVSR LLDLRIGCIITARKHPDADSL 172
                  . *: *.. :. :. : * :*: ** :. :. :*****:*** *:.. *****

Hm-P43/EMAPII      YVEQVDLGEGKNRTIISGLVKHVP IEQMGR LAVFLTNLKP AKMRGIMSEG MIMCANVPE 240
hp43/EMAPII      YVEEVDVGEIAPRTVVSGLVNHNVP LEQMQRNRMVILL CNLKP AKMRGVL SQAMVMCASPE 232
                  **:*:*:** **:*****:***:***:*. :. :* *****:*. :. :*. **

Hm-P43/EMAPII      KVEIEPPAGAAIGDRVIVEGYGPEPDEMLNPKKKTWESIMPDLQANGEGFATYKGALWK 300
hp43/EMAPII      KIEILAPPNGSVPGDRITFD AFGPEPKELNPKKIIWEQIQPDLHTNDEC VATYKGVPE 292
                  *:*: ** *: . **: :. :*****: ***** **.* **: :*. * *****. :.

Hm-P43/EMAPII      IEGKGYFMAPTVRNGQIK 318
hp43/EMAPII      VKGKGVCRAQTMSNSGIK 310
                  :*:** * *: . **

```

Figure 1: Amino acid and nucleotide sequences of *Hirudo medicinalis* Hm-P43/EMAP II

(A) Complete molecular cloning of *Hm*-P43/EMAP II cDNA reveals a 319 amino acid sequence with the predicted sequence (shown in italics) encoding a *Hm*-EMAP II protein of 172 amino acids in length. (B) Homology of *Hm*-P43/EMAP II protein sequence with the human complex P43/EMAP II. The ClustalW (1.83) alignment program reveals 44% of identity between *Hm*-P43/EMAP II and human complex P43/EMAP II amino acid sequences (accession number B55053) and 58% of identity between the synthetic human EMAP II construct (underlined ; accession number CAA69993) and the predicted cleaved *Hm*-EMAP II sequence (shown in italics). ("*" identical amino acids (aa), ":" conserved substitutions aa, "." semi-conserved substitutions aa).

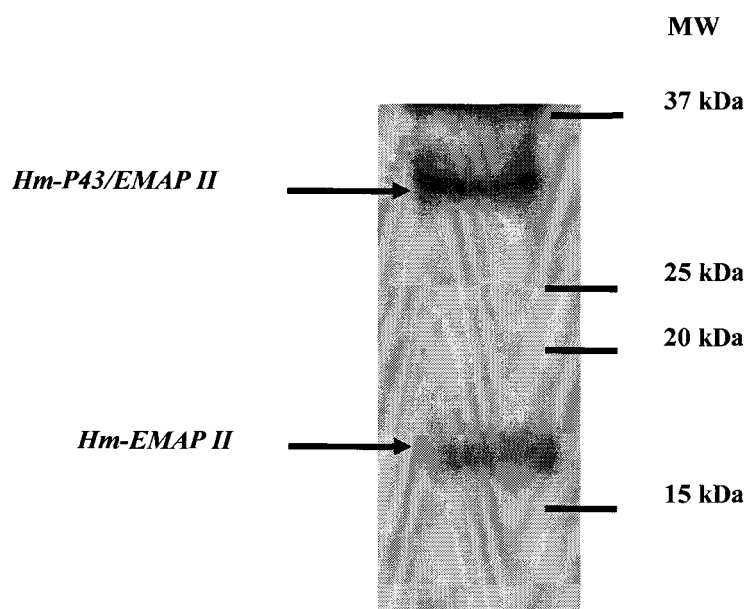


Figure 2: Biochemical characterization of *Hm-P43/EMAP II*. Western Blot analysis realized on total protein extracts from leech nervous system with polyclonal antibodies anti-*hEMAP II* rose against recombinant human EMAP II. Results show two bands, around 18 kDa and 35 kDa, corresponding to *Hm-EMAP II* and *Hm-P43/EMAP II* mass predictions, respectively. Membrane-immobilized proteins were visualized by enhanced chemiluminescence. (Mw: molecular weight markers).

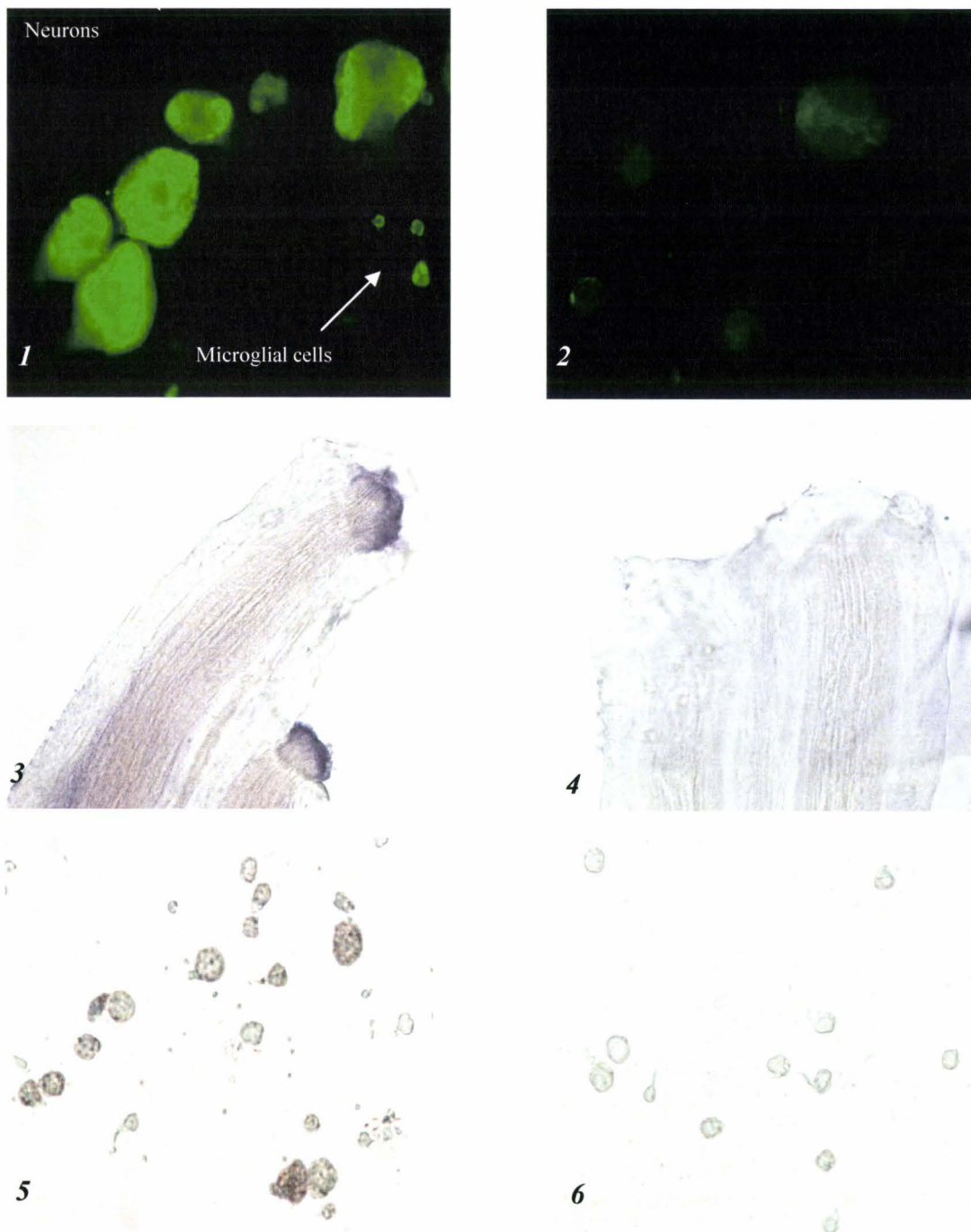


Figure 3: *In situ* hybridization and immunolocalization of *Hm*-P43/EMAP II in the leech CNS. *Hm*-P43/EMAPII (green fluorescence) gene expression sites were detected on dissociated neurons and microglial cells (1). Accumulation of transcripts of *Hm*-P43/EMAPII at the axotomy site of the nervous chain cultured for 24 h (3). No hybridization was noticed with the sense riboprobe confirming the specificity of the labelling obtained with the antisense riboprobe (2, 4). Immunolocalization of *Hm*-P43/EMAP II proteins on dissociated neurons and microglial cells (5). Control (6) performed with anti-*h*EMAP II preabsorbed with human recombinant *h*EMAP II.

Gene induction of *HmP43/EMAP II* in the leech CNS

Gene expression pattern of *Hm-P43/EMAP II* during regeneration and immune response of the leech CNS was investigated by real-time PCR. In a first set of experiments, the *Hm-P43/EMAP II* gene induction was measured during the regeneration process. Analysis of RNA level was assessed in axotomized nerves chords cultured during 0 h, 6 h, 1 days, 3 days and 8 days in septic condition. Results, illustrated in figure 4A, showed that *Hm-P43/EMAP II* transcript levels were significantly increased after 1 day up to 8 days. 6 h after axotomy, the level of transcripts was similar to the control ($t=0$). In a second set of experiments, we investigated an eventual role of *Hm-P43/EMAP II* in immune response. We studied its gene expression level in regenerating nervous cords in presence of microbial components stimulations for 6 hours, in order to discriminate the gene expression part due to regeneration process. Nervous chains cultures were then incubated with PolyI:C, Mannan, Zymosan, or killed Gram negative and Gram positive bacteria. As observed in figure 4B, the gene expression of *Hm-P43/EMAP II* is increased after bacterial exposures only. No enhancement of the gene expression was observed in presence of PolyI:C, Mannan or Zymosan. These results suggest that *Hm-P43/EMAP II* complex may be implicated in the regeneration process and in the response of the leech CNS to a bacterial infection.

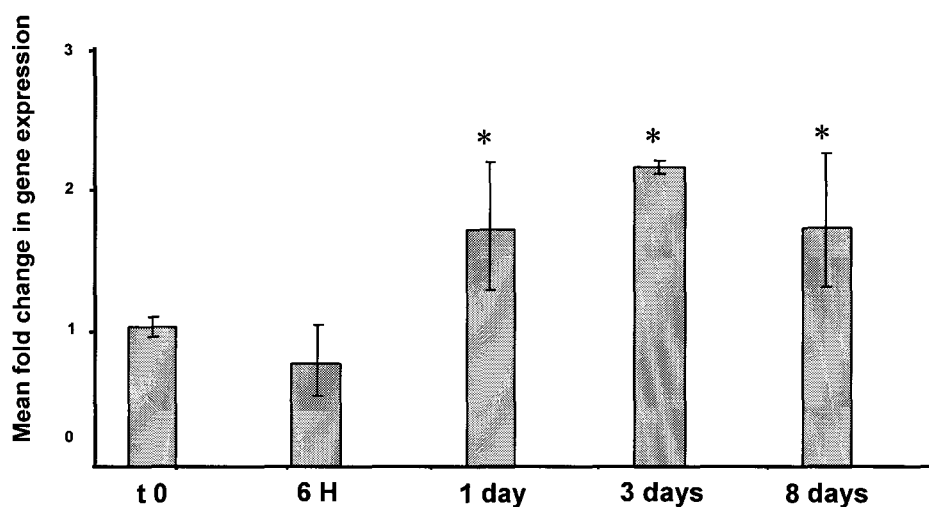
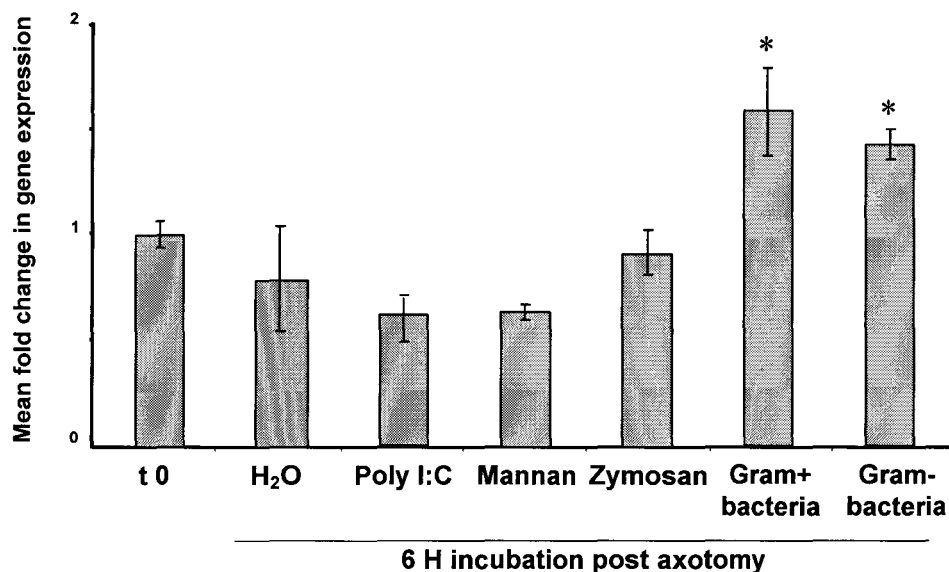
A**B**

Figure 4: Analysis by real-time PCR of *Hm*-P43/EMAP II gene expression in the leech CNS. Total RNAs were extracted from regenerating nervous chains cultured in L-15 medium at different time exposures with or without pathogen stimulations. **(A)** Data show a significant increase of the *Hm*-P43/EMAP II gene expression after 1 day of regeneration. **(B)** Analysis of *Hm*-P43/EMAP II gene expression following different microbial components inductions during 6 H (Zymosan, Poly I:C, Mannan and Gram+ or Gram- bacteria). *Hm*-P43/EMAP II gene expression appears to be stimulated by the presence of bacteria. All samples were normalized to 18-S gene expression.

Accumulation of *Hm*EMAP II and/or its precursor at the axotomized site

In order to study the role of *Hm*-EMAP II protein in the immune response of the leech CNS, experiments of immunolocalization using anti-*h*EMAP II antibody were realized on axotomized (A) or crushed (B) nervous chains cultured during 6 hours and challenged with a mix of heat killed *A. hydrophila* and *M. nishiyamentis* to the medium (Fig. 5). As revealed by Hoechst nuclear staining, an accumulation of microglial cells was occurred at the lesion site 6 hours post axotomy (Fig. 5A-2) or crush (Fig. 5B-3). No accumulation of these cells was visualized at $t=0$ (Fig. 5A-1), confirming previous observations by Morgese (Morgese et al 1983). By contrast with the CNS immediately fixed, nerve cords fixed 6 h after bacterial challenge shown a strong accumulation of *Hm*-EMAPII and/or its precursor at the lesion site (Fig. 5A-5 and 5B-6). In the case of axotomized chain, some accumulated microglial cells strongly produce *Hm*-EMAP II and/or its precursor (Fig. 5A-5). This observation correlates with vertebrates studies showing that activated microglia accumulated at the lesion site intensively express EMAP II and/or its precursor (Schluesener et al., 1997). In the case of crushed connectives, a low level of expression of *Hm*-EMAP II and/or its precursor is detected in accumulated microglial cells (Fig. 5B-6). Moreover, in both conditions a low number of accumulated microglia seems to not be stained by the antibody. Similar phenomena were also reported in vertebrates (Zhang et al., 2005). Overall, these results suggest that *Hm*-EMAP II and/or its precursor is/are also produced by microglia and/or axons present in connectives.

Role of *Hm*EMAP in leech nervous system

The presence of a cleaved form of *Hm*-EMAP II in leech CNS and the high homology between *Hm*-EMAP II and *h*EMAP II prompted us to search for a functional effect of the EMAP II in leeches using human recombinant *h*EMAP II. We evaluated its effect on the recruitment of leech microglial cells, which are the resident macrophagic cells population of the CNS. Indeed, in mammals EMAP II presents a chemotactic activity on peripheral macrophagic cells (van Horssen, 2006). However, to date no study has demonstrated a chemotactic role of EMAP II towards vertebrate's microglial cells. Chemotaxis tests revealed that microglia exhibited a strong migratory activity in response to *h*EMAP II one hour after application at a concentration of 100 ng/ml ($p<0.05$; Fig. 6). In these conditions, there was an two-fold increase in the number of cells that migrated to the chemoattractive container

compared to the control. At lower concentrations, leech microglial cells showed a dose-dependent chemotactic response albeit not significant compared to control. At 0.01 ng/ml, the number of counted cells is almost identical to the control assay, suggesting a passive diffusion in both cases. The decrease of migrating cells at very high *h*EMAP II concentration (1 µg/ml) is a typical feature of chemotaxis tests, due to a quick diffusion of the chemoattractant product between the compartments (Fig. 6). These data underscored the ability of *h*EMAP II to exert a chemotactic effect on microglial cells adding to its already pleiotropic properties. The recruitment of microglial cells at a lesion site in the leech CNS might thus be a physiological function as we showed above that the accumulation of *Hm*-EMAP II protein is associated *in vivo* with the accumulation of microglial cells at the lesion site.

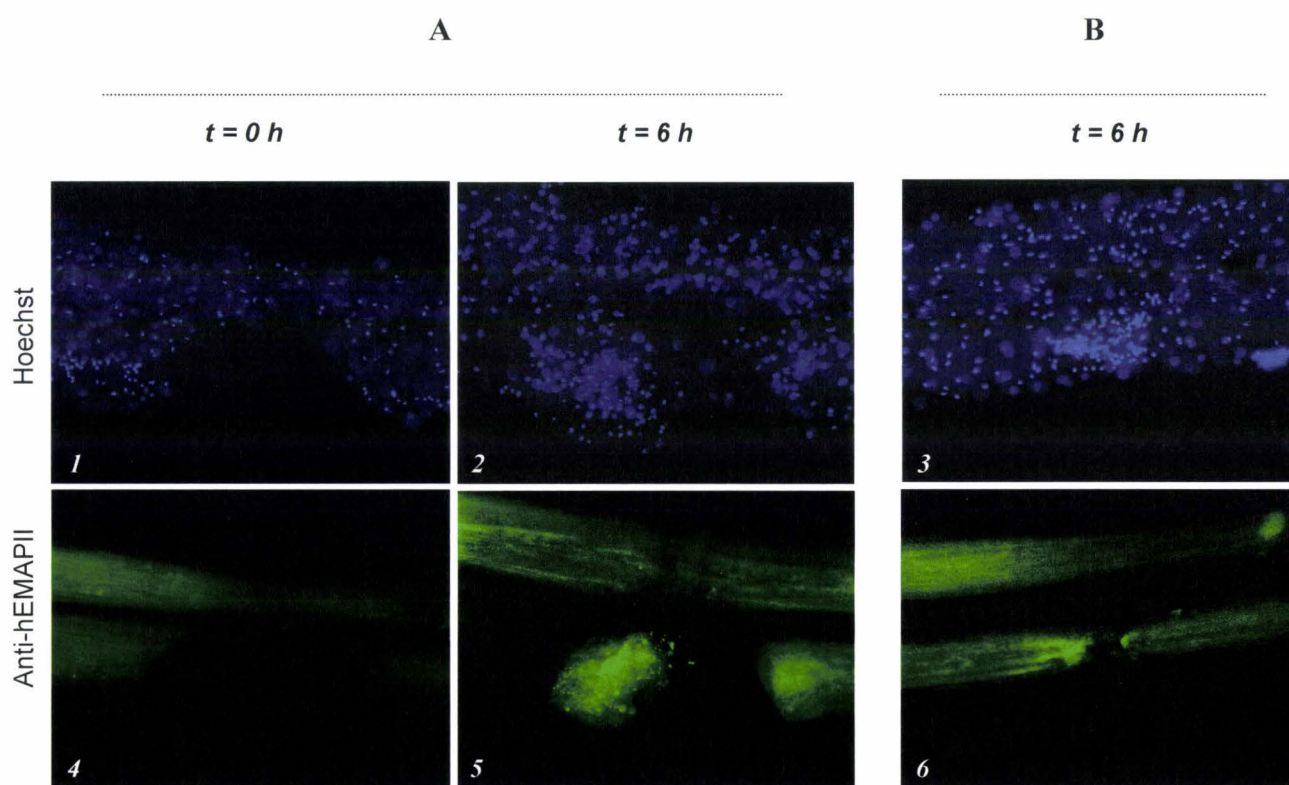


Figure 5: *In vivo* immunostaining of *Hm*-EMAP II during regeneration of the leech CNS. Nerve cords were cultured in presence of bacteria and stained with a fluorescent anti-*h*EMAP II antibody. (A) One connective of the nervous chains was cut and cultured in L-15 medium during 0 h (control) and 6 h. (B) One connective was crushed and cultured during 6 hours. Control was considered like the second non-crushed connective. Hoechst coloration was performed on each sample. Results show an accumulation of microglials cells at the lesion site (2,3). Accumulation of *Hm*-EMAP II protein is localized at the lesion site in case of cut (5) or crush (6).

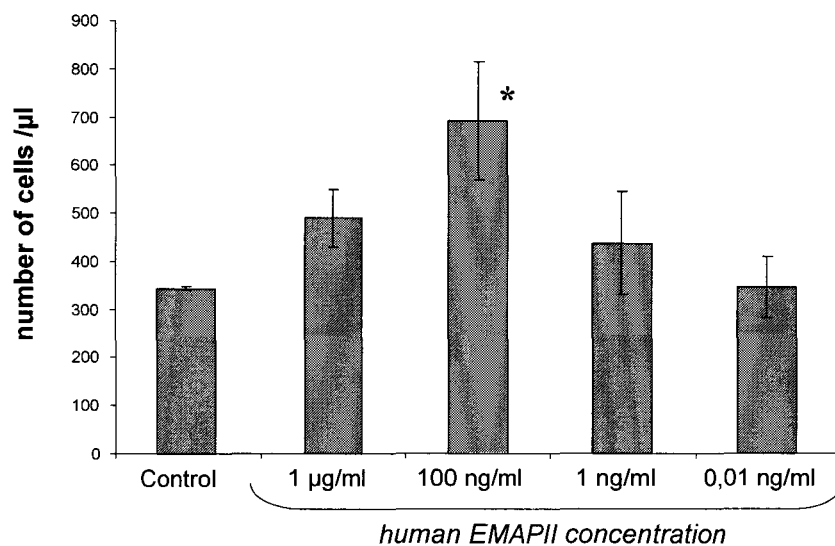


Figure 6: Chemotaxis test of leech microglial cells in response to human EMAP II. Results show a significant chemotactic effect of *h*EMAP II on microglial cells for a concentration of 100 ng/mL. Tests were realized using the single-path agar chamber technique (Köhidaï & al., 1995). Experiments were performed in triplicate. Each value represents the mean $\pm$ SD cell number. (*, $p < 0.05$).

DISCUSSION

Taken together, these results present the first cytokine evidenced in the leech CNS. Indeed, in this study we have characterized a homologue of the human P43/EMAP II complex in the leech CNS, named *Hm*-P43/EMAP II. Amino acid sequences comparison shown a great identity between the human and the leech orthologs, particularly for the C-terminal regions corresponding to the EMAP II domain. Thus, based on the high identity of the human and the leech EMAP II domain, we choose to evaluate the ability of the available polyclonal anti-*h*EMAP II antibody to recognize the *Hm*-P43/EMAP II. Indeed, Western blot analyses confirm the specific recognition of the leech molecule by the human antibody by revealing the presence of the *Hm*-P43/EMAPII precursor and the potentially active cleaved form of *Hm*-EMAP II in the leech CNS. The molecular sizes of the two bands obtained were similar to those found in vertebrates (Kao et al., 1994). Moreover, the presence of the cleaved *Hm*-EMAP II form in the leech CNS suggests the existence of enzymatic candidates able to cleave the *Hm*-P43/EMAP II protein. However, enzymatic candidates able to cleave the precursor thus releasing the mature form of the EMAP II protein are not clearly elucidated. In vertebrates, the fact that P43/EMAP II was generally cleaved in apoptotic conditions has led authors to believe that caspases can be responsible of this cleavage, and notably caspases-3 and -7 (Behrendorf, 2000; van Horssen, 2006). Conversely, others authors assert that P43/EMAP II is not cleaved by these caspases (Zhang and Schwarz 2002). A homologue to the human caspase-7 was found in the EST bank of the leech CNS. Future investigations will allow us to predict if *Hm*-Caspase-7 is a candidate protease involved in the proteolytic maturation of *Hm*-P43/EMAP II.

In the present study, we have shown that neurons and microglial cells express *Hm*-P43/EMAP II transcripts and produce *Hm*-EMAP II and/or its precursor. This result confirmed the observations done in vertebrates where *h*EMAP II was produced by neurons and microglial cells (Murray et al., 2000; Knies et al., 2000). Unfortunately, the anti-*h*EMAP II antibody did not allow the distinction between the cleaved form of the protein and its precursor (Journeay and Singh, 2007; Guo et al., 2007). However, many studies have shown that the cleaved form of EMAP II and its precursor P43/EMAP II exhibited similar functional activities (van Horssen, 2004). Nonetheless, unlike P43/EMAP II, the cleaved form of EMAP II can be secreted in the extracellular environment. The physiological impact of cleavage and secretion of *Hm*EMAP II in the leech CNS will further be investigated.

In the course of regeneration processes of the leech CNS, real-time PCR analyses have shown an increase of *Hm*-P43/EMAP II gene expression 1 day postaxotomy. Moreover, we have shown that in the case of bacterial challenge, *Hm*-P43/EMAP II gene expression increases more rapidly (6 hours) than in non septic conditions, and this increase of expression being associated with an induction of the *Hm*-EMAP II protein at the lesion site. Indeed, a strong accumulation of the *Hm*-EMAP II protein and/or its precursor was revealed by *in vivo* immunohistological experiments at the lesion site of the axotomized and stimulated nerve cords, together with an accumulation of microglial cells. Some of these cells intensively express the *Hm*-EMAP II protein, as observed in vertebrates (Mueller et al., 2003; Brabeck et al., 2002). *In situ* hybridization experiments showing an accumulation of transcripts by microglial cells sprouting at the extremity of the lesion site correlate this result. However, not all microglial cells present at the lesion site appears to express *Hm*-EMAP II. Similar phenomena were reported in vertebrates. Indeed, Zhang et al. (2005) described incomplete rat spinal cord microglia activation in experimental autoimmune neuritis and speculated that these inactive cells might be spared for events that finally do not develop. This data suggest consequently that not all leech microglial cells are activated, or that some activated cells do not express *Hm*-EMAP II. The increase expression of *Hm*-P43/EMAP II evidenced by real-time PCR may be explained by the recruitment of activated microglial cells at the lesion site rather than by the proliferation *in situ* of these cells. Indeed, in contrast to vertebrates these cells do not proliferate in leeches (von Bernhardt and Muller, 1995). In each case, leech microglial cells seem to detect the presence of bacteria, as vertebrate's cells who detect bacteria by the presence of numerous pattern recognition receptors (for reviews see Griffiths et al., 2007). Nevertheless, to date no data in leeches allows us to confirm this hypothesis.

In the leech, microglial cells have similar comportment and function with their vertebrates counterparts. Indeed, they are quiescent cells distributed in the leech nerve cords. After CNS injury, they accumulate at the lesion site and they participate to the elimination of cellular debris (McGlade and McCulloh, 1989; von Bernhardt et Nicholls, 1999). The synthesis of the cytokine *Hm*-EMAP II by the leech microglial cells confirms once again the functional similarity of these invertebrate cells with vertebrate's microglial cells.

One of the numerous properties of EMAP II listed in vertebrate's studies is to exert a chemotactic effect on peripheral macrophagic cells (Journeay et al., 2007). Indeed, the production of EMAP II by microglial cells during neuroinflammation participates to the recruitment of macrophages through the blood-brain barrier (Journeay et al., 2007). Here,

chemotaxis assays performed with the *h*EMAP II recombinant have shown a dose-dependent chemoattractant effect on purified leech microglial cells, with an optimal effect at 100 ng/ml. For chemotactic assays with human peripheral monocytoïd cells, a concentration of 10 ng/ml of *h*EMAP II is sufficient to induce attraction (Park, 2002; Kao, 1992). Such a difference may be explained in part by amino-acids mis-homologies between the leech and human EMAP II protein (58%) and by the heterologous conditions used for our test. However, the comparison is difficult to establish because there is no evaluation of EMAP II chemotactic activity on vertebrate microglial cells described to date. In perspective, we expect to test the chemotaxis effect of the leech *Hm*-EMAP II recombinant protein toward leech and mammal's microglial cells. Such a test with *h*EMAP II and mammal's microglial cells would be of interest to know if the brain resident phagocytic cells may also be chemoattracted by *h*EMAP II or if this property is specific to peripheral monocytoïd cells. In addition, this result draws the hypothesis of similar receptor(s) for human and leech EMAP II. In vertebrates, EMAP II induces migration of endothelial progenitor cells via the chemokine CXCR3 receptor (Hou et al., 2006). This receptor also expressed by mammals' microglial cells might be implicated in microglia recruitment (Rappert et al., 2004).

In summary, we report here the existence of the first chemokine present in the leech CNS. Our results indicate that *Hm*-EMAP II could take part in both regeneration processes and immune defence of the leech nervous system. Moreover, we evidenced a new chemoattractant activity on microglial cells for the proinflammatory cytokine *h*EMAP II. We suggest that the proinflammatory cytokine *Hm*-EMAP II has a role in the leech innate immunity through the recruitment of microglial cells at the lesion site in the CNS. Thus, the use of *Hirudo medicinalis* might contribute to better comprehension of the misunderstood processes of danger signalling molecules implied in the brain immune response in vertebrates.

ACKNOWLEDGEMENTS

Supported by Grants from Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Ministère de L'Education Nationale, de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MENESR), Genoscope (to MS), NIH-Fogarty Program (to MS). Thanks to the Centre Commun de Mesures Imagerie Cellulaire, University of Lille 1.

MATERIALS & METHODS

Nerve cord collect and treatments

Dissection — Adults *Hirudo medicinalis* specimens were obtained from Ricarimpex (Eysines, France) and maintained at room temperature in artificial pond water for acclimatization for at least one week prior to experimental use. After being anaesthetized in 10% ethanol solution at 4°C for 15 min, animals CNS were dissected out in leech Ringer (115mM NaCl, 1.8mM CaCl₂, 4mM KCl, 10mM Tris maleate, pH 7.4) in sterile condition under vertical flow hood. The nervous chains were incubated in Ringer solution with 3 successive baths of antibiotic cocktail (penicillin and streptomycin) during 15 minutes and placed in Leibovitz L-15 (Gibco) medium complemented with 10% SVF and 2 mM L-Glutamin.

Nervous chains stimulation — Dissected nervous chains were injured by crushing or cutting connectives between ganglia using sterilized forceps (Dumont N°5) and bathed *ex vivo* in L-15 medium containing different microbial components: 3×10^7 CFU/ml of heat killed Gram positive (*Micrococcus nishiiyamentis*) or Gram negative (*Aeromonas hydrophila*) bacteria isolated from the natural environment of *Hirudo medicinalis* (Schikorski et al., unpublished data) ; 100 µg/ml of zymozan (InVivoGen); 100 µg/ml of mannane (InVivoGen); 100 µg/ml of poly I:C (InVivogen). Incubations were performed for different time (t=0 to t=8 days) before samples were collected and frozen in liquid nitrogen.

Neuron dissociation — Nervous chains were placed individually in 35mm petri dishes with 200 µL of complemented L-15 medium. Each ganglion was manually and delicately opened with micro-dissection instruments under sterile conditions. Neurons were totally dissociated by passing the solution a few times through a large pipette tip.

Microglial cells purification — After cell dissociation, complemented L15 medium containing neurons and microglial cells was filtered in a nylon membrane having a mesh of 5 µm diameter. Indeed, preceding microscopic observations showed that the diameter of microglial cells was lower than 5 µm and that of neurons is higher. The eluted medium containing microglial cells was centrifuged at 700 rpm during 10 minutes. The supernatant was discarded and 60 µl of fresh complemented L-15 medium was added per nervous chain. The purified cells were used for chemotaxis tests.

Ganglia decapsulation — Dissected nervous chains were pinned at their extremity in 35 mm Petri dish coated with 1 ml of Silgard. Samples were fixed in 4% Paraformaldehyde during 15 min then leave in Ringer's medium. This step is necessary in order to harden the capsule and to not deteriorate the structure of the ganglia. The top of the ganglia was removed using micro scissors.

cDNA Cloning

EST bank screening — Partial sequence encoding the putative protein, which is highly similar to the human and mouse synthetase complex P43/EMAPII, have been retrieved from the leech *H. medicinalis* nervous system EST database from Hirudinea Genomics Consortium (http://www.cns.fr/externe/English/Projets/Projet_PE/PE.html). This molecule was named *HmP43/EMAPII*. In order to characterise the complete sequence of *HmP43/EMAPII*, reverse and forward oligonucleotides were designed from the EST sequences and used for 5' and 3'RACE PCR.

RNA extraction — RNA from *Hirudo medicinalis* whole body, nervous system chain and blood were isolated using the TRIzol Reagent (Invitrogen, manufacturer's protocol).

Rapid Amplification of 3'-cDNA End — RNA (3 µg) was transcribed into single stranded cDNA using oligo(dT)18-adaptator primer, 5'- CGAGTCGACATCGATCG(T)18 -3' (Kit superscript Tm, GIBCO/BRL, protocol of the manufacturer). One quarter of the reaction was amplified by PCR using oligo(dT)₃₂ adaptor primer and specific sense oligonucleotide, 5'- ctcaactcagttacttcattctca -3', whose sequence is deduced from 3'end sequences of EST bank (all oligonucleotides were purchased from OPERON). PCR was performed for 30 cycles using one unit of Gold-Taq polymerase (Appligene, protocol of the manufacturer) with an elongation time of 2 minutes. All PCR products were sub-cloned into pGEM-T easy vector (Promega) and several different cDNA clones were sequenced on an ABI Prism® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Rapid Amplification of 5'-cDNA End — Isolated RNA from *H. medicinalis* were used to build a cDNA library using the BD SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) following manufacturer's suggested protocol. Reverse transcription was performed using antisense oligonucleotides 5'-cggccagtttcttgagttgt-3' deduced from cDNA sequence of *HmP43/EMAPII* previously obtained and with a 5' terminal universal primer. cDNA synthesis

was performed with Advantage 2 polymerase enzyme (Clontech) with an elongation time of 3 minutes. All of the PCR products were subcloned into Strataclone vector (Stratagene), and several different cDNA clones were sequenced on an ABI Prism® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Gene Expression Analyses

RNA isolation and real time PCR — Twenty leeches were used per conditions. Nerve cords incubated in the presence or absence of killed bacteria, polyI:C, mannane or zymosan (see before for details) were crushed in 2 ml tubes prefilled with Qiazol reagent (Qiagen France) and 1,4 mm ceramic beads by shaking the mixture twice for 45 s at 6500 rpm in a Precellys®24 homogenizer (Bertin distributed by Ozyme, France). RNA extraction was performed according to the manufacturer and extracted total RNA was treated with RQ1Dnase1 (Promega, France) to prevent contaminations with genomic DNA. First strand cDNA was generated from 2 µg of total RNA using random primers (Promega, France) and Superscript III Reverse Transcriptase (RT) kit (Invitrogen, France) in a final volume of 60 µl. Omitting RT or RNA from the reaction mixture resulted in non amplification control and non template control respectively. cDNA were treated with RNaseH (Promega, France) to optimize the amplification. Real time PCR were performed with the Quantitect SYBRgreen PCR kit (Qiagen, France) by combining 1µl of cDNA, 0.8 µM of each primer and 1X of SYBRgreen reagent in a final volume of 25µl. The primers were designed with the Primer3 Input software (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) according to the conditions described in the PCR kit. *HmEMAPII*: 5'- TGGGAGTCTATCATGCCAGA -3', 5'- TCAGCGGCTTATTTGATTTG -3'; *18S*: 5'-TGCGGTTATTTTCGATTGTCA-3', 5'- AGACAAATCGCTCCACCAAC-3'. Real time was conducted on an Applied Biosystem 5700 using hot start with cycle conditions, 40 cycles: 94°C, 15 s; 56°C, 30 s and 72°C, 30 s, followed by a final 72°C extension for 3 min.

In situ hybridization: Dissociated cells were fixed in a 0.1M sodium phosphate buffer pH 9.5, containing 4% paraformaldehyde (weight/volume) and 50 mM EDTA during 30 min at 4°C. Then cells were cytopspined with fixation buffer 5 min at 1000 rpm on poly-L-lysine-coated slices. After, slices were washed two times for 1 min in PBS. Nervous chains were fixed overnight in a solution containing 13% formalin, 39% ethanol, and 0.65% ammonium hydroxide, pH 6.4. After dehydration, chains were cytopspined on poly-L-lysine-coated slides, and stored at 4 °C until use. Before hybridizing, samples were rehydrated by washing 5 min in

96%/70%/30% ethanol and finally two times for 10 min in PBS. A plasmid containing a 483 pb coding region of *HmP43/EMAPII* probes, synthesized from a PCR nucleotide fragment amplified with specific sense 5'-tggttccaggtgaacatga-3' and antisense 5'-ttgattggccgttcctgac-3' primers, were used as templates for the synthesis of the probes. 5'Biotin labelled and Digoxigenin (DIG)-UTP-labelled probes were generated from linearized cDNA plasmid by *in vitro* transcription using DIG/Biotin RNA-labelling-kit (Roche, protocol of the manufacturer). DIG and Biotin labelled riboprobes (40-100 ng per slide) were hybridized as previously described. Slices were mounting with glycerol (SIGMA). Control for *in situ* hybridization consisted in replacing antisense riboprobe with sense riboprobe. RNase control sections were obtained by adding a pre-incubation step with 10 µg/ml RNaseA prior to hybridization.

Biochemical characterization

Protein extract — Ten nerve cords were dissected and frozen in liquid nitrogen. Samples were crushed with a mortar in liquid nitrogen and powder was resuspended in lysis buffer (9.5 M urea, 2% Triton X-100, 65mM b-mercaptoethanol, 1.25% SDS). Protein concentration was determined by Bradford method using BSA as standard (Bradford, 1976).

SDS-PAGE — electrophoresis was realised according to the technique of *Tastet and al* (2003). Running gel was composed of 10 % acrylamide with Tris 150g/HCL 0,6N and the stacking gel was composed of 4 % acrylamide with Tris 120g/HCL 0,8N. Migration was performed using a cathode buffer (0,6 % Tris Base, 2,5 % Taurine, 0,1% SDS) and an anode buffer (0,6% Tris Base, 2,8 % Glycine, 0,1 % SDS). 50 µg of proteins extract from nervous system were loaded in Laemmli buffer (Tris 120g/HCl 0.8 N, du glycerol 50%, du SDS 10%, du DTT 7,7%). Gels were run at 70V for 15 min and 120V for 45 min.

Protein immunocharacterization and immunolocalization

Polyclonal antibody— Due to the great identity level between *HmEMAPII* and human EMAPII (*hEMAPII*) amino acid sequences, the donkey polyclonal anti-*hEMAPII* was used for our analysis (Peprotech).

Western Blotting—SDS-PAGE gel was transferred to nitrocellulose membrane (Hybond-C extra, Amersham) by electroblotting. After transfer membrane was blocked during 1 hour in PBS containing 0.05% Tween-20 and 0,7% Casein and then probed with the polyclonal anti-

hEMAPII (1:1200, Peprtech) in blocking solution overnight at 4 °C. After extensive washes with PBS 0,05%Tween-20, the detection of labelled bands was performed using a peroxidase linked to anti-donkey secondary antibody (1:5000; 1h30 min, at room temperature) and the Amersham ECL western blotting kit (Amersham) was used as a chemoluminescence visualization protocol with Kodak Co. X-Omat AR film.

Whole immunohistochemistry — Nerve chords were fixed overnight at 4°C in 4% paraformaldehyde after bacteria exposure. Membranes were permeabilized by incubating the samples in PBS containing 1% Triton X-100 for 24 h at room temperature. Nonspecific background staining was blocked with a BS solution (PBS containing 1% Triton, 3% normal goat serum (NGS) 3% normal donkey serum (NDS) and 1% Ovalbumin) for 8 h at room temperature. Samples were then incubated with goat anti-*hEMAPII* antibodies (1/400e, Peprtech) diluted in the AB solution (PBS containing 1% BSA, 0.05% Triton, 1% NGS, 1% NDS and 1% Ovalbumin) overnight at 4°C. Primary antibodies were removed and samples were incubated with Alexa Fluor 488 conjugated to rabbit anti-donkey secondary antibodies (Invitrogen) diluted 1:5000 in the AB solution. As a control, the immunolabelling procedure was carried out with a filtered (4µM) solution of goat anti-*hEMAPII* antibody previously saturated with the *hEMAPII* recombinant overnight at 4°C (1 mg of antigen per µl of pure antibody).

Immunocytochemistry — Sample preparation of the slide was the same as for *in situ* hydridation (see before). After fixation, samples were washed three times in PBS during 10 min and then saturated in the BS solution without Triton X-100 at room temperature during 1 hour. Slides were incubated with goat anti-*hEMAPII* antibodies overnight at 4°C. Antibodies are diluted at the previous concentration in the AS solution containing just 0.01 % Triton X-100. Primary antibodies were removed and samples were incubated with Alexa Fluor 488 conjugated or Peroxydase conjugated to rabbit anti-donkey secondary antibodies diluted 1:5000 in the AB solution. Controls were performed as previously described.

Chemotaxis test

Chemotaxis assays were realized using the Double-P assay described by Köhidai et al. (Köhidai et al., 1995) with some modifications. 35 mm Petri dish with 1 ml of 0,5% agar 1% gelatine were prepared in a microwave oven and cooled for 2 h at room temperature. Two containers of 6 mm diameter were cut out, each presenting a parallel individual channel of

0,75 mm of broad and 20 mm of length. These two parallel channels were distanced of 15 mm. The containers were filled, one with 50 μ l of purified microglial cells (1×10^6) and the second with different concentrations of the recombinant *h*EMAPII (0,01 ng/ml; 1 ng/ml ; 100 ng/ml ; 1 μ g/ml). A channel was realised perpendicularly to the two others with a clean coverslip. 30 minutes later, cells present in the chemoattractant containers were collected and the number of migrating cells was counted three times on a Malassez slide. Experiments were realized in triplicate. The results are expressed as the mean cell number $\pm$ SD. Statistical analysis was done using a two-tailed Student's *t* test.

Images acquisition

Visible images were acquired with a ZeissTM Axioskop microscope. Fluorescence images were collected with a Leica DMIRE2 microscope at CCMIC of the University of Lille 1. Alexa 488 was excited at 480 nm, which produce a green signal. Pictures were taken using the logiciel FW4000 Leica.

Bioinformatics tools

Amino acid sequences were analysed for similarly searches sequences using the Blast program available at the homepage of the National Center Biotechnology Information at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. Multiple sequence alignments were made with the appropriate ClustalW programs of the European Bioinformatics Institute at <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>.

REFERENCES

- Aloisi F. (2001) Immune function of microglia. *Glia* **36**, 165-79.
- Babington E. J., Vatanparast J., Verrall J. and Blackshaw S. E. (2005) Three-dimensional culture of leech and snail ganglia for studies of neural repair. *Invert Neurosci* **5**, 173-82.
- Barron K. D. (1995) The microglial cell. A historical review. *J Neurol Sci* **134 Suppl**, 57-68.
- Behrendorf H. A., van de Craen M., Knies U. E., Vandenabeele P. and Clauss M. (2000) The endothelial monocyte-activating polypeptide II (EMAP II) is a substrate for caspase-7. *FEBS Lett* **466**, 143-7.
- Bernhardi R. V. and Nicholls J. G. (1999) Transformation of leech microglial cell morphology and properties following co-culture with injured central nervous system tissue. *J Exp Biol* **202 (Pt 6)**, 723-8.
- Blackshaw S. E., Arkison S., Cameron C. and Davies J. A. (1997) Promotion of regeneration and axon growth following injury in an invertebrate nervous system by the use of three-dimensional collagen gels. *Proc Biol Sci* **264**, 657-61.
- Block M. L. and Hong J. S. (2005) Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog Neurobiol* **76**, 77-98.
- Brabeck C., Michetti F., Geloso M. C., Corvino V., Goetzalan F., Meyermann R. and Schluesener H. J. (2002) Expression of EMAP-II by activated monocytes/microglial cells in different regions of the rat hippocampus after trimethyltin-induced brain damage. *Exp Neurol* **177**, 341-6.
- Chiquet M. and Nicholls J. G. (1987) Neurite outgrowth and synapse formation by identified leech neurones in culture. *J Exp Biol* **132**, 191-206.
- Coraci I. S., Husemann J., Berman J. W., Hulette C., Dufour J. H., Campanella G. K., Luster A. D., Silverstein S. C. and El-Khoury J. B. (2002) CD36, a class B scavenger receptor, is expressed on microglia in Alzheimer's disease brains and can mediate production of reactive oxygen species in response to beta-amyloid fibrils. *Am J Pathol* **160**, 101-12.
- Davalos D., Grutzendler J., Yang G., Kim J. V., Zuo Y., Jung S., Littman D. R., Dustin M. L. and Gan W. B. (2005) ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* **8**, 752-8.
- Giulian D., Chen J., Ingeman J. E., George J. K. and Noponen M. (1989) The role of mononuclear phagocytes in wound healing after traumatic injury to adult mammalian brain. *J Neurosci* **9**, 4416-29.
- Griffiths M., Neal J. W. and Gasque P. (2007) Innate immunity and protective neuroinflammation: new emphasis on the role of neuroimmune regulatory proteins. *Int Rev Neurobiol* **82**, 29-55.

- Hanisch U. K. (2002) Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* **40**, 140-55.
- Hou Y., Plett P. A., Ingram D. A., Rajashekhar G., Orschell C. M., Yoder M. C., March K. L. and Clauss M. (2006) Endothelial-monocyte-activating polypeptide II induces migration of endothelial progenitor cells via the chemokine receptor CXCR3. *Exp Hematol* **34**, 1125-32.
- Husemann J., Loike J. D., Anankov R., Febbraio M., Silverstein S. C., Coraci I. S., Berman J. W., Hulette C., Dufour J. H., Campanella G. K., Luster A. D. and El-Khoury J. B. (2002) Scavenger receptors in neurobiology and neuropathology: their role on microglia and other cells of the nervous system CD36, a class B scavenger receptor, is expressed on microglia in Alzheimer's disease brains and can mediate production of reactive oxygen species in response to beta-amyloid fibrils. *Glia* **40**, 195-205.
- Journey W. S., Janardhan K. S. and Singh B. (2007) Expression and function of endothelial monocyte-activating polypeptide-II in acute lung inflammation. *Inflamm Res* **56**, 175-81.
- Kao J., Houck K., Fan Y., Haehnel I., Libutti S. K., Kayton M. L., Grikscheit T., Chabot J., Nowygrod R., Greenberg S. and et al. (1994) Characterization of a novel tumor-derived cytokine. Endothelial-monocyte activating polypeptide II. *J Biol Chem* **269**, 25106-19.
- Kao J., Ryan J., Brett G., Chen J., Shen H., Fan Y. G., Godman G., Familletti P. C., Wang F., Pan Y. C. and et al. (1992) Endothelial monocyte-activating polypeptide II. A novel tumor-derived polypeptide that activates host-response mechanisms. *J Biol Chem* **267**, 20239-47.
- Kielian T. (2004) Microglia and chemokines in infectious diseases of the nervous system: views and reviews. *Front Biosci* **9**, 732-50.
- Knies U. E., Kroger S. and Clauss M. (2000) Expression of EMAP II in the developing and adult mouse. *Apoptosis* **5**, 141-51.
- Kohidai L. (1995) Method for determination of chemoattraction in *Tetrahymena pyriformis*. *Curr Microbiol* **30**, 251-3.
- Kreutzberg G. W. (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* **19**, 312-8.
- Mander P. K., Jekabsone A. and Brown G. C. (2006) Microglia proliferation is regulated by hydrogen peroxide from NADPH oxidase. *J Immunol* **176**, 1046-52.
- Mayer A. M. (1998) Therapeutic implications of microglia activation by lipopolysaccharide and reactive oxygen species generation in septic shock and central nervous system pathologies: a review. *Medicina (B Aires)* **58**, 377-85.
- McGlade-McCulloh E., Morrissey A. M., Norona F. and Muller K. J. (1989) Individual microglia move rapidly and directly to nerve lesions in the leech central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 1093-7.

- Morgese V. J., Elliott E. J. and Muller K. J. (1983) Microglial movement to sites of nerve lesion in the leech CNS. *Brain Res* **272**, 166-70.
- Mueller C. A., Schluesener H. J., Conrad S., Meyermann R. and Schwab J. M. (2003) Lesional expression of a proinflammatory and antiangiogenic cytokine EMAP II confined to endothelium and microglia/macrophages during secondary damage following experimental traumatic brain injury. *J Neuroimmunol* **135**, 1-9.
- Murray J. C., Barnett G., Tas M., Jakobsen A., Brown J., Powe D. and Clelland C. (2000) Immunohistochemical analysis of endothelial-monocyte-activating polypeptide-II expression in vivo. *Am J Pathol* **157**, 2045-53.
- Nakamura Y. (2002) Regulating factors for microglial activation. *Biol Pharm Bull* **25**, 945-53.
- Park S. G., Kang Y. S., Ahn Y. H., Lee S. H., Kim K. R., Kim K. W., Koh G. Y., Ko Y. G. and Kim S. (2002) Dose-dependent biphasic activity of tRNA synthetase-associated factor, p43, in angiogenesis. *J Biol Chem* **277**, 45243-8.
- Piehl F. and Lidman O. (2001) Neuroinflammation in the rat-CNS cells and their role in the regulation of immune reactions. *Immunol Rev* **184**, 212-25.
- Qin B., Cartier L., Dubois-Dauphin M., Li B., Serrander L. and Krause K. H. (2006) A key role for the microglial NADPH oxidase in APP-dependent killing of neurons. *Neurobiol Aging* **27**, 1577-87.
- Raivich G., Bluethmann H. and Kreutzberg G. W. (1996) Signaling molecules and neuroglial activation in the injured central nervous system *Keio J Med* **45**, 239-47.
- Rappert A., Bechmann I., Pivneva T., Mahlo J., Biber K., Nolte C., Kovac A. D., Gerard C., Boddeke H. W., Nitsch R. and Kettenmann H. (2004) CXCR3-dependent microglial recruitment is essential for dendrite loss after brain lesion. *J Neurosci* **24**, 8500-9.
- Schluesener H. J., Seid K., Kretzschmar J. and Meyermann R. (1998) Allograft-inflammatory factor-1 in rat experimental autoimmune encephalomyelitis, neuritis, and uveitis: expression by activated macrophages and microglial cells. *Glia* **24**, 244-51.
- Schluesener H. J., Seid K. and Meyermann R. (1999) Effects of autoantigen and dexamethasone treatment on expression of endothelial-monocyte activating polypeptide II and allograft-inflammatory factor-1 by activated macrophages and microglial cells in lesions of experimental autoimmune encephalomyelitis, neuritis and uveitis. *Acta Neuropathol (Berl)* **97**, 119-26.
- Schluesener H. J., Seid K., Zhao Y. and Meyermann R. (1997) Localization of endothelial-monocyte-activating polypeptide II (EMAP II), a novel proinflammatory cytokine, to lesions of experimental autoimmune encephalomyelitis, neuritis and uveitis: expression by monocytes and activated microglial cells. *Glia* **20**, 365-72.
- Shalak V., Kaminska M., Mitnacht-Kraus R., Vandenabeele P., Clauss M. and Mirande M. (2001) The EMAPII cytokine is released from the mammalian multisynthetase complex after cleavage of its p43/proEMAPII component. *J Biol Chem* **276**, 23769-76.

- Shrikant P. and Benveniste E. N. (1996) The central nervous system as an immunocompetent organ: role of glial cells in antigen presentation. *J Immunol* **157**, 1819-22.
- Streit W. J. and Kincaid-Colton C. A. (1995) The brain's immune system. *Sci Am* **273**, 54-5, 58-61.
- van Horssen R., Eggermont A. M. and ten Hagen T. L. (2006) Endothelial monocyte-activating polypeptide-II and its functions in (patho)physiological processes. *Cytokine Growth Factor Rev* **17**, 339-48.
- von Bernhardi R. and Muller K. J. (1995) Repair of the central nervous system: lessons from lesions in leeches. *J Neurobiol* **27**, 353-66.
- Wakasugi K. and Schimmel P. (1999) Highly differentiated motifs responsible for two cytokine activities of a split human tRNA synthetase. *J Biol Chem* **274**, 23155-9.
- Zhang F. R. and Schwarz M. A. (2002) Pro-EMAP II is not primarily cleaved by caspase-3 and -7. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **282**, L1239-44.

DISCUSSION & PERSPECTIVES

Discussion & Perspectives

L'ensemble des travaux réalisés au cours de cette thèse met en évidence l'existence de trois molécules impliquées dans la réponse anti-infectieuse du SNC d'un annélide, la sangsue médicinale *Hirudo medicinalis* : deux peptides antibactériens, nommés neuromacine et *Hm-lumbricine*, et une molécule chimioattractante, la protéine *Hm-EMAP II*.

Mon travail a consisté à purifier et cloner ces différentes molécules et à en déterminer les activités biologiques. Des analyses d'hybridation *in situ*, d'immunocytochimie et de PCR quantitative m'ont permis d'étudier le rôle joué par ces molécules dans la réponse immunitaire du SNC de la sangsue.

Dans cette partie, l'ensemble des résultats obtenus est discuté et différentes perspectives de travail sont envisagées par rapport aux données acquises.

1) Les peptides antibactériens présents dans le SNC d'*H. medicinalis* :

L'origine de ce travail repose sur l'identification dans une banque d'ADNc construite à partir de chaînes nerveuses de sangsues adultes d'un gène codant un peptide présentant des homologies avec un peptide antibactérien isolé chez le ver de terre *Lumbricus rubellus* (Cho et al., 1998). Afin de confirmer mais également de rechercher d'autres molécules à fonction antibactérienne produites au niveau nerveux, des purifications ont été entreprises à partir d'extraits de SNC de sangsues.

a. Caractérisation moléculaire de l'*Hm-lumbricine* et de la neuromacine :

Les différentes fractions peptidiques issues de chromatographies liquides hautes performances sur colonnes de phase inverse (RP-HPLC) ont toutes été testées pour leur éventuelle activité antibactérienne. Deux fractions peptidiques positives ont été sélectionnées puis purifiées. La caractérisation complète de ces molécules a été réalisée par l'utilisation combinée de techniques de séquençage par dégradation automatique d'Edman et d'analyses par spectrométrie de masse (MALTI-TOF).

Le premier peptide antibactérien identifié, *Hm-lumbricine*, correspondait bien au peptide dont le gène avait été identifié à partir de la banque d'EST (*Expressed Sequence Tag*) de système nerveux de sangsue. L'*Hm-lumbricine* présente 78% d'identité avec la lumbricin-I, un peptide antibactérien précédemment isolé chez le lombric *Lumbricus rubellus* (Cho et al., 1998), et 81% d'homologie avec le peptide PP-1, un homologue de la lumbricin-I isolé chez le ver asiatique *Pheretima tschiliensis* (Wang et Wang, 2003).

Le deuxième peptide identifié a été nommé neuromacine (**neurone-théromacin**), en raison d'une part de sa localisation restreinte au SNC, comme nous le verrons dans le paragraphe suivant, et d'autre part de son importante homologie avec la théromacine. En effet, la séquence peptidique de la neuromacine présente 67% d'identité avec la théromacine, un peptide antibactérien précédemment caractérisé à partir du liquide coelomique de la sangsue *Theromyzon tessulatum* (Tasiemski et al., 2004). Le gène codant la théromacine a d'ailleurs été cloné chez *H. medicinalis* (*Hm-théromacine*). Cependant son expression s'avère être strictement limitée au niveau périphérique de l'animal.

L'analyse de la séquence en acides aminés déduite de l'ADNc de la neuromacine révèle que, tout comme pour la théromacine, la neuromacine est issue d'un précurseur constitué d'un peptide signal directement suivi par le peptide actif. Ce fait implique donc l'existence d'un processus classique de sécrétion de la neuromacine dans le milieu extracellulaire. L'*Hm-lumbricine*, quant à elle, ne possède aucun peptide signal. Il a cependant été démontré que certains peptides antibactériens dépourvus de peptide signal pouvaient être sécrétés. C'est le cas de PP-1 qui a été détecté dans le mucus recouvrant l'épiderme de l'animal (Wang et Wang, 2003).

Par ailleurs, l'analyse de la neuromacine native par MALTI-TOF a révélé une masse de 6709.62 Da mettant en évidence un écart d'environ 6 Da avec la masse de la séquence en acides aminés déduite de l'ADNc (6714.62 Da). Cette différence de masse pourrait s'expliquer par la présence de trois ponts disulfures impliquant 6 des 8 résidus cystéines de la neuromacine. La caractérisation biochimique de la théromacine avait en effet montré que les 10 résidus cystéines participaient à la formation de 5 ponts disulfures (Tasiemski et al., 2004). L'alignement des séquences peptidiques de la neuromacine et de la théromacine a permis de constater que les résidus cystéines 5 et 10 impliqués dans l'un des 5 ponts de la théromacine n'étaient pas conservés chez la neuromacine, alors que les 8 autres résidus cystéines s'alignaient parfaitement. Cela suggère que les 3 ponts disulfures de la neuromacine seraient

probablement communs à ceux de la théromacine. La détermination de leur emplacement exact sera entreprise très prochainement.

En parallèle, l'analyse de la séquence protéique de l'*Hm*-lumbricine indique qu'il s'agit d'un peptide antibactérien linéaire, comme il en est d'ailleurs le cas pour son homologue identifié chez le lombric. (Cho et al., 1998).

b. Activités biologiques de l'Hm-lumbricine et de la neuromacine:

Les tests antibactériens réalisés en milieux liquides montrent que la neuromacine possède comme la théromacine une activité dirigée contre les bactéries à Gram positif. (MIC 16.5 nM-33nM; MBC 0.26-0.52μM). Le mode d'action de la neuromacine envers ces bactéries a également été étudié. De manière générale, la plupart des peptides antibactériens cationiques se lient, dans un premier temps, à la membrane phospholipidique chargée négativement des bactéries. Ils altèrent alors l'intégrité de leur membrane et entraîne ainsi leur mort par lyse cellulaire (Shai et al., 2006). Afin de déterminer s'il en était de même pour la neuromacine, des tests de perméabilité membranaire ont été réalisés par l'équipe du Prof. Matthias Leippe sur la bactérie à Gram positif *Bacillus megaterium* en utilisant un agent intercalant de l'ADN fluorescent (le SYTOX green). Les résultats obtenus montrent que le mode d'action de la neuromacine vis à vis des bactéries à Gram positif réside bien en une perméabilisation membranaire qui s'avère d'ailleurs plus efficace à pH=7.4 qu'à un pH plus acide (pH=5.2). L'activité antibactérienne de la neuromacine a notamment été évaluée en conditions acides en raison de la présence de quatre résidus histidines contenus dans sa séquence peptidique. Les peptides antibactériens riches en groupements histidines présentent généralement une activité plus importante à un pH acide. Les résultats obtenus montrent qu'il n'en est pas le cas pour la neuromacine.

De plus, l'action de la neuromacine s'avère moins rapide que celle observée pour la cecropin-P1 et la magainin-II, deux peptides antibactériens cationiques isolés respectivement chez le porc et chez le xénope (Lee et al., 1989 ; Moore et al., 1991). Cette action bactéricide lente qui avait également été mise en évidence avec la théromacine (Tasiemski et al., 2004) refléterait davantage une perméabilisation par désorganisation de la membrane bactérienne plutôt que par la formation de pores, ce qui a été confirmé par l'inactivité de la neuromacine vis-à-vis de lysosomes synthétiques.

Les quantités faibles d'*Hm*-lumbricine native n'ont pas permis la caractérisation complète de son activité antibactérienne. Cependant, l'alignement de l'*Hm*-lumbricine avec la lumbricin-I montre une identité très importante au niveau des extrémités N-terminales de ces molécules. Or, Cho et collaborateurs ont démontré que l'activité de la lumbricin-I était principalement portée par cette région (Cho et al., 2003). Cela suggère que l'*Hm*-lumbricine posséderait une activité comparable à celle de la lumbricin-I dirigée contre les bactéries à Gram positif, à Gram négatif, ainsi qu'envers les champignons. La production d'*Hm*-lumbricine recombinante est actuellement en cours. De futures investigations permettront donc de confirmer les activités antibactériennes présumées de l'*Hm*-lumbricine, mais également de déterminer son mode d'action sur les membranes des micro-organismes comme il a été fait pour la neuromacine.

c. Sites d'expression et de production de l'Hm-lumbricine et de la neuromacine :

L'obtention des ADNc codant la neuromacine et l'*Hm*-lumbricine a permis d'étudier les sites d'expression de ces gènes chez la sangsue *H. medicinalis*. Tout d'abord, une analyse globale par RT-PCR a permis de constater qu'il existait une distribution différentielle des transcrits codant ces peptides antibactériens chez la sangsue. En effet, l'expression du gène codant la neuromacine est strictement restreinte au SNC alors que les messagers codant l'*Hm*-lumbricine sont détectés au niveau du SNC et au niveau périphérique de l'animal.

Des expériences d'HIS, de RT-PCR sur cellules uniques et d'immunocytochimie ont permis de préciser quels étaient les sites d'expression de ces molécules dans le SNC, révélant ainsi que l'*Hm*-lumbricine et la neuromacine étaient synthétisées à la fois par les neurones et par les cellules microgliales.

De précédentes études réalisées chez les vertébrés avaient mis en évidence la présence de peptides antibactériens au niveau du SNC des vertébrés. Hao et collaborateurs ont ainsi montré que la défensine HBD-1 était exprimée constitutivement par les astrocytes et par les cellules microgliales. La HBD-2 a été, quant à elle, uniquement détectée au niveau des astrocytes suite à une stimulation par des LPS (Hao et al., 2001). Chez les invertébrés, une molécule présentant une homologie avec la neuromacine, décrite par les auteurs comme une molécule apparentée à la théromacine, a été récemment identifiée dans les banques d'EST de SNC du mollusque *Aplysia californica* (Moroz et al., 2006). Cependant, à ce jour, aucune étude ne nous permet d'obtenir des informations quant au rôle ou la localisation de ce peptide dans le système nerveux de l'aplysie.

A notre connaissance, nos résultats mettent donc en évidence pour la première fois la production de peptides antibactériens par des neurones chez un invertébré.

d. Rôle de l'*Hm-lumbricine* et de la neuromacine dans les processus anti-infectieux du SNC de la sangsue médicinale :

Le rôle de la neuromacine et de l'*Hm-lumbricine* dans les processus anti-infectieux du SNC de la sangsue a été étudié.

Dans un premier temps, l'analyse du niveau d'expression des gènes codant ces peptides a été évalué par PCR quantitative à partir de chaînes nerveuses axotomisées cultivées pendant 0, 6 et 24 heures en présence ou non d'un mélange de bactéries à Gram positif et à Gram négatif tuées (respectivement *Micrococcus nishiiyamentis* et *Aeromonas hydrophila*). Les résultats obtenus montrent une augmentation importante du niveau d'expression de ces deux gènes dès 6 heures après stimulation bactérienne et qui n'est significativement pas différente de celle observée à 24 heures. En conditions stériles, le niveau d'expression de ces peptides antibactériens n'augmente pas au cours du temps. L'induction de ces molécules n'est donc pas due à l'axotomie des chaînes nerveuses mais bien à la présence de bactéries dans le milieu de culture.

Les variations des taux d'expression de ces deux gènes ont également été explorées en réponse à différentes infections expérimentales. Des analyses par PCR quantitative ont été réalisées à partir de chaînes nerveuses axotomisées cultivées pendant 6 heures et stimulées ou non par différents motifs microbiens. Les résultats obtenus montrent que l'induction de ces gènes est cohérente avec l'activité antibactérienne des molécules. En effet, l'expression de la neuromacine, qui est un peptide anti-Gram positif, augmente uniquement en présence de bactéries à Gram positif alors que le gène codant l'*Hm-lumbricine*, qui est un peptide présumé antifongique, anti-Gram négatif et anti-Gram positif, est induit en présence de bactéries à Gram positif et de zymosan (motifs exprimés à la surface de levures). L'induction de ces deux gènes semble donc être spécifique du type d'infection du système nerveux.

Les résultats précédemment obtenus au laboratoire avec la sangsue *Theromyzon tessulatum*, ne montraient pas de spécificité d'induction du gène codant la théromacine (Tasiemski et al., 2004). La différence de spécificité d'induction observée entre la neuromacine et la théromacine pourrait être expliquée par l'utilisation, au cours de notre étude, de bactéries présentes naturellement dans l'environnement d'*H. medicinalis*, ce qui n'était pas le cas dans le cadre de l'étude menée chez *T. tessulatum*.

Dans un second temps, nous avons également cherché à comprendre de quelle manière la synthèse de ces peptides pouvait intervenir dans la défense immunitaire du SNC de la sangsue suite à une lésion. Pour ce faire, des analyses d'immunohistochimie *in toto* ont été réalisées à partir de chaînes nerveuses auxquelles un connectif interganglionnaire sur les deux existants a été sectionné. Ces chaînes axotomisées ont ensuite été mises en culture en présence ou non de bactéries à Gram positif tuées, connues pour induire à la fois l'expression de la neuromacine et de l'*Hm*-lumbricine. Ces chaînes nerveuses ont été cultivées pendant 6 heures, en accord avec la forte augmentation de l'expression de ces gènes observée par PCR quantitative.

Les résultats obtenus montrent une synthèse importante de la neuromacine et de l'*Hm*-lumbricine au niveau de l'extrémité des connectifs lésés 6 heures après axotomie, en adéquation avec une accumulation de cellules microgliales révélée par un marquage au Hoeschst. Il apparaît également qu'une partie des cellules accumulées produisent intensément ces peptides antibactériens. Ces cellules produiraient et libéreraient ces molécules afin de limiter l'infiltration et la multiplication des bactéries dans le SNC. En outre, les observations indiquent que la production d'*Hm*-lumbricine par les cellules microgliales ne concernerait que les cellules accumulées au site de lésion. La neuromacine est, quant à elle, produite à la fois par les cellules microgliales accumulées dans la zone d'axotomie mais également par les cellules microgliales peuplant les ganglions situés de part et d'autre du connectif lésé.

De précédentes études réalisées chez la sangsue ont montré que même si toutes les cellules microgliales possédaient des capacités migratrices, seules 15 à 40 % d'entre elles migraient vers le site de lésion (Morgese et al. 1983 ; McGlade-McCulloh et al. 1989). Les résultats obtenus suggèrent donc que la synthèse d'*Hm*-lumbricine ne concernerait que les cellules accumulées au site de lésion alors que la production de neuromacine impliquerait la population globale de cellules microgliales.

Les corps cellulaires des neurones regroupés dans les ganglions montrent également un immunomarquage avec les anticorps anti-*Hm*-lumbricine et anti-neuromacine. Cela suggérerait que l'accumulation de ces peptides au site d'axotomie pourrait également être le fruit d'une production neuronale qui aurait transité *via* les prolongements axonaux situés dans les connectifs jusqu'au site de lésion. Afin de confirmer cette hypothèse, un modèle de SNC déplété partiellement en cellules microgliales a été mis au point au laboratoire. Les résultats des immunomarquages ont permis de valider l'hypothèse selon laquelle l'accumulation de ces peptides au site de lésion était également due à une production neuronale.

En conditions stériles, aucun marquage n'est observé 6 heures après axotomie, que ce soit au niveau des cellules microgliales ou des neurones. Ces données vont de pair avec les résultats de PCR quantitative confirmant que la production de ces peptides antibactériens est bien dépendante de la présence de bactéries.

De nombreuses études, principalement menées chez les vertébrés, ont montré que certains peptides antibactériens présentaient des activités biologiques annexes à leurs activités antibactériennes. C'est notamment le cas des peptides PR-39 et LL-37 qui possèdent respectivement un effet chémoattractant vis-à-vis des neutrophiles et des mastocytes (Huang et al., 1997 ; Niyonsaba et al., 2002). La défensine NP-1, quant à elle, favoriserait la croissance et la restauration des nerfs périphériques lésés de rat (Nozdrachev et al., 2006). La réalisation de protéines recombinantes de la neuromacine et de l'*Hm*-lumbricine nous permettra, par la réalisation de tests *in vitro* et *in vivo*, de déterminer si ces peptides pourraient ou non présenter des activités similaires. D'un point de vue anatomique, la chaîne nerveuse de la sangsue baigne dans un sinus rempli de sang. Des études préliminaires ont permis d'indiquer que trois types cellulaires seraient présents dans le sang de la sangsue. De futures investigations permettront peut être de déterminer si une (ou plusieurs) de ces populations cellulaires pourrait avoir un rôle immunitaire. De plus, la réalisation de tests de chimotaxie permettra de déterminer si les peptides antibactériens isolés au niveau de la chaîne nerveuse de la sangsue exerceraient un pouvoir chémoattractant sur ces cellules.

A ce jour, quelques similarités comportementales existaient déjà entre les cellules microgliales de sangsue et de vertébrés. Notre étude révèle l'existence d'une similitude fonctionnelle. En effet, tout comme chez les vertébrés (Hao et al., 2001), les cellules microgliales de sangsue sont capables de produire des peptides antibactériens. Cependant, une question reste encore sans réponse chez la sangsue. Quel(s) récepteur(s) serai(en)t impliqué(s) dans la reconnaissance des microorganismes au niveau du SNC de la sangsue médicinale conduisant à la synthèse des peptides antibactériens ? Chez les vertébrés, de nombreux récepteurs spécialisés, tels que les TLRs, ont été identifiés au sein du SNC. Ces récepteurs sont capables de reconnaître les agents microbiens et d'induire l'expression de nombreuses molécules impliquées dans la réponse immunitaire telles que des cytokines ou des peptides antibactériens (Bsibsi et al., 2002 ; Kielian et al., 2002 et 2005 ; Laflamme et al., 2003 ; Olson et Miller, 2004). Chez la sangsue, un Toll-like récepteurs, l'*Hm*-TLR1, a récemment été identifié au sein du système nerveux par le Dr Aurélie Tasiemski. Celui-ci s'avère être localisé au niveau des neurones et des cellules microgliales. Cependant, des expériences

d'ARN interférence du gène *Hm-TLR1*, réalisées par le Dr Virginie Cuvillier-Hot, ont démontré que l'expression de la neuromacine et de l'*Hm-lumbricine* ne dépendait pas de l'activation du récepteur *Hm-TLR1*. Néanmoins, l'analyse des banques d'EST de système nerveux de la sangsue montre que d'autres PRRs seraient potentiellement présents au niveau du système nerveux de l'animal. La caractérisation future de ces molécules est envisagée afin de déterminer si une ou plusieurs d'entre elles seraient impliquée(s) dans la voie de synthèse de ces peptides antibactériens.

2) La cytokine proinflammatoire *Hm-EMAP II* dans le SNC d'*H. medicinalis* :

Chez les vertébrés, une lésion du SNC entraîne l'activation des cellules microgliales. Ces cellules, après avoir migré, s'accumulent au niveau du site d'axotomie où elles produisent un grand nombre de molécules impliquées dans la réponse immunitaire, notamment des chimiokines. Chez la sangsue, l'existence d'une population de cellules microgliales présentant, lors d'une lésion de la chaîne nerveuse, un comportement migratoire similaire à celui observé chez les vertébrés, nous a conduit à envisager la possible participation de molécules de type chimiokine dans ce processus.

Au cours de cette étude, nous avons donc recherché, dans les banques d'EST de système nerveux de sangsue, l'existence de molécules présentant des homologues avec des molécules de type cytokine connues pour être produites par les cellules microgliales de vertébrés lors de la réponse immunitaire innée de leur SNC.

Notre attention a été retenue par la présence d'une molécule homologue à la cytokine proinflammatoire EMAP II de vertébrés. Cette protéine, issue du clivage d'un précurseur, la protéine P43, est décrite chez les vertébrés comme un acteur important de la réponse immunitaire innée (van Horssen, 2006). Cependant, mise à part le fait que cette cytokine soit synthétisée principalement par les cellules microgliales activées, le rôle de cette protéine dans la réaction immunitaire du SNC des vertébrés reste flou.

Nous avons donc entrepris la caractérisation complète de cette cytokine ainsi que l'étude de son rôle au cours de la réponse neuroimmunitaire de notre modèle.

a. Caractérisation moléculaire :

L'analyse des banques d'EST de système nerveux de sangsue a permis d'obtenir l'ADNc complet codant la protéine P43 de sangsue, nommée *Hm-P43*. Ce précurseur présente 44% d'identité avec la protéine P43 humaine. De manière intéressante, une conservation plus importante de l'ordre de 58% d'identité est observable dans la région C-terminale de p43, extrémité correspondant au domaine EMAP II. Cette homologie non négligeable, montrant qu'EMAP II serait conservé au cours de l'évolution, nous a conduit à utiliser un anticorps anti-EMAP II humain pour des études morpho-fonctionnelles du rôle d'*Hm-P43*/EMAP II dans le SNC de la sangsue.

Dans un premier temps, nous avons vérifié par une approche en western blot que la protéine EMAP II était clivée à partir de son précurseur p43 dans le SNC de sangsue comme il en est le cas chez les vertébrés (Kao et al., 1994 ; Journeay et al., 2007) (Figure 13). La détection de deux bandes de taille en accord avec les masses prédites à partir de la séquence déduite de l'ADNc (~18 et ~35 kDa) a confirmé cette hypothèse.

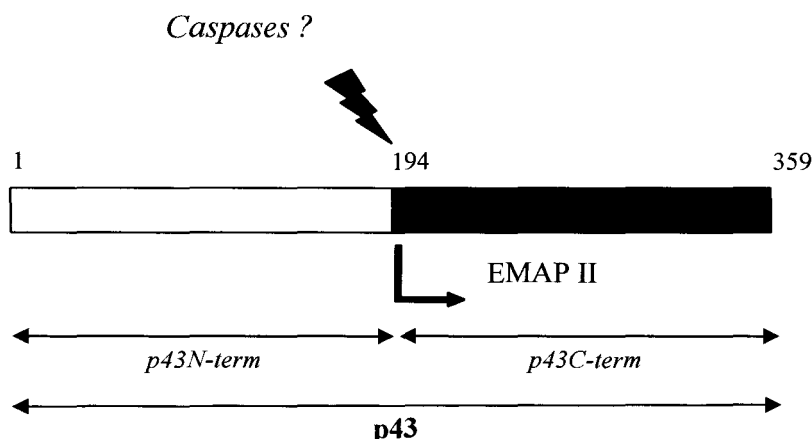


Figure 13: Maturation du complexe P43/EMAP II chez les vertébrés. La protéine P43 (35kDA) est localisée au niveau dans le domaine cytoplasmique. P43 va être clivée au niveau de son résidu aspartyl 194 pour libérer EMAP II (18kDA) situé à son extrémité C-terminale. La forme clivée d'EMAP II sera alors sécrétée dans le domaine extracellulaire par un mécanisme encore inconnu (Kao et al., 1994).

Les mécanismes moléculaires permettant le clivage et la libération d'EMAP II dans le domaine extracellulaire chez les vertébrés sont sujets à de nombreuses controverses. Chez les vertébrés, le fait que la protéine EMAP II soit libérée par des cellules en apoptose a amené certains auteurs à présumer le rôle de certaines caspases, et notamment des caspases 7 ou 3, dans le clivage de la protéine P43 (Shalak et al., 2001 ; Behrendsdorf et al., 2000). Cependant, d'autres études prétendent que ces enzymes ne seraient pas impliquées dans la libération d'EMAP II (Zhang et Schwarz 2002). Une molécule homologue à la caspase 7 humaine a été identifiée dans les banques d'EST de système nerveux de la sangsue. Le clonage de cette molécule est actuellement en cours au laboratoire. Des expériences d'HIS en FISH ont révélé la présence des transcrits codant p43 et *Hm-caspase7* dans les mêmes types cellulaires. Afin de confirmer si cette enzyme participerait au clivage d'*Hm-P43* pour libérer *Hm-EMAP II*, des expériences d'enzymologie seront effectuées à partir de protéines recombinantes d'*Hm-P43* et d'*Hm-caspase7*.

b. Site d'expression et de production d'Hm-EMAP II :

Des expériences d'immunocytochimie et d'HIS ont permis de montrer que, comme chez les vertébrés (Murray et al., 2000 ; Mueller et al., 2003), les neurones et les cellules microgliales de sangsue étaient capables d'exprimer le gène *Hm-P43* mais également de synthétiser *Hm-p43/EMAP II*. Des expériences d'HIS ont également été réalisées à partir de chaînes nerveuses axotomisées cultivées en conditions stériles pendant 24 heures. Dans ces conditions, une accumulation du transcrit d'*Hm-P43* est observable au niveau des cellules microgliales accumulées au site d'axotomie. L'expression du gène *Hm-P43* ne s'avère pas augmenter au niveau des neurones ganglionnaires.

De nombreuses molécules appartenant à la famille des cytokines et présentant des homologies avec les cytokines de vertébrés ont été identifiées chez les invertébrés. Certaines d'entre elles ont été mises en évidence au niveau de leur SNC. Cependant, le rôle que pourraient avoir ces différentes molécules au cours de la réponse immunitaire du SNC de ces différents invertébrés reste encore indéterminé.

Notre étude a permis de mettre en évidence l'existence de la première cytokine proinflammatoire présente au niveau du système nerveux de la sangsue médicinale *H. medicinalis*. Par ailleurs, il s'agit de la première protéine homologue à la cytokine EMAP II de vertébrés identifiée au niveau du SNC d'un invertébré. D'autres molécules homologues de la protéine P43 de vertébrés avaient préalablement été clonées chez d'autres invertébrés, tel

que l'éponge *G. cydonium* (Pahler et al., 1998) ou le nématode *C. elegans* (Wilson et al., 1994). Cependant, lors de ces études, la localisation des sites d'expression et de production de cette molécule n'a pas été étudiée.

c. Expression du gène Hm-P43 dans les processus de régénération ainsi que dans les processus anti-infectieux du SNC de la sangsue médicinale :

Chez les vertébrés, la cytokine EMAP II est induite lors d'une lésion ou lors d'une infection du SNC. Nous avons voulu savoir s'il en était de même pour la molécule *Hm*-EMAP II chez la sangsue.

Dans un premier temps, nous avons étudié le niveau d'expression du gène d'*Hm*-P43 au cours des processus de régénération du SNC de la sangsue. Des analyses par PCR quantitative ont été réalisées à partir de chaînes nerveuses axotomisées et cultivées en conditions stériles pendant 0h, 6h, 24h, 3, 5 et 8 jours. Les résultats obtenus montrent une importante augmentation de l'expression du gène *Hm*-P43 24 heures après axotomie de la chaîne nerveuse. Ce niveau d'expression reste constant durant les 7 jours suivants. En conditions stériles, l'expression d'*Hm*-P43 paraît donc inductible 24h après axotomie.

Dans un second temps, nous avons étudié le niveau d'expression du gène *Hm*-P43/EMAP II dans un modèle d'infection expérimentale du SNC axotomisé. Pour cela, des analyses par PCR quantitative ont été réalisées à partir de chaînes nerveuses axotomisées cultivées pendant 6 heures en présence ou non de différents motifs microbiens. Ce temps d'incubation a été choisi dans le but de différencier la part d'induction de ce gène engendrée par la lésion (qui se met en place au bout de 24h) de celle engendrée par la présence des motifs microbiens. Les résultats indiquent que le gène *Hm*-P43 est induit en présence de bactéries à Gram positif ou à Gram négatif, alors qu'il ne l'est pas en présence de zymosan (motif présent à la surface des levures), de mannane (champignons), ou de polyI:C (virus).

L'ensemble de ces résultats indique donc que l'induction du gène *Hm*-P43/EMAP II serait impliqué à la fois dans les processus de régénération de la chaîne nerveuse mais également dans la réponse immunitaire mise en place suite à la présence de bactéries à Gram positif ou à Gram négatif.

d. Rôle de la cytokine Hm-EMAP II dans le SNC de la sangsue médicinale :

Nous avons également cherché à déterminer le rôle joué par la cytokine *Hm-EMAP II* dans le SNC de sangsue. Des expériences d'immunohistochimie *in toto* ont été réalisées à partir de chaînes nerveuses auxquelles l'un des deux connectifs interganglionnaire a été soit sectionné soit pincé. Ces chaînes ont été cultivées pendant 6 heures en présence ou non de bactéries à Gram positif tuées (*M. nishiiyamentis*). Les immunomarquages obtenus révèlent une synthèse importante d'*Hm-EMAP II* et/ou de son précurseur *Hm-P43* au niveau des extrémités des connectifs lésés en présence des bactéries. Cette production s'avère être en adéquation avec l'accumulation des cellules microgliales observée au niveau du site de lésion. Ce résultat est corrélé par les expériences d'HIS qui ont montré une accumulation du transcrit d'*Hm-P43* dans les cellules microgliales accumulées au site d'axotomie. Chez les vertébrés, les cellules microgliales activées accumulées au site de lésion du SNC produisent EMAP II et/ou son précurseur (Mueller et al., 2003 ; Brabeck et al., 2002 ; Schluesener et al., 1997 ; Guo et Schluesener, 2005). Les données obtenues indiquent un phénomène similaire chez la sangsue.

Des expériences d'immunohistochimie *in toto* à partir de chaînes nerveuses déplétées en cellules microgliales seront réalisées afin de déterminer si l'accumulation d'*Hm-P43* et/ou d'*Hm-EMAP II* au niveau du site d'axotomie pourrait également impliquer une production neuronale comme nous l'avons précédemment établi pour les peptides antibactériens. Cette hypothèse s'appuie sur le fait que les analyses immunocytochimiques et d'HIS montrent une production *Hm-P43* et/ou *Hm-EMAP II* par les neurones de sangsue.

Même si la présence d'*Hm-EMAP II* dans le système nerveux de la sangsue a été démontrée par western blot, les données immunohistochimiques ne permettent pas de faire la distinction entre une détection d'EMAP II et une détection de son précurseur p43, les deux molécules étant en effet reconnues par le même anticorps. Le même cas de figure se pose pour les immuno-détections réalisées à partir de coupes de SNC de vertébrés. Les activités biologiques d'EMAP II et de p43 étant pour la plupart communes, la détection de l'une ou l'autre des deux formes ne semblent pas être une prérogative (van Horssen, 2006). Il se pose le problème du champ d'action. On peut ainsi imaginer que la forme clivée qui est donc une molécule « libre », contrairement à la forme membranaire p43, diffuserait plus facilement et par conséquent aurait un rayon d'action plus étendu. Chez notre modèle, des expériences de transfection dans les neurones de sangsue, d'un plasmide *Hm-P43* couplé à son extrémité C-terminale à un gène rapporteur fluorescent (EGF-P) et à son extrémité N-terminale à un

épitope connu, seront réalisées afin de mieux comprendre les processus de clivage d'*Hm*-p43 *in situ*.

e. Rôle biologique d'Hm-EMAP II dans le SNC de la sangsue :

Chez les vertébrés, les données bibliographiques indiquent que la cytokine EMAP II présente des activités chémoattractantes vis-à-vis des cellules macrophagiques périphériques (van Horssen, 2006). Sachant que les cellules microgliales sont considérées comme les macrophages résidents du SNC, nous nous sommes interrogés quant à la capacité de cette molécule à recruter ces cellules. En effet, à notre connaissance, aucune étude n'a à ce jour montré un effet chimioattractant d'EMAP II vis-à-vis de ce type cellulaire.

Des tests de chimotaxie ont donc été réalisés en conditions hétérologues à partir de cellules microgliales isolées de sangsue et de la molécule recombinante *h*EMAP II humaine (*h*EMAP II). Les résultats obtenus montrent qu'*h*EMAP II présente un effet chémoattractant vis-à-vis des cellules microgliales et ce d'une manière dose dépendante avec un effet maximal pour une concentration de 100 ng/ml. Cependant, il apparaît que certaines études réalisées chez les vertébrés ont montré un effet chimioattractant d'*h*EMAP II sur les macrophages périphériques pour une concentration près de 10 fois plus faible que celle observée lors de notre test (Park, 2002; Kao, 1992). Cette différence pourrait en partie s'expliquer par les conditions hétérologues utilisées lors de notre test. En effet, bien que les résultats obtenus suggèrent l'existence de récepteurs communs entre l'homme et la sangsue, l'affinité de ces récepteurs envers la molécule *h*EMAP II pourrait toutefois être différente.

La production *Hm*-EMAP II recombinante étant prévue, des tests de chimotaxie seront réalisés afin de déterminer la dose à laquelle *Hm*-EMAP II exerce un pouvoir chimioattractant sur les cellules microgliales de sangsue. Le pouvoir chimioattractant d'*Hm*-EMAP II sera également testé vis-à-vis des différents types cellulaires présents dans le sang de la sangsue. De la même manière, le recombinant EMAP II de vertébrés sera testé pour son activité chimioattractante vis à vis des cellules microgliales de vertébrés.

Notre étude a permis de mettre en évidence la première cytokine proinflammatoire de type chimiokine présente dans le SNC de la sangsue médicinale *Hirudo medicinalis*. L'ensemble des résultats obtenus suggère donc que la protéine *Hm*-EMAP II et/ou son précurseur serai(en)t impliqué(s) dans la réponse immunitaire du SNC. En effet, lors d'une lésion ou d'une infection du système nerveux, une synthèse accrue d'*Hm*-EMAP II au niveau des connectifs lésés pourrait participer au phénomène de recrutement et d'accumulation des

cellules microgliales. Cependant, le recrutement des cellules microgliales au site de lésion ne serait pas uniquement dû à la production de cette chimiokine. D'autres messagers chimiques sont également impliqués. De précédentes études réalisées chez la sangsue ont montré que la production de NO libéré au niveau de la lésion de la chaîne nerveuse pouvait favoriser le recrutement des cellules microgliales (Chen et al., 2000).

CONCLUSION

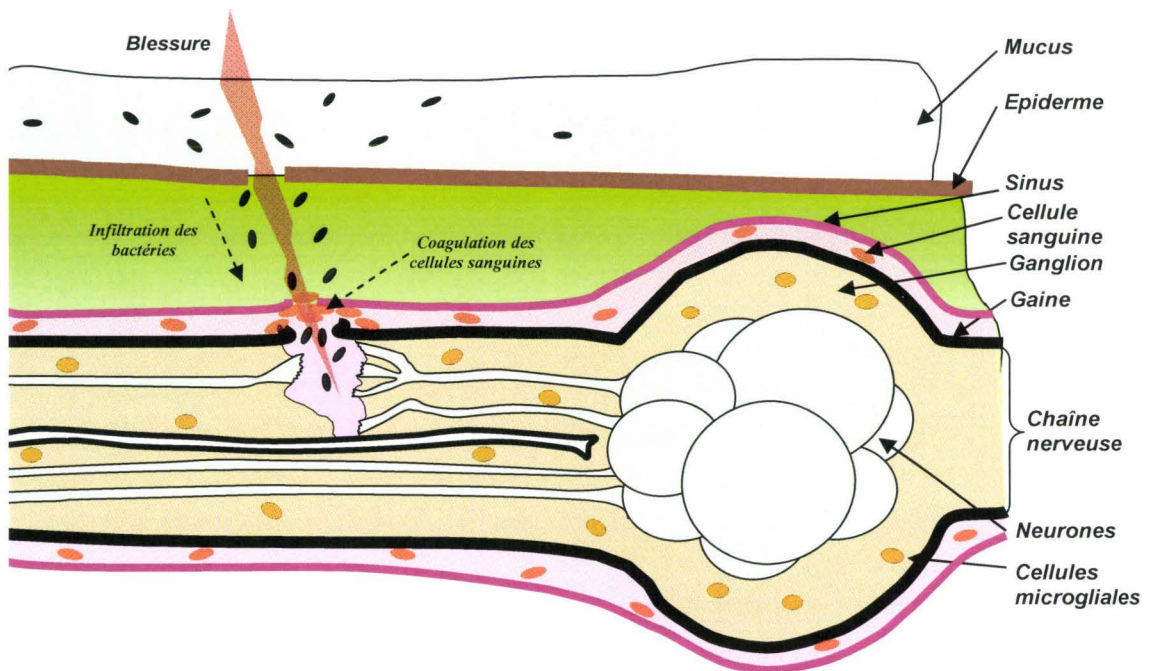
Conclusion

L'ensemble de ce travail a permis de mieux comprendre les mécanismes immunitaires innés mis en place au sein du SNC de la sangsue médicinale *Hirudo medicinalis*.

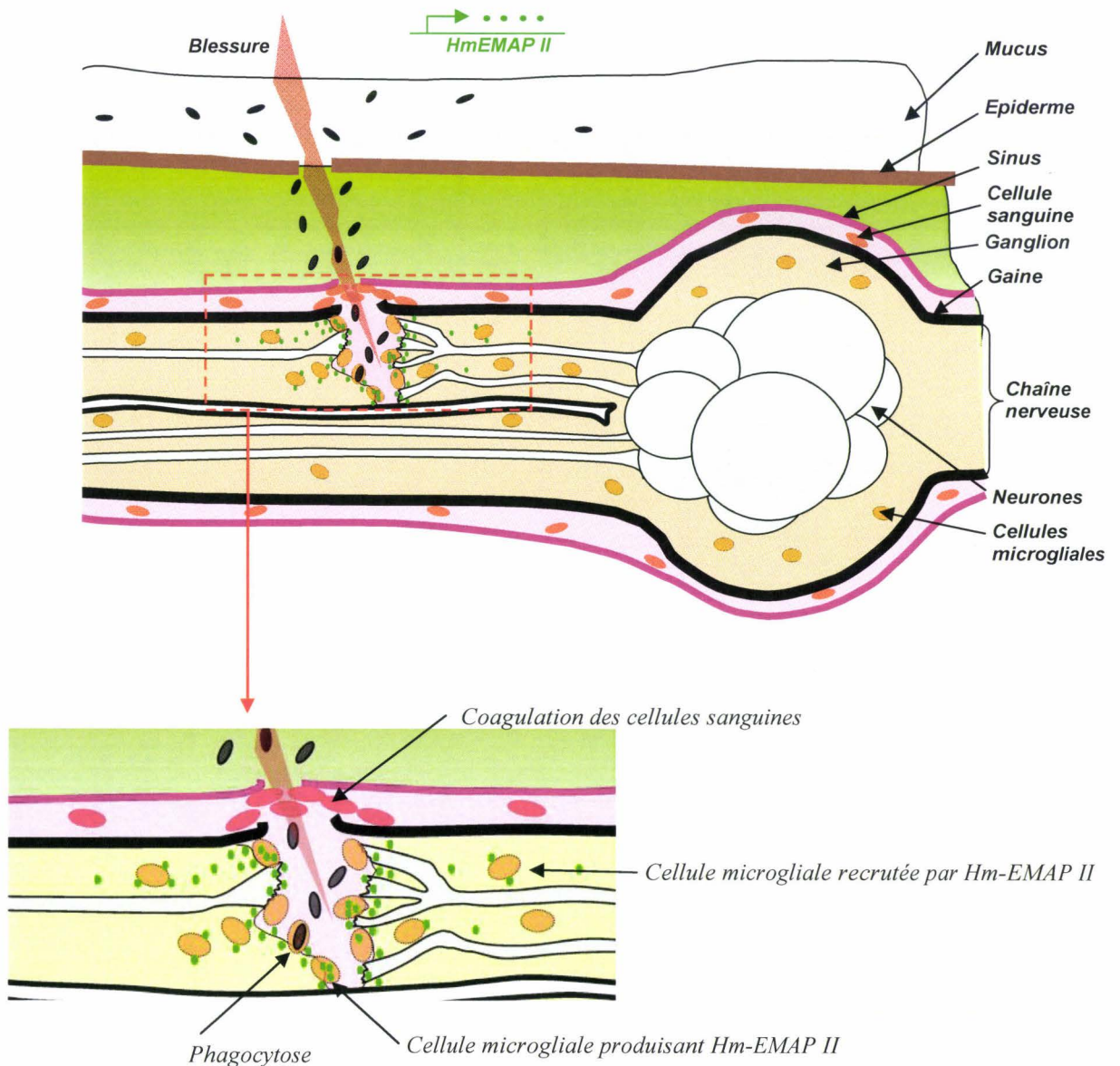
Les données obtenues ont démontré le rôle des deux peptides antibactériens, la neuromacine et l'*Hm*-lumbricine, ainsi que de la cytokine proinflammatoire *Hm*-EMAP II dans la réponse immunitaire du SNC de cet invertébré.

Un modèle d'interprétation résumant les principales étapes de l'action de ces molécules est schématisé ci-dessous:

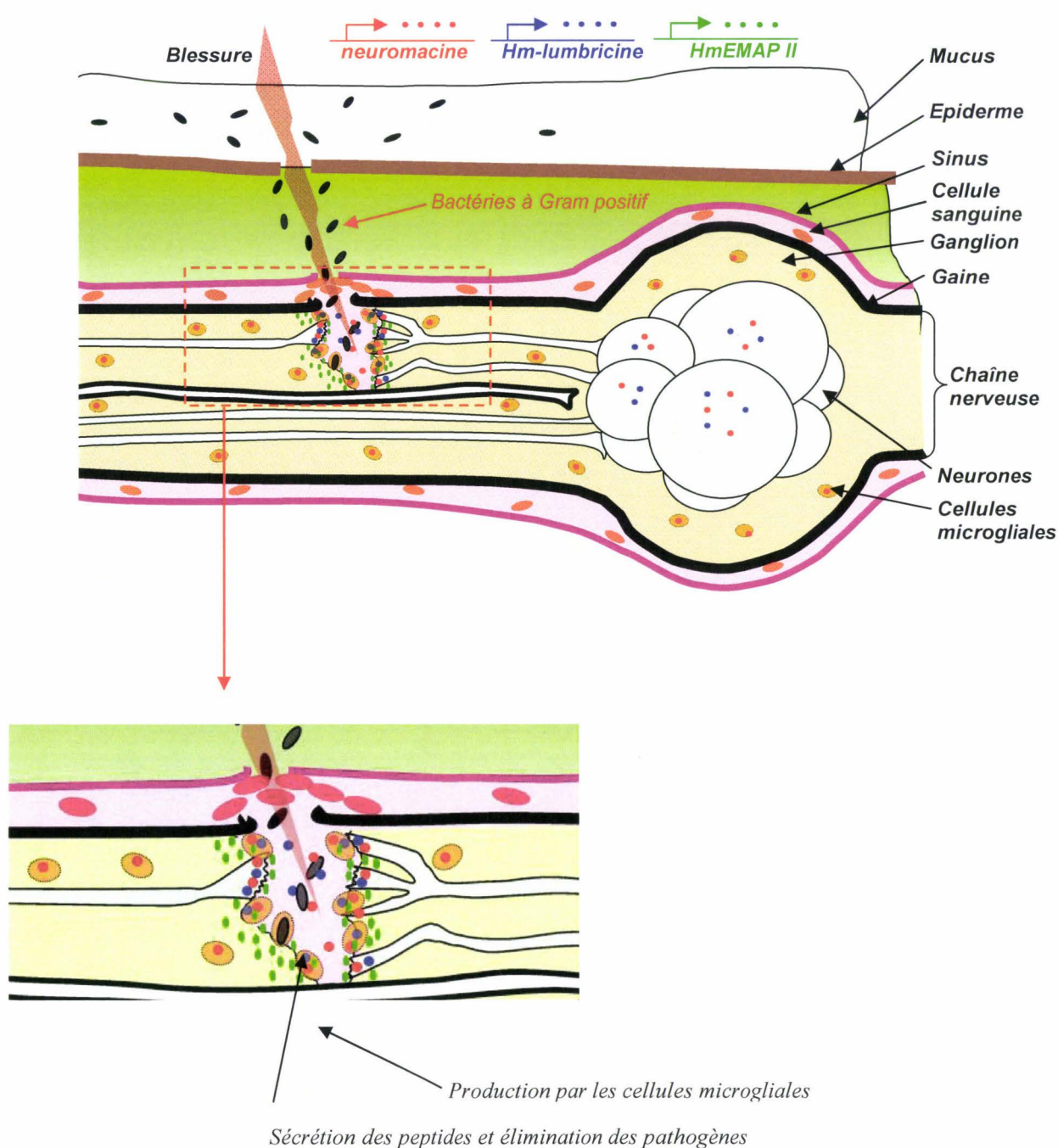
- 1- La chaîne nerveuse de l'animal peut être endommagée suite à une blessure profonde. Les bactéries peuvent alors s'infiltrer jusqu'au site de lésion de la chaîne nerveuse de la sangsue. Une production importante de mucus par les cellules épithéliales limiterait l'entrée des microorganismes en les piégeant. Dans le même temps, le sang dans lequel baigne la chaîne, par son important pouvoir coagulant, colmaterait le site de blessure.



- 2- Les cellules microgliales, situées le long du connectif lésé, migreraient et s'accumuleraient au niveau du site de lésion. L'accumulation de ces cellules serait en partie due à la libération de monoxyde d'azote et d'*Hm*-EMAP II au niveau du site d'axotomie. Une partie des cellules microgliales accumulées au site de lésion produirait à leur tour *Hm*-EMAP II mais aussi deux peptides antimicrobiens : la neuromacine et l'*Hm*-lumbricine.



3- La réponse antimicrobienne serait spécifique de l'agent microbien introduit. Dans le cas d'une infection par des bactéries à Gram positif, les deux peptides antibactériens seraient synthétisés puis sécrétés par les cellules microgliales accumulées au niveau de la lésion de la chaîne nerveuse. L'accumulation de ces deux molécules sera également due à une production neuronale. La neuromacine et l'*Hm*-lumbricine seraient impliquées dans la défense immunitaire du SNC de la sangsue médicinale de par leur rôle dans l'élimination ces bactéries.



De nombreuses questions concernant l'ensemble de ces résultats restent cependant encore en suspens :

- De quelle manière les cellules microgliales et les neurones parviennent-ils à « détecter » la présence des microorganismes ?
- La synthèse de la cytokine proinflammatoire et/ou de ces peptides antimicrobiens passe-t-elle par l'activation de récepteurs de type TLR chez *Hirudo medicinalis* ?
- La neuromacine et/ou l'*Hm*-lumbricine exercent-elles d'autres fonctions que leur activité antibactérienne comme cela est observé pour de nombreux peptides antibactériens de vertébrés ?

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Références Bibliographiques

- Abbott D. W., Wilkins A., Asara J. M. and Cantley L. C. (2004) The Crohn's disease protein, NOD2, requires RIP2 in order to induce ubiquitylation of a novel site on NEMO. *Curr Biol* **14**, 2217-27.
- Abbott N. J. (2002) Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat* **200**, 629-38.
- Abbruscato T. J. a. D., T.P. (1999) Protein expression of brain endothelial cell E-cadherin after hypoxia/aglycemia: influence of astrocyte contact. *Brain Res* **842**, 277-286.
- Abrams J. M., Lux A., Steller H. and Krieger M. (1992) Macrophages in Drosophila embryos and L2 cells exhibit scavenger receptor-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10375-9.
- Acarin L., Vela J. M., Gonzalez B. and Castellano B. (1994) Demonstration of poly-N-acetyl lactosamine residues in ameboid and ramified microglial cells in rat brain by tomato lectin binding. *J Histochem Cytochem* **42**, 1033-41.
- Adachi O., Kawai T., Takeda K., Matsumoto M., Tsutsui H., Sakagami M., Nakanishi K. and Akira S. (1998) Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* **9**, 143-50.
- Adoutte A., Balavoine G., Lartillot N., Lespinet O., Prud'homme B. and de Rosa R. (2000) The new animal phylogeny: reliability and implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4453-6.
- Akira S. and Hemmi H. (2003) Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett* **85**, 85-95.
- Akira S., Takeda K. and Kaisho T. (2001) Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* **2**, 675-80.
- Akira S., Uematsu S. and Takeuchi O. (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783-801.
- Alarcon R., Fuenzalida C., Santibanez M. and von Bernhardi R. (2005) Expression of scavenger receptors in glial cells. Comparing the adhesion of astrocytes and microglia from neonatal rats to surface-bound beta-amyloid. *J Biol Chem* **280**, 30406-15.
- Albright A. V., Shieh J. T., Itoh T., Lee B., Pleasure D., O'Connor M. J., Doms R. W. and Gonzalez-Scarano F. (1999) Microglia express CCR5, CXCR4, and CCR3, but of these, CCR5 is the principal coreceptor for human immunodeficiency virus type 1 dementia isolates. *J Virol* **73**, 205-13.

- Alexopoulou L., Holt A. C., Medzhitov R. and Flavell R. A. (2001) Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**, 732-8.
- Alexopoulou L., Thomas V., Schnare M., Lobet Y., Anguita J., Schoen R. T., Medzhitov R., Fikrig E. and Flavell R. A. (2002) Hyporesponsiveness to vaccination with *Borrelia burgdorferi* OspA in humans and in TLR1- and TLR2-deficient mice. *Nat Med* **8**, 878-84.
- Aley S. B., Zimmerman M., Hetsko M., Selsted M. E. and Gillin F. D. (1994) Killing of *Giardia lamblia* by cryptidins and cationic neutrophil peptides. *Infect Immun* **62**, 5397-403.
- Aloisi F. (2001) Immune function of microglia. *Glia* **36**, 165-79.
- Aloisi F., Penna G., Cerase J., Menendez Iglesias B. and Adorini L. (1997) IL-12 production by central nervous system microglia is inhibited by astrocytes. *J Immunol* **159**, 1604-12.
- Alon R. (2001) Encephalitogenic lymphoblast recruitment to resting CNS microvasculature: a natural immunosurveillance mechanism? *J Clin Invest* **108**, 517-9.
- Ambrosini E. and Aloisi F. (2004) Chemokines and glial cells: a complex network in the central nervous system. *Neurochem Res* **29**, 1017-38.
- Anderson K. V. (2000) Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol* **12**, 13-9.
- Angelov D. N., Walther M., Streppel M., Guntinas-Lichius O. and Neiss W. F. (1998) The cerebral perivascular cells. *Adv Anat Embryol Cell Biol* **147**, 1-87.
- Ariizumi K., Shen G. L., Shikano S., Xu S., Ritter R., 3rd, Kumamoto T., Edelbaum D., Morita A., Bergstresser P. R. and Takashima A. (2000) Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. *J Biol Chem* **275**, 20157-67.
- Austyn J. M. and Gordon S. (1981) F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur J Immunol* **11**, 805-15.
- Bacon K. B. and Harrison J. K. (2000) Chemokines and their receptors in neurobiology: perspectives in physiology and homeostasis. *J Neuroimmunol* **104**, 92-7.
- Badie B., Schartner J., Vorpahl J. and Preston K. (2000) Interferon-gamma induces apoptosis and augments the expression of Fas and Fas ligand by microglia in vitro. *Exp Neurol* **162**, 290-6.

- Banks W. A., Kastin A. J. and Gutierrez E. G. (1993) Interleukin-1 alpha in blood has direct access to cortical brain cells. *Neurosci Lett* **163**, 41-4.
- Barnum S. R. (2002) Complement in central nervous system inflammation. *Immunol Res* **26**, 7-13.
- Barton G. M. and Medzhitov R. (2003) Toll-like receptor signaling pathways. *Science* **300**, 1524-5.
- Battersby S., Boddy S. C., Critchley H. O. and Jabbour H. N. (2002) Expression and localization of endothelial monocyte-activating polypeptide II in the human endometrium across the menstrual cycle: regulation of expression by prostaglandin E(2). *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 3928-35.
- Becher B., Fedorowicz V. and Antel J. P. (1996) Regulation of CD14 expression on human adult central nervous system-derived microglia. *J Neurosci Res* **45**, 375-81.
- Bechmann I., Galea I. and Perry V. H. (2007) What is the blood-brain barrier (not)? *Trends Immunol* **28**, 5-11.
- Bechmann I., Mor G., Nilsen J., Eliza M., Nitsch R. and Naftolin F. (1999) FasL (CD95L, Apo1L) is expressed in the normal rat and human brain: evidence for the existence of an immunological brain barrier. *Glia* **27**, 62-74.
- Begolka W. S., Vanderlugt C. L., Rahbe S. M. and Miller S. D. (1998) Differential expression of inflammatory cytokines parallels progression of central nervous system pathology in two clinically distinct models of multiple sclerosis. *J Immunol* **161**, 4437-46.
- Bell M. D., Lopez-Gonzalez R., Lawson L., Hughes D., Fraser I., Gordon S. and Perry V. H. (1994) Upregulation of the macrophage scavenger receptor in response to different forms of injury in the CNS. *J Neurocytol* **23**, 605-13.
- Berger A. C., Alexander H. R., Wu P. C., Tang G., Gnant M. F., Mixon A., Turner E. S. and Libutti S. K. (2000) Tumour necrosis factor receptor I (p55) is upregulated on endothelial cells by exposure to the tumour-derived cytokine endothelial monocyte-activating polypeptide II (EMAP-II). *Cytokine* **12**, 992-1000.
- Bergman P., Termen S., Johansson L., Nystrom L., Arenas E., Jonsson A. B., Hokfelt T., Gudmundsson G. H. and Agerberth B. (2005) The antimicrobial peptide rCRAMP is present in the central nervous system of the rat. *J Neurochem* **93**, 1132-40.
- Bertin J., Nir W. J., Fischer C. M., Tayber O. V., Errada P. R., Grant J. R., Keilty J. J., Gosselin M. L., Robison K. E., Wong G. H., Glucksmann M. A. and DiStefano P. S. (1999) Human CARD4 protein is a novel CED-4/Apaf-1 cell death family member that activates NF-kappaB. *J Biol Chem* **274**, 12955-8.
- Blais V. and Rivest S. (2003) [Role of the innate immune response in the brain]. *Med Sci (Paris)* **19**, 981-7.

- Blasko I., Stampfer-Kountchev M., Robatscher P., Veerhuis R., Eikelenboom P. and Grubeck-Loebenstien B. (2004) How chronic inflammation can affect the brain and support the development of Alzheimer's disease in old age: the role of microglia and astrocytes. *Aging Cell* **3**, 169-76.
- Bogdan C., Rollinghoff M. and Diefenbach A. (2000) The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev* **173**, 17-26.
- Boman H. G. (1995) Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immunol* **13**, 61-92.
- Borutaite V., Budriunaite A. and Brown G. C. (2000) Reversal of nitric oxide-, peroxynitrite- and S-nitrosothiol-induced inhibition of mitochondrial respiration or complex I activity by light and thiols. *Biochim Biophys Acta* **1459**, 405-12.
- Boulay F., Naik N., Giannini E., Tardif M. and Bouchon L. (1997) Phagocyte chemoattractant receptors. *Ann N Y Acad Sci* **832**, 69-84.
- Bowman C. C., Rasley A., Tranguch S. L. and Marriott I. (2003) Cultured astrocytes express toll-like receptors for bacterial products. *Glia* **43**, 281-91.
- Brabeck C., Michetti F., Geloso M. C., Corvino V., Goezalan F., Meyermann R. and Schluesener H. J. (2002) Expression of EMAP-II by activated monocytes/microglial cells in different regions of the rat hippocampus after trimethyltin-induced brain damage. *Exp Neurol* **177**, 341-6.
- Brightbill H. D., Libraty D. H., Krutzik S. R., Yang R. B., Belisle J. T., Bleharski J. R., Maitland M., Norgard M. V., Plevy S. E., Smale S. T., Brennan P. J., Bloom B. R., Godowski P. J. and Modlin R. L. (1999) Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* **285**, 732-6.
- Brown G. C. and Bal-Price A. (2003) Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide, glutamate, and mitochondria. *Mol Neurobiol* **27**, 325-55.
- Brown G. D. (2006) Macrophage receptors and innate immunity: insights from dectin-1. *Novartis Found Symp* **279**, 114-23; discussion 123-6, 216-9.
- Brown G. D., Herre J., Williams D. L., Willment J. A., Marshall A. S. and Gordon S. (2003) Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med* **197**, 1119-24.
- Brown G. D., Taylor P. R., Reid D. M., Willment J. A., Williams D. L., Martinez-Pomares L., Wong S. Y. and Gordon S. (2002) Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. *J Exp Med* **196**, 407-12.
- Bsibsi M., Persoon-Deen C., Verwer R. W., Meeuwssen S., Ravid R. and Van Noort J. M. (2006) Toll-like receptor 3 on adult human astrocytes triggers production of neuroprotective mediators. *Glia* **53**, 688-95.

- Bsibsi M., Ravid R., Gveric D. and van Noort J. M. (2002) Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* **61**, 1013-21.
- Bulut Y., Faure E., Thomas L., Equils O. and Arditi M. (2001) Cooperation of Toll-like receptor 2 and 6 for cellular activation by soluble tuberculosis factor and *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A lipoprotein: role of Toll-interacting protein and IL-1 receptor signaling molecules in Toll-like receptor 2 signaling. *J Immunol* **167**, 987-94.
- Burudi E. M., Riese S., Stahl P. D. and Regnier-Vigouroux A. (1999) Identification and functional characterization of the mannose receptor in astrocytes. *Glia* **25**, 44-55.
- Buster B. L., Weintrob A. C., Townsend G. C. and Scheld W. M. (1995) Potential role of nitric oxide in the pathophysiology of experimental bacterial meningitis in rats. *Infect Immun* **63**, 3835-9.
- Buwitt-Beckmann U., Heine H., Wiesmuller K. H., Jung G., Brock R., Akira S. and Ulmer A. J. (2005) Toll-like receptor 6-independent signaling by diacylated lipopeptides. *Eur J Immunol* **35**, 282-9.
- Cabanas C. and Sanchez-Madrid F. (1999) CD11b (leukocyte integrin CR3 alpha subunit). *J Biol Regul Homeost Agents* **13**, 130-3.
- Calvano S. E., Thompson W. A., Marra M. N., Coyle S. M., de Riesthal H. F., Trousdale R. K., Barie P. S., Scott R. W., Moldawer L. L. and Lowry S. F. (1994) Changes in polymorphonuclear leukocyte surface and plasma bactericidal/permeability-increasing protein and plasma lipopolysaccharide binding protein during endotoxemia or sepsis. *Arch Surg* **129**, 220-6.
- Cantera R., Roos E. and Engstrom Y. (1999) Dif and cactus are colocalized in the larval nervous system of *Drosophila melanogaster*. *J Neurobiol* **38**, 16-26.
- Carpentier P. A., Begolka W. S., Olson J. K., Elhofy A., Karpus W. J. and Miller S. D. (2005) Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli. *Glia* **49**, 360-74.
- Castellano B., Gonzalez B., Dalmau I. and Vela J. M. (1991) Identification and distribution of microglial cells in the cerebral cortex of the lizard: a histochemical study. *J Comp Neurol* **311**, 434-44.
- Chakravarty S. and Herkenham M. (2005) Toll-like receptor 4 on nonhematopoietic cells sustains CNS inflammation during endotoxemia, independent of systemic cytokines. *J Neurosci* **25**, 1788-96.
- Chaly Y. V., Paleolog E. M., Kolesnikova T. S., Tikhonov, II, Petratchenko E. V. and Voitenok N. N. (2000) Neutrophil alpha-defensin human neutrophil peptide modulates

cytokine production in human monocytes and adhesion molecule expression in endothelial cells. *Eur Cytokine Netw* **11**, 257-66.

Chamaillard M., Girardin S. E., Viala J. and Philpott D. J. (2003) Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation. *Cell Microbiol* **5**, 581-92.

Chang J. Y. and Liu L. Z. (1999) Manganese potentiates nitric oxide production by microglia. *Brain Res Mol Brain Res* **68**, 22-8.

Chang R. C., Hudson P., Wilson B., Haddon L. and Hong J. S. (2000) Influence of neurons on lipopolysaccharide-stimulated production of nitric oxide and tumor necrosis factor- α by cultured glia. *Brain Res* **853**, 236-44.

Chang S. Y., Ko H. J., Heo T. H. and Kang C. Y. (2005) Heparan sulfate regulates the antiangiogenic activity of endothelial monocyte-activating polypeptide-II at acidic pH. *Mol Pharmacol* **67**, 1534-43.

Chang S. Y., Park S. G., Kim S. and Kang C. Y. (2002) Interaction of the C-terminal domain of p43 and the α subunit of ATP synthase. Its functional implication in endothelial cell proliferation. *J Biol Chem* **277**, 8388-94.

Chen A., Kumar S. M., Sahley C. L. and Muller K. J. (2000) Nitric oxide influences injury-induced microglial migration and accumulation in the leech CNS. *J Neurosci* **20**, 1036-43.

Chen K., Huang J., Gong W., Iribarren P., Dunlop N. M. and Wang J. M. (2007a) Toll-like receptors in inflammation, infection and cancer. *Int Immunopharmacol* **7**, 1271-85.

Chen Q., Wade D., Kurosaka K., Wang Z. Y., Oppenheim J. J. and Yang D. (2004) Temporin A and related frog antimicrobial peptides use formyl peptide receptor-like 1 as a receptor to chemoattract phagocytes. *J Immunol* **173**, 2652-9.

Chen R., Alvero A. B., Silasi D. A. and Mor G. (2007b) Inflammation, cancer and chemoresistance: taking advantage of the toll-like receptor signaling pathway. *Am J Reprod Immunol* **57**, 93-107.

Choucair N., Laporte V., Levy R., Tranchant C., Gies J. P., Poindron P. and Lombard Y. (2006) The role of calcium and magnesium ions in uptake of beta-amyloid peptides by microglial cells. *Int J Immunopathol Pharmacol* **19**, 683-96.

Clarac F. and Pearlstein E. (2007) Invertebrate preparations and their contribution to neurobiology in the second half of the 20th century. *Brain Res Rev* **54**, 113-61.

Clarijs R., Schalkwijk L., Ruiter D. J. and de Waal R. M. (2003) EMAP-II expression is associated with macrophage accumulation in primary uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**, 1801-6.

- Clatworthy A. L. and Grose E. (1999) Immune-mediated alterations in nociceptive sensory function in *Aplysia californica*. *J Exp Biol* **202**, 623-30.
- Cole A. M., Ganz T., Liese A. M., Burdick M. D., Liu L. and Strieter R. M. (2001) Cutting edge: IFN-inducible ELR- CXC chemokines display defensin-like antimicrobial activity. *J Immunol* **167**, 623-7.
- Constam D. B., Philipp J., Malipiero U. V., ten Dijke P., Schachner M. and Fontana A. (1992) Differential expression of transforming growth factor-beta 1, -beta 2, and -beta 3 by glioblastoma cells, astrocytes, and microglia. *J Immunol* **148**, 1404-10.
- Coraci I. S., Husemann J., Berman J. W., Hulette C., Dufour J. H., Campanella G. K., Luster A. D., Silverstein S. C. and El-Khoury J. B. (2002) CD36, a class B scavenger receptor, is expressed on microglia in Alzheimer's disease brains and can mediate production of reactive oxygen species in response to beta-amyloid fibrils. *Am J Pathol* **160**, 101-12.
- Cousins R. J. and Lanningham-Foster L. (2000) Regulation of cysteine-rich intestinal protein, a zinc finger protein, by mediators of the immune response. *J Infect Dis* **182 Suppl 1**, S81-4.
- Daemen M. A., van 't Veer C., Denecker G., Heemskerk V. H., Wolfs T. G., Clauss M., Vandenabeele P. and Buurman W. A. (1999) Inhibition of apoptosis induced by ischemia-reperfusion prevents inflammation. *J Clin Invest* **104**, 541-9.
- Dalmau I., Finsen B., Tonder N., Zimmer J., Gonzalez B. and Castellano B. (1997) Development of microglia in the prenatal rat hippocampus. *J Comp Neurol* **377**, 70-84.
- Dalmau I., Vela J. M., Gonzalez B., Finsen B. and Castellano B. (2003) Dynamics of microglia in the developing rat brain. *J Comp Neurol* **458**, 144-57.
- Dalpke A. H., Schafer M. K., Frey M., Zimmermann S., Tebbe J., Weihe E. and Heeg K. (2002) Immunostimulatory CpG-DNA activates murine microglia. *J Immunol* **168**, 4854-63.
- Davis E. J., Foster T. D. and Thomas W. E. (1994) Cellular forms and functions of brain microglia. *Brain Res Bull* **34**, 73-8.
- de Vries H. E., Blom-Roosemalen M. C., van Oosten M., de Boer A. G., van Berkel T. J., Breimer D. D. and Kuiper J. (1996) The influence of cytokines on the integrity of the blood-brain barrier in vitro. *J Neuroimmunol* **64**, 37-43.
- Deli M. A., Descamps L., Dehouck M. P., Cecchelli R., Joo F., Abraham C. S. and Torpier G. (1995) Exposure of tumor necrosis factor-alpha to luminal membrane of bovine brain capillary endothelial cells cocultured with astrocytes induces a delayed increase of permeability and cytoplasmic stress fiber formation of actin. *J Neurosci Res* **41**, 717-26.

- Dheen S. T., Kaur C. and Ling E. A. (2007) Microglial activation and its implications in the brain diseases. *Curr Med Chem* **14**, 1189-97.
- Dillon S., Agrawal S., Banerjee K., Letterio J., Denning T. L., Oswald-Richter K., Kasproicz D. J., Kellar K., Pare J., van Dyke T., Ziegler S., Unutmaz D. and Pulendran B. (2006) Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. *J Clin Invest* **116**, 916-28.
- Dobrovolskaia M. A. and Vogel S. N. (2002) Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes Infect* **4**, 903-14.
- Dong Y. and Benveniste E. N. (2001) Immune function of astrocytes. *Glia* **36**, 180-90.
- Duan Y., Panoff J., Burrell B. D., Sahley C. L. and Muller K. J. (2005) Repair and regeneration of functional synaptic connections: cellular and molecular interactions in the leech. *Cell Mol Neurobiol* **25**, 441-50.
- Durr U. H., Sudheendra U. S. and Ramamoorthy A. (2006) LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta* **1758**, 1408-25.
- Ebert S., Gerber J., Bader S., Muhlhauser F., Brechtel K., Mitchell T. J. and Nau R. (2005) Dose-dependent activation of microglial cells by Toll-like receptor agonists alone and in combination. *J Neuroimmunol* **159**, 87-96.
- Edwards J. A., Denis F. and Talbot P. J. (2000) Activation of glial cells by human coronavirus OC43 infection. *J Neuroimmunol* **108**, 73-81.
- Eggleton P., Reid K. B. and Tenner A. J. (1998) C1q--how many functions? How many receptors? *Trends Cell Biol* **8**, 428-31.
- Ehlers M. R. (2000) CR3: a general purpose adhesion-recognition receptor essential for innate immunity. *Microbes Infect* **2**, 289-94.
- Ehrenberg C. G. (1836) Beobachtungen einer auffallenden bisher unbekannten Structur des Seelenorgans bei Menschen und Tieren.
- Ehrlich P. (1885) Das sauerstoffbedurfnis des organismus, in Eine Farbenanalytische Studie. *Hirschwald, Berlin*.
- El Andaloussi A., Sonabend A. M., Han Y. and Lesniak M. S. (2006) Stimulation of TLR9 with CpG ODN enhances apoptosis of glioma and prolongs the survival of mice with experimental brain tumors. *Glia* **54**, 526-35.

- Elward K. and Gasque P. (2003) "Eat me" and "don't eat me" signals govern the innate immune response and tissue repair in the CNS: emphasis on the critical role of the complement system. *Mol Immunol* **40**, 85-94.
- Emes R. D., Wang W. Z., Lanary K. and Blackshaw S. E. (2003) HmCRIP, a cysteine-rich intestinal protein, is expressed by an identified regenerating nerve cell. *FEBS Lett* **533**, 124-8.
- Esen N. and Kielian T. (2005) Recognition of Staphylococcus aureus-derived peptidoglycan (PGN) but not intact bacteria is mediated by CD14 in microglia. *J Neuroimmunol* **170**, 93-104.
- Esen N. and Kielian T. (2006) Central role for MyD88 in the responses of microglia to pathogen-associated molecular patterns. *J Immunol* **176**, 6802-11.
- Esen N., Tanga F. Y., DeLeo J. A. and Kielian T. (2004) Toll-like receptor 2 (TLR2) mediates astrocyte activation in response to the Gram-positive bacterium Staphylococcus aureus. *J Neurochem* **88**, 746-58.
- Ezekowitz R. A. (2003) Role of the mannose-binding lectin in innate immunity. *J Infect Dis* **187 Suppl 2**, S335-9.
- Farina C., Krumbholz M., Giese T., Hartmann G., Aloisi F. and Meinel E. (2005) Preferential expression and function of Toll-like receptor 3 in human astrocytes. *J Neuroimmunol* **159**, 12-9.
- Farr M., Mathews J., Zhu D. F. and Ambron R. T. (1999) Inflammation causes a long-term hyperexcitability in the nociceptive sensory neurons of Aplysia. *Learn Mem* **6**, 331-40.
- Ferrario A., von Tiehl K. F., Rucker N., Schwarz M. A., Gill P. S. and Gomer C. J. (2000) Antiangiogenic treatment enhances photodynamic therapy responsiveness in a mouse mammary carcinoma. *Cancer Res* **60**, 4066-9.
- Finsen B. R. (1993) Microglial reactions following CNS-grafting. *Clin Neuropathol* **12**, 308-10.
- Franchini A., Kleitsas D. and Ottaviani E. (1996) Immunocytochemical evidence of PDGF- and TGF-beta-like molecules in invertebrate and vertebrate immunocytes: an evolutionary approach. *Histochem J* **28**, 599-605.
- Freyer D., Weih M., Weber J. R., Burger W., Scholz P., Manz R., Ziegenhorn A., Angestwurm K. and Dirnagl U. (1996) Pneumococcal cell wall components induce nitric oxide synthase and TNF-alpha in astroglial-enriched cultures. *Glia* **16**, 1-6.
- Ganter S., Northoff H., Mannel D. and Gebicke-Harter P. J. (1992) Growth control of cultured microglia. *J Neurosci Res* **33**, 218-30.

- Gantner B. N., Simmons R. M., Canavera S. J., Akira S. and Underhill D. M. (2003) Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med* **197**, 1107-17.
- Gasque P., Dean Y. D., McGreal E. P., VanBeek J. and Morgan B. P. (2000) Complement components of the innate immune system in health and disease in the CNS. *Immunopharmacology* **49**, 171-86.
- Gasque P., Neal J. W., Singhrao S. K., McGreal E. P., Dean Y. D., Van B. J. and Morgan B. P. (2002) Roles of the complement system in human neurodegenerative disorders: pro-inflammatory and tissue remodeling activities. *Mol Neurobiol* **25**, 1-17.
- Gewurz H., Ying S. C., Jiang H. and Lint T. F. (1993) Nonimmune activation of the classical complement pathway. *Behring Inst Mitt*, 138-47.
- Gimsa U., A O. R., Pandiyan P., Teichmann D., Bechmann I., Nitsch R. and Brunner-Weinzierl M. C. (2004) Astrocytes protect the CNS: antigen-specific T helper cell responses are inhibited by astrocyte-induced upregulation of CTLA-4 (CD152). *J Mol Med* **82**, 364-72.
- Giovannoni G., Miller R. F., Heales S. J., Land J. M., Harrison M. J. and Thompson E. J. (1998) Cerebrospinal fluid and serum nitric oxide metabolites in patients with multiple sclerosis Elevated cerebrospinal fluid and serum nitrate and nitrite levels in patients with central nervous system complications of HIV-1 infection: a correlation with blood-brain-barrier dysfunction The potential role of nitric oxide in multiple sclerosis. *Mult Scler* **4**, 27-30.
- Girardin S. E., Hugot J. P. and Sansonetti P. J. (2003) Lessons from Nod2 studies: towards a link between Crohn's disease and bacterial sensing. *Trends Immunol* **24**, 652-8.
- Girardin S. E., Tournebise R., Mavris M., Page A. L., Li X., Stark G. R., Bertin J., DiStefano P. S., Yaniv M., Sansonetti P. J. and Philpott D. J. (2001) CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*. *EMBO Rep* **2**, 736-42.
- Glabinski A. R. and Ransohoff R. M. (1999) Chemokines and chemokine receptors in CNS pathology. *J Neurovirol* **5**, 3-12.
- Gloor S. M., Weber A., Adachi N. and Frei K. (1997) Interleukin-1 modulates protein tyrosine phosphatase activity and permeability of brain endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **239**, 804-9.
- Gnant M. F., Berger A. C., Huang J., Puhlmann M., Wu P. C., Merino M. J., Bartlett D. L., Alexander H. R., Jr. and Libutti S. K. (1999) Sensitization of tumor necrosis factor alpha-resistant human melanoma by tumor-specific in vivo transfer of the gene encoding endothelial monocyte-activating polypeptide II using recombinant vaccinia virus. *Cancer Res* **59**, 4668-74.

- Gomez-Gomez L. and Boller T. (2002) Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci* **7**, 251-6.
- Gorelik L. and Flavell R. A. (2002) Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nat Rev Immunol* **2**, 46-53.
- Gregersen R., Lambertsen K. and Finsen B. (2000) Microglia and macrophages are the major source of tumor necrosis factor in permanent middle cerebral artery occlusion in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* **20**, 53-65.
- Guillemin G. J. and Brew B. J. (2004) Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. *J Leukoc Biol* **75**, 388-97.
- Hailman E., Lichenstein H. S., Wurfel M. M., Miller D. S., Johnson D. A., Kelley M., Busse L. A., Zukowski M. M. and Wright S. D. (1994) Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J Exp Med* **179**, 269-77.
- Han J., Mathison J. C., Ulevitch R. J. and Tobias P. S. (1994) Lipopolysaccharide (LPS) binding protein, truncated at Ile-197, binds LPS but does not transfer LPS to CD14. *J Biol Chem* **269**, 8172-5.
- Hanisch U. K. (2002) Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* **40**, 140-55.
- Hao H. N., Zhao J., Lotoczky G., Grever W. E. and Lyman W. D. (2001) Induction of human beta-defensin-2 expression in human astrocytes by lipopolysaccharide and cytokines. *J Neurochem* **77**, 1027-35.
- Harkness K. A., Sussman J. D., Davies-Jones G. A., Greenwood J. and Woodroffe M. N. (2003) Cytokine regulation of MCP-1 expression in brain and retinal microvascular endothelial cells. *J Neuroimmunol* **142**, 1-9.
- Hartmann G., Battiany J., Poeck H., Wagner M., Kerkmann M., Lubenow N., Rothenfusser S. and Endres S. (2003) Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN-alpha induction in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* **33**, 1633-41.
- Hausler K. G., Prinz M., Nolte C., Weber J. R., Schumann R. R., Kettenmann H. and Hanisch U. K. (2002) Interferon-gamma differentially modulates the release of cytokines and chemokines in lipopolysaccharide- and pneumococcal cell wall-stimulated mouse microglia and macrophages. *Eur J Neurosci* **16**, 2113-22.
- Hauwel M., Furon E., Canova C., Griffiths M., Neal J. and Gasque P. (2005) Innate (inherent) control of brain infection, brain inflammation and brain repair: the role of microglia, astrocytes, "protective" glial stem cells and stromal endymal cells. *Brain Res Brain Res Rev* **48**, 220-33.

- Hayashi F., Smith K. D., Ozinsky A., Hawn T. R., Yi E. C., Goodlett D. R., Eng J. K., Akira S., Underhill D. M. and Aderem A. (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**, 1099-103.
- Hayashi M., Luo Y., Laning J., Strieter R. M. and Dorf M. E. (1995) Production and function of monocyte chemoattractant protein-1 and other beta-chemokines in murine glial cells. *J Neuroimmunol* **60**, 143-50.
- Heil F., Hemmi H., Hochrein H., Ampenberger F., Kirschning C., Akira S., Lipford G., Wagner H. and Bauer S. (2004) Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* **303**, 1526-9.
- Hemmi H., Kaisho T., Takeuchi O., Sato S., Sanjo H., Hoshino K., Horiuchi T., Tomizawa H., Takeda K. and Akira S. (2002) Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* **3**, 196-200.
- Heumann D. and Roger T. (2002) Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clin Chim Acta* **323**, 59-72.
- Hickey W. F. (1999) Leukocyte traffic in the central nervous system: the participants and their roles. *Semin Immunol* **11**, 125-37.
- Hide I., Tanaka M., Inoue A., Nakajima K., Kohsaka S., Inoue K. and Nakata Y. (2000) Extracellular ATP triggers tumor necrosis factor-alpha release from rat microglia. *J Neurochem* **75**, 965-72.
- Hoebe K., Du X., Georgel P., Janssen E., Tabeta K., Kim S. O., Goode J., Lin P., Mann N., Mudd S., Crozat K., Sovath S., Han J. and Beutler B. (2003) Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* **424**, 743-8.
- Hoffmann J. A., Kafatos F. C., Janeway C. A. and Ezekowitz R. A. (1999) Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* **284**, 1313-8.
- Hoffmann J. A. and Reichhart J. M. (2002) Drosophila innate immunity: an evolutionary perspective. *Nat Immunol* **3**, 121-6.
- Hofman F. M., Dohadwala M. M., Wright A. D., Hinton D. R. and Walker S. M. (1994) Exogenous tat protein activates central nervous system-derived endothelial cells. *J Neuroimmunol* **54**, 19-28.
- Howes E. A., Arnett-Kibel C. and Smith P. J. (1993) A blood-derived attachment factor enhances the in vitro growth of two glial cell types from adult cockroach. *Glia* **8**, 33-41.
- Hua Y., Miyagi T., Saito H., Gold D. P., Li X. K., Fujino M., Taga T., Amemiya H., Suzuki S., Kokubo T. and Kimura H. (2000) Cytokine requirement for the development of rat dendritic cells by in vitro culturing of bone marrow cells. *Transplant Proc* **32**, 2078-9.

- Huber M., Kalis C., Keck S., Jiang Z., Georgel P., Du X., Shamel L., Sovath S., Mudd S., Beutler B., Galanos C. and Freudenberg M. A. (2006) R-form LPS, the master key to the activation of TLR4/MD-2-positive cells. *Eur J Immunol* **36**, 701-11.
- Hubschle T., Mutze J., Muhlradt P. F., Korte S., Gerstberger R. and Roth J. (2006) Pyrexia, anorexia, adiposia, and depressed motor activity in rats during systemic inflammation induced by the Toll-like receptors-2 and -6 agonists MALP-2 and FSL-1. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **290**, R180-7.
- Husemann J., Loike J. D., Anankov R., Febbraio M. and Silverstein S. C. (2002) Scavenger receptors in neurobiology and neuropathology: their role on microglia and other cells of the nervous system. *Glia* **40**, 195-205.
- Hutchins K. D., Dickson D. W., Rashbaum W. K. and Lyman W. D. (1990) Localization of morphologically distinct microglial populations in the developing human fetal brain: implications for ontogeny. *Brain Res Dev Brain Res* **55**, 95-102.
- Huynh H. K. and Dorovini-Zis K. (1993) Effects of interferon-gamma on primary cultures of human brain microvessel endothelial cells. *Am J Pathol* **142**, 1265-78.
- Igaki T., Kanda H., Yamamoto-Goto Y., Kanuka H., Kuranaga E., Aigaki T. and Miura M. (2002) Eiger, a TNF superfamily ligand that triggers the Drosophila JNK pathway. *Embo J* **21**, 3009-18.
- Iliev A. I., Stringaris A. K., Nau R. and Neumann H. (2004) Neuronal injury mediated via stimulation of microglial toll-like receptor-9 (TLR9). *Faseb J* **18**, 412-4.
- Inohara, Chamaillard, McDonald C. and Nunez G. (2005) NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu Rev Biochem* **74**, 355-83.
- Inohara N. and Nunez G. (2003) NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol* **3**, 371-82.
- Iribarren P., Chen K., Hu J., Gong W., Cho E. H., Lockett S., Uranchimeg B. and Wang J. M. (2005) CpG-containing oligodeoxynucleotide promotes microglial cell uptake of amyloid beta 1-42 peptide by up-regulating the expression of the G-protein- coupled receptor mFPR2. *Faseb J* **19**, 2032-4.
- Jackson A. C., Rossiter J. P. and Lafon M. (2006) Expression of Toll-like receptor 3 in the human cerebellar cortex in rabies, herpes simplex encephalitis, and other neurological diseases. *J Neurovirol* **12**, 229-34.
- Jaworowicz D. J., Jr., Korytko P. J., Singh Lakhman S. and Boje K. M. (1998) Nitric oxide and prostaglandin E2 formation parallels blood-brain barrier disruption in an experimental rat model of bacterial meningitis. *Brain Res Bull* **46**, 541-6.
- Jiang C. L. and Lu C. L. (1998) Interleukin-2 and its effects in the central nervous system. *Biol Signals Recept* **7**, 148-56.

- Jung D. Y., Lee H., Jung B. Y., Ock J., Lee M. S., Lee W. H. and Suk K. (2005) TLR4, but not TLR2, signals autoregulatory apoptosis of cultured microglia: a critical role of IFN-beta as a decision maker. *J Immunol* **174**, 6467-76.
- Jurk M., Heil F., Vollmer J., Schetter C., Krieg A. M., Wagner H., Lipford G. and Bauer S. (2002) Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat Immunol* **3**, 499.
- Kaisho T. and Akira S. (2004) Pleiotropic function of Toll-like receptors. *Microbes Infect* **6**, 1388-94.
- Kao J., Houck K., Fan Y., Haehnel I., Libutti S. K., Kayton M. L., Grikscheit T., Chabot J., Nowygrod R., Greenberg S., et al., Ryan J., Brett G., Chen J., Shen H., Fan Y. G., Godman G., Familletti P. C., Wang F. and Pan Y. C. (1994) Characterization of a novel tumor-derived cytokine. Endothelial-monocyte activating polypeptide II
- Endothelial monocyte-activating polypeptide II. A novel tumor-derived polypeptide that activates host-response mechanisms. *J Biol Chem* **269**, 25106-19.
- Kao J., Ryan J., Brett G., Chen J., Shen H., Fan Y. G., Godman G., Familletti P. C., Wang F., Pan Y. C. and et al. (1992) Endothelial monocyte-activating polypeptide II. A novel tumor-derived polypeptide that activates host-response mechanisms. *J Biol Chem* **267**, 20239-47.
- Kariko K., Bhuyan P., Capodici J. and Weissman D. (2004) Small interfering RNAs mediate sequence-independent gene suppression and induce immune activation by signaling through toll-like receptor 3. *J Immunol* **172**, 6545-9.
- Karpus W. J. (2001) Chemokines and central nervous system disorders. *J Neurovirol* **7**, 493-500.
- Kato H., Takahashi A. and Itoyama Y. (2003) Cell cycle protein expression in proliferating microglia and astrocytes following transient global cerebral ischemia in the rat. *Brain Res Bull* **60**, 215-21.
- Kaur C., Ling E. A. and Wong W. C. (1985) Transformation of amoeboid microglial cells into microglia in the corpus callosum of the postnatal rat brain. An electron microscopical study. *Arch Histol Jpn* **48**, 17-25.
- Kawai T. and Akira S. (2006) Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol* **7**, 131-7.
- Keezer S. M., Ivie S. E., Krutzsch H. C., Tandle A., Libutti S. K. and Roberts D. D. (2003) Angiogenesis inhibitors target the endothelial cell cytoskeleton through altered regulation of heat shock protein 27 and cofilin. *Cancer Res* **63**, 6405-12.
- Kida S., Steart P. V., Zhang E. T. and Weller R. O. (1993) Perivascular cells act as scavengers in the cerebral perivascular spaces and remain distinct from pericytes, microglia and macrophages. *Acta Neuropathol (Berl)* **85**, 646-52.

- Kiefer R., Schweitzer T., Jung S., Toyka K. V. and Hartung H. P. (1998) Sequential expression of transforming growth factor-beta1 by T-cells, macrophages, and microglia in rat spinal cord during autoimmune inflammation. *J Neuropathol Exp Neurol* **57**, 385-95.
- Kielian M. (2002) Structural surprises from the flaviviruses and alphaviruses. *Mol Cell* **9**, 454-6.
- Kielian T. (2004) Microglia and chemokines in infectious diseases of the nervous system: views and reviews. *Front Biosci* **9**, 732-50.
- Kielian T., Haney A., Mayes P. M., Garg S. and Esen N. (2005) Toll-like receptor 2 modulates the proinflammatory milieu in Staphylococcus aureus-induced brain abscess. *Infect Immun* **73**, 7428-35.
- Kim J. G., Lee S. J. and Kagnoff M. F. (2004) Nod1 is an essential signal transducer in intestinal epithelial cells infected with bacteria that avoid recognition by toll-like receptors. *Infect Immun* **72**, 1487-95.
- Kim S., Moon C., Wie M. B., Kim H., Tanuma N., Matsumoto Y. and Shin T. (2000) Enhanced expression of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in autoimmune encephalomyelitis. *J Vet Sci* **1**, 11-7.
- Kiura K., Kataoka H., Yasuda M., Inoue N. and Shibata K. (2006) The diacylated lipopeptide FSL-1 induces TLR2-mediated Th2 responses. *FEMS Immunol Med Microbiol* **48**, 44-55.
- Knies U. E., Behrendorf H. A., Mitchell C. A., Deutsch U., Risau W., Drexler H. C. and Clauss M. (1998) Regulation of endothelial monocyte-activating polypeptide II release by apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 12322-7.
- Ko Y. G., Park H., Kim T., Lee J. W., Park S. G., Seol W., Kim J. E., Lee W. H., Kim S. H., Park J. E. and Kim S. (2001) A cofactor of tRNA synthetase, p43, is secreted to up-regulate proinflammatory genes. *J Biol Chem* **276**, 23028-33.
- Kobayashi K. S., Chamaillard M., Ogura Y., Henegariu O., Inohara N., Nunez G. and Flavell R. A. (2005) Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* **307**, 731-4.
- Koedel U., Rupprecht T., Angele B., Heesemann J., Wagner H., Pfister H. W. and Kirschning C. J. (2004) MyD88 is required for mounting a robust host immune response to Streptococcus pneumoniae in the CNS. *Brain* **127**, 1437-45.
- Konat G. W., Kielian T. and Marriott I. (2006) The role of Toll-like receptors in CNS response to microbial challenge. *J Neurochem* **99**, 1-12.
- Kopp E. and Medzhitov R. (2003) Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* **15**, 396-401.

- Kopp E. B. and Medzhitov R. (1999) The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr Opin Immunol* **11**, 13-8.
- Koppal T., Petrova T. V. and Van Eldik L. J. (2000) Cyclopentenone prostaglandin 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) acts as a general inhibitor of inflammatory responses in activated BV-2 microglial cells. *Brain Res* **867**, 115-21.
- Korb L. C. and Ahearn J. M. (1997) C1q binds directly and specifically to surface blebs of apoptotic human keratinocytes: complement deficiency and systemic lupus erythematosus revisited. *J Immunol* **158**, 4525-8.
- Kretzschmar D. and Pflugfelder G. O. (2002) Glia in development, function, and neurodegeneration of the adult insect brain. *Brain Res Bull* **57**, 121-31.
- Kreutzberg G. W. (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* **19**, 312-8.
- Krishnegowda G., Hajjar A. M., Zhu J., Douglass E. J., Uematsu S., Akira S., Woods A. S. and Gowda D. C. (2005) Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. *J Biol Chem* **280**, 8606-16.
- Kuffler S. W. a. N., J.G. (1976) From Neuron to brain. *Sinauer Associates*.
- Kumar S. M., Porterfield D. M., Muller K. J., Smith P. J. and Sahley C. L. (2001) Nerve injury induces a rapid efflux of nitric oxide (NO) detected with a novel NO microsensor. *J Neurosci* **21**, 215-20.
- Kuraya M., Matsushita M., Endo Y., Thiel S. and Fujita T. (2003) Expression of H-ficolin/Hakata antigen, mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1 and MASP-3 by human glioma cell line T98G. *Int Immunol* **15**, 109-17.
- Lacroix S., Feinstein D. and Rivest S. (1998) The bacterial endotoxin lipopolysaccharide has the ability to target the brain in upregulating its membrane CD14 receptor within specific cellular populations. *Brain Pathol* **8**, 625-40.
- Laflamme N., Echchannaoui H., Landmann R. and Rivest S. (2003) Cooperation between toll-like receptor 2 and 4 in the brain of mice challenged with cell wall components derived from gram-negative and gram-positive bacteria. *Eur J Immunol* **33**, 1127-38.
- Laflamme N. and Rivest S. (2001) Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components. *Faseb J* **15**, 155-163.
- Lanningham-Foster L., Green C. L., Langkamp-Henken B., Davis B. A., Nguyen K. T., Bender B. S. and Cousins R. J. (2002) Overexpression of CRIP in transgenic mice

alters cytokine patterns and the immune response. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**, E1197-203.

- Lans T. E., ten Hagen T. L., van Horssen R., Wu P. C., van Tiel S. T., Libutti S. K., Alexander H. R. and Eggermont A. M. (2002) Improved antitumor response to isolated limb perfusion with tumor necrosis factor after upregulation of endothelial monocyte-activating polypeptide II in soft tissue sarcoma. *Ann Surg Oncol* **9**, 812-9.
- Lans T. E., Van Horssen R., Eggermont A. M. and Ten Hagen T. L. (2004) Involvement of endothelial monocyte activating polypeptide II in tumor necrosis factor-alpha-based anti-cancer therapy. *Anticancer Res* **24**, 2243-8.
- Lauw F. N., Caffrey D. R. and Golenbock D. T. (2005) Of mice and man: TLR11 (finally) finds profilin. *Trends Immunol* **26**, 509-11.
- Lawson L. J., Perry V. H. and Gordon S. (1992) Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* **48**, 405-15.
- Ledeboer A., Breve J. J., Poole S., Tilders F. J. and Van Dam A. M. (2000) Interleukin-10, interleukin-4, and transforming growth factor-beta differentially regulate lipopolysaccharide-induced production of pro-inflammatory cytokines and nitric oxide in co-cultures of rat astroglial and microglial cells. *Glia* **30**, 134-42.
- Lee J., Hur J., Lee P., Kim J. Y., Cho N., Kim S. Y., Kim H., Lee M. S. and Suk K. (2001) Dual role of inflammatory stimuli in activation-induced cell death of mouse microglial cells. Initiation of two separate apoptotic pathways via induction of interferon regulatory factor-1 and caspase-11. *J Biol Chem* **276**, 32956-65.
- Lee M. S. and Kim Y. J. (2007) Pattern-recognition receptor signaling initiated from extracellular, membrane, and cytoplasmic space. *Mol Cells* **23**, 1-10.
- Lee S. C., Liu W., Brosnan C. F. and Dickson D. W. (1994) GM-CSF promotes proliferation of human fetal and adult microglia in primary cultures. *Glia* **12**, 309-18.
- Lehnardt S., Henneke P., Lien E., Kasper D. L., Volpe J. J., Bechmann I., Nitsch R., Weber J. R., Golenbock D. T. and Vartanian T. (2006) A mechanism for neurodegeneration induced by group B streptococci through activation of the TLR2/MyD88 pathway in microglia. *J Immunol* **177**, 583-92.
- Lehnardt S., Massillon L., Follett P., Jensen F. E., Ratan R., Rosenberg P. A., Volpe J. J. and Vartanian T. (2003) Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8514-9.
- Leipe D. D., Koonin E. V. and Aravind L. (2004) STAND, a class of P-loop NTPases including animal and plant regulators of programmed cell death: multiple, complex domain architectures, unusual phyletic patterns, and evolution by horizontal gene transfer. *J Mol Biol* **343**, 1-28.

- Leist M., Fava E., Montecucco C. and Nicotera P. (1997) Peroxynitrite and nitric oxide donors induce neuronal apoptosis by eliciting autocrine excitotoxicity. *Eur J Neurosci* **9**, 1488-98.
- Lemaitre B., Nicolas E., Michaut L., Reichhart J. M. and Hoffmann J. A. (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**, 973-83.
- Lemaitre B., Reichhart J. M. and Hoffmann J. A. (1997) *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 14614-9.
- Letterio J. J. and Roberts A. B. (1998) Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol* **16**, 137-61.
- LeVine A. M., Bruno M. D., Huelsman K. M., Ross G. F., Whitsett J. A. and Korfhagen T. R. (1997) Surfactant protein A-deficient mice are susceptible to group B streptococcal infection. *J Immunol* **158**, 4336-40.
- Levine S. (1987) Choroid plexus: target for systemic disease and pathway to the brain. *Lab Invest* **56**, 213.
- Linehan S. A., Martinez-Pomares L., Stahl P. D. and Gordon S. (1999) Mannose receptor and its putative ligands in normal murine lymphoid and nonlymphoid organs: In situ expression of mannose receptor by selected macrophages, endothelial cells, perivascular microglia, and mesangial cells, but not dendritic cells. *J Exp Med* **189**, 1961-72.
- Ling E. A., Kaur C. and Wong W. C. (1991) Expression of major histocompatibility complex and leukocyte common antigens in amoeboid microglia in postnatal rats. *J Anat* **177**, 117-26.
- Ling E. A., Kaur L. C., Yick T. Y. and Wong W. C. (1990) Immunocytochemical localization of CR3 complement receptors with OX-42 in amoeboid microglia in postnatal rats. *Anat Embryol (Berl)* **182**, 481-6.
- Liu S. H. and Gottsch J. D. (1999) Apoptosis induced by a corneal-endothelium-derived cytokine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**, 3152-9.
- Liu W., Brosnan C. F., Dickson D. W. and Lee S. C. (1994) Macrophage colony-stimulating factor mediates astrocyte-induced microglial ramification in human fetal central nervous system culture. *Am J Pathol* **145**, 48-53.
- Liva S. M., Kahn M. A., Dopp J. M. and de Vellis J. (1999) Signal transduction pathways induced by GM-CSF in microglia: significance in the control of proliferation. *Glia* **26**, 344-52.

- Lu J., Teh C., Kishore U. and Reid K. B. (2002) Collectins and ficolins: sugar pattern recognition molecules of the mammalian innate immune system. *Biochim Biophys Acta* **1572**, 387-400.
- Ma Y., Li J., Chiu I., Wang Y., Sloane J. A., Lu J., Kosaras B., Sidman R. L., Volpe J. J. and Vartanian T. (2006) Toll-like receptor 8 functions as a negative regulator of neurite outgrowth and inducer of neuronal apoptosis. *J Cell Biol* **175**, 209-15.
- Macagno E. R. (1980) Number and distribution of neurons in leech segmental ganglia. *J Comp Neurol* **190**, 283-302.
- Maciejewski-Lenoir D., Chen S., Feng L., Maki R. and Bacon K. B. (1999) Characterization of fractalkine in rat brain cells: migratory and activation signals for CX3CR-1-expressing microglia. *J Immunol* **163**, 1628-35.
- Mallo G. V., Kurz C. L., Couillault C., Pujol N., Granjeaud S., Kohara Y. and Ewbank J. J. (2002) Inducible antibacterial defense system in *C. elegans*. *Curr Biol* **12**, 1209-14.
- Martinon F., Agostini L., Meylan E. and Tschopp J. (2004) Identification of bacterial muramyl dipeptide as activator of the NALP3/cryopyrin inflammasome. *Curr Biol* **14**, 1929-34.
- Martinon F. and Tschopp J. (2005) NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends Immunol* **26**, 447-54.
- Marvin M. R., Libutti S. K., Kayton M., Kao J., Hayward J., Grikscheit T., Fan Y., Brett J., Weinberg A., Nowygrod R., LoGerfo P., Feind C., Hansen K. S., Schwartz M., Stern D. and Chabot J. (1996) A novel tumor-derived mediator that sensitizes cytokine-resistant tumors to tumor necrosis factor. *J Surg Res* **63**, 248-55.
- Massari P., Henneke P., Ho Y., Latz E., Golenbock D. T. and Wetzler L. M. (2002) Cutting edge: Immune stimulation by neisserial porins is toll-like receptor 2 and MyD88 dependent. *J Immunol* **168**, 1533-7.
- Mato M., Ookawara S. and Saito-Taki T. (1986) Serological determinants of fluorescent granular perithelial cells along small cerebral blood vessels in rodent. *Acta Neuropathol (Berl)* **72**, 117-23.
- McCluskey L. P. and Lampson L. A. (2001) Local immune regulation in the central nervous system by substance P vs. glutamate. *J Neuroimmunol* **116**, 136-46.
- McGeer P. L. and McGeer E. (2004) Immunotherapy for Alzheimer's disease. *Sci Aging Knowledge Environ* **2004**, pe29.
- McGlade-McCulloh E., Morrissey A. M., Norona F. and Muller K. J. (1989) Individual microglia move rapidly and directly to nerve lesions in the leech central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 1093-7.

- McLarnon J. G., Zhang L., Goghari V., Lee Y. B., Walz W., Krieger C. and Kim S. U. (1999) Effects of ATP and elevated K⁺ on K⁺ currents and intracellular Ca²⁺ in human microglia. *Neuroscience* **91**, 343-52.
- McMenamin P. G. (1999) Distribution and phenotype of dendritic cells and resident tissue macrophages in the dura mater, leptomeninges, and choroid plexus of the rat brain as demonstrated in wholemount preparations. *J Comp Neurol* **405**, 553-62.
- Means T. K., Lien E., Yoshimura A., Wang S., Golenbock D. T. and Fenton M. J. (1999) The CD14 ligands lipoarabinomannan and lipopolysaccharide differ in their requirement for Toll-like receptors. *J Immunol* **163**, 6748-55.
- Medzhitov R. and Janeway C., Jr. (2000a) Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* **173**, 89-97.
- Medzhitov R. and Janeway C., Jr. (2000b) Innate immunity. *N Engl J Med* **343**, 338-44.
- Medzhitov R. and Janeway C., Jr. (2000c) The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol* **8**, 452-6.
- Medzhitov R., Preston-Hurlburt P. and Janeway C. A., Jr. (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**, 394-7.
- Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Kopp E., Stadlen A., Chen C., Ghosh S. and Janeway C. A., Jr. (1998) MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell* **2**, 253-8.
- Megyeri P., Abraham C. S., Temesvari P., Kovacs J., Vas T. and Speer C. P. (1992) Recombinant human tumor necrosis factor alpha constricts pial arterioles and increases blood-brain barrier permeability in newborn piglets. *Neurosci Lett* **148**, 137-40.
- Mevorach D., Mascarenhas J. O., Gershov D. and Elkon K. B. (1998) Complement-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages. *J Exp Med* **188**, 2313-20.
- Meylan E., Tschopp J. and Karin M. (2006) Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* **442**, 39-44.
- Millet A. C. and Ewbank J. J. (2004) Immunity in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Opin Immunol* **16**, 4-9.
- Milligan C. E., Cunningham T. J. and Levitt P. (1991) Differential immunochemical markers reveal the normal distribution of brain macrophages and microglia in the developing rat brain
- Brain macrophages and microglia respond differently to lesions of the developing and adult visual system. *J Comp Neurol* **314**, 125-35.

- Mimura Y., Gotow T., Nishi T. and Osame M. (1994) Mechanisms of hyperpolarization induced by two cytokines, hTNF alpha and hIL-1 alpha in neurons of the mollusc, *Onchidium*. *Brain Res* **653**, 112-8.
- Moller T., Hanisch U. K. and Ransom B. R. (2000) Thrombin-induced activation of cultured rodent microglia. *J Neurochem* **75**, 1539-47.
- Morioka T., Kalehua A. N. and Streit W. J. (1991) The microglial reaction in the rat dorsal hippocampus following transient forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **11**, 966-73.
- Morita K., Chow K. L. and Ueno N. (1999) Regulation of body length and male tail ray pattern formation of *Caenorhabditis elegans* by a member of TGF-beta family. *Development* **126**, 1337-47.
- Mueller C. A., Richt J. A., Meyermann R., Deininger M. and Schluesener H. (2003a) Accumulation of the proinflammatory cytokine endothelial-monocyte-activating polypeptide II in ramified microglial cells in brains of Borna virus infected Lewis rats. *Neurosci Lett* **339**, 215-8.
- Mueller C. A., Schluesener H. J., Conrad S., Meyermann R., Schwab J. M., Richt J. A., Deininger M. and Schluesener H. (2003b) Lesional expression of a proinflammatory and antiangiogenic cytokine EMAP II confined to endothelium and microglia/macrophages during secondary damage following experimental traumatic brain injury Accumulation of the proinflammatory cytokine endothelial-monocyte-activating polypeptide II in ramified microglial cells in brains of Borna virus infected Lewis rats. *J Neuroimmunol* **135**, 1-9.
- Muller U. (1997) The nitric oxide system in insects. *Prog Neurobiol* **51**, 363-81.
- Murray J. C., Symonds P., Ward W., Huggins M., Tiga A., Rice K., Heng Y. M., Todd I. and Robins R. A. (2004) Colorectal cancer cells induce lymphocyte apoptosis by an endothelial monocyte-activating polypeptide-II-dependent mechanism. *J Immunol* **172**, 274-81.
- Myc A., Buck J., Gonin J., Reynolds B., Hammerling U. and Emanuel D. (1997) The level of lipopolysaccharide-binding protein is significantly increased in plasma in patients with the systemic inflammatory response syndrome. *Clin Diagn Lab Immunol* **4**, 113-6.
- Nakamura Y., Si Q. S. and Kataoka K. (1999) Lipopolysaccharide-induced microglial activation in culture: temporal profiles of morphological change and release of cytokines and nitric oxide. *Neurosci Res* **35**, 95-100.
- Netea M. G., Van Der Graaf C. A., Vonk A. G., Verschueren I., Van Der Meer J. W. and Kullberg B. J. (2002) The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. *J Infect Dis* **185**, 1483-9.

- Neumann H., Misgeld T., Matsumuro K. and Wekerle H. (1998) Neurotrophins inhibit major histocompatibility class II inducibility of microglia: involvement of the p75 neurotrophin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5779-84.
- Nguyen V. T. and Benveniste E. N. (2002) Critical role of tumor necrosis factor-alpha and NF-kappa B in interferon-gamma -induced CD40 expression in microglia/macrophages. *J Biol Chem* **277**, 13796-803.
- Nicholls J. G. and Baylor D. A. (1968) Specific modalities and receptive fields of sensory neurons in CNS of the leech. *J Neurophysiol* **31**, 740-56.
- Nicholson-Weller A. and Klickstein L. B. (1999) C1q-binding proteins and C1q receptors. *Curr Opin Immunol* **11**, 42-6.
- Norcum M. T. and Warrington J. A. (2000) The cytokine portion of p43 occupies a central position within the eukaryotic multisynthetase complex. *J Biol Chem* **275**, 17921-4.
- Novelli A., Reilly J. A., Lysko P. G. and Henneberry R. C. (1988) Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced. *Brain Res* **451**, 205-12.
- Nuhrenberg T. G., Voisard R., Fahlisch F., Rudelius M., Braun J., Gschwend J., Kountides M., Herter T., Baur R., Hombach V., Baeuerle P. A. and Zohlhofer D. (2005) Rapamycin attenuates vascular wall inflammation and progenitor cell promoters after angioplasty. *Faseb J* **19**, 246-8.
- Ogura Y., Inohara N., Benito A., Chen F. F., Yamaoka S. and Nunez G. (2001) Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem* **276**, 4812-8.
- O'Keefe G. M., Nguyen V. T. and Benveniste E. N. (1999) Class II transactivator and class II MHC gene expression in microglia: modulation by the cytokines TGF-beta, IL-4, IL-13 and IL-10. *Eur J Immunol* **29**, 1275-85.
- Okusawa T., Fujita M., Nakamura J., Into T., Yasuda M., Yoshimura A., Hara Y., Hasebe A., Golenbock D. T., Morita M., Kuroki Y., Ogawa T. and Shibata K. (2004) Relationship between structures and biological activities of mycoplasmal diacylated lipopeptides and their recognition by toll-like receptors 2 and 6. *Infect Immun* **72**, 1657-65.
- Oliveira A. C., Peixoto J. R., de Arruda L. B., Campos M. A., Gazzinelli R. T., Golenbock D. T., Akira S., Previato J. O., Mendonca-Previato L., Nobrega A. and Bellio M. (2004) Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. *J Immunol* **173**, 5688-96.
- Olson J. K. and Miller S. D. (2004) Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol* **173**, 3916-24.

- Opitz B., Schroder N. W., Spreitzer I., Michelsen K. S., Kirschning C. J., Hallatschek W., Zahringer U., Hartung T., Gobel U. B. and Schumann R. R. (2001) Toll-like receptor-2 mediates *Treponema glycolipid* and lipoteichoic acid-induced NF-kappaB translocation. *J Biol Chem* **276**, 22041-7.
- Orchard I. and Webb R. A. (1980) The projections of neurosecretory cells in the brain of the North-American medicinal leech, *Macrobdella decora*, using intracellular injection of horseradish peroxidase. *J Neurobiol* **11**, 229-42.
- Ottaviani E. and Franceschi C. (1996) The neuroimmunology of stress from invertebrates to man. *Prog Neurobiol* **48**, 421-40.
- Ozinsky A., Smith K. D., Hume D. and Underhill D. M. (2000a) Co-operative induction of pro-inflammatory signaling by Toll-like receptors. *J Endotoxin Res* **6**, 393-6.
- Ozinsky A., Underhill D. M., Fontenot J. D., Hajjar A. M., Smith K. D., Wilson C. B., Schroeder L. and Aderem A. (2000b) The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13766-71.
- Pace K. E., Lebestky T., Hummel T., Arnoux P., Kwan K. and Baum L. G. (2002) Characterization of a novel *Drosophila melanogaster* galectin. Expression in developing immune, neural, and muscle tissues. *J Biol Chem* **277**, 13091-8.
- Pachter J. S., de Vries H. E. and Fabry Z. (2003) The blood-brain barrier and its role in immune privilege in the central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* **62**, 593-604.
- Palma A. S., Feizi T., Zhang Y., Stoll M. S., Lawson A. M., Diaz-Rodriguez E., Campanero-Rhodes M. A., Costa J., Gordon S., Brown G. D. and Chai W. (2006) Ligands for the beta-glucan receptor, Dectin-1, assigned using "designer" microarrays of oligosaccharide probes (neoglycolipids) generated from glucan polysaccharides. *J Biol Chem* **281**, 5771-9.
- Park S. G., Kang Y. S., Ahn Y. H., Lee S. H., Kim K. R., Kim K. W., Koh G. Y., Ko Y. G. and Kim S. (2002) Dose-dependent biphasic activity of tRNA synthetase-associating factor, p43, in angiogenesis. *J Biol Chem* **277**, 45243-8.
- Park Y. and Hahm K. S. (2005) Antimicrobial peptides (AMPs): peptide structure and mode of action. *J Biochem Mol Biol* **38**, 507-16.
- Pearson A. M. (1996) Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol* **8**, 20-8.
- Pekny M. and Nilsson M. (2005) Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* **50**, 427-34.
- Pender M. P. and Rist M. J. (2001) Apoptosis of inflammatory cells in immune control of the nervous system: role of glia. *Glia* **36**, 137-44.

- Peress N. S., Perillo E. and Seidman R. J. (1996) Glial transforming growth factor (TGF)-beta isotypes in multiple sclerosis: differential glial expression of TGF-beta 1, 2 and 3 isotypes in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* **71**, 115-23.
- Perry V. H., Hume D. A. and Gordon S. (1985) Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience* **15**, 313-26.
- Peterson P. K., Hu S., Salak-Johnson J., Molitor T. W. and Chao C. C. (1997) Differential production of and migratory response to beta chemokines by human microglia and astrocytes. *J Infect Dis* **175**, 478-81.
- Petrovsky N. and Harrison L. C. (1998) The chronobiology of human cytokine production. *Int Rev Immunol* **16**, 635-49.
- Philpott D. J. and Girardin S. E. (2004) The role of Toll-like receptors and Nod proteins in bacterial infection. *Mol Immunol* **41**, 1099-108.
- Poirier J. (1976) La barrière hémato-encéphalique. Données morpho-fonctionnelles. *publication Hoechst Inc*, 51 p.
- Poltorak A., Ricciardi-Castagnoli P., Citterio S. and Beutler B. (2000) Physical contact between lipopolysaccharide and toll-like receptor 4 revealed by genetic complementation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2163-7.
- Pousset F., Dantzer R., Kelley K. W. and Parnet P. (2000) Interleukin-1 signaling in mouse astrocytes involves Akt: a study with interleukin-4 and IL-10. *Eur Cytokine Netw* **11**, 427-34.
- Pradel E., Zhang Y., Pujol N., Matsuyama T., Bargmann C. I. and Ewbank J. J. (2007) Detection and avoidance of a natural product from the pathogenic bacterium *Serratia marcescens* by *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 2295-300.
- Prast H. and Philippu A. (2001) Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog Neurobiol* **64**, 51-68.
- Prat A., Biernacki K., Wosik K. and Antel J. P. (2001) Glial cell influence on the human blood-brain barrier. *Glia* **36**, 145-55.
- Prehaud C., Megret F., Lafage M. and Lafon M. (2005) Virus infection switches TLR-3-positive human neurons to become strong producers of beta interferon. *J Virol* **79**, 12893-904.
- Prud'homme G. J. (2000) Gene therapy of autoimmune diseases with vectors encoding regulatory cytokines or inflammatory cytokine inhibitors. *J Gene Med* **2**, 222-32.

- Pujol N., Link E. M., Liu L. X., Kurz C. L., Alloing G., Tan M. W., Ray K. P., Solari R., Johnson C. D. and Ewbank J. J. (2001) A reverse genetic analysis of components of the Toll signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* **11**, 809-21.
- Pyo H., Jou I., Jung S. and Joe E. (1999) cAMP potentiates beta-amyloid-induced nitric oxide release from microglia. *Neuroreport* **10**, 37-40.
- Quagliarello V. J., Wispelwey B., Long W. J., Jr. and Scheld W. M. (1991) Recombinant human interleukin-1 induces meningitis and blood-brain barrier injury in the rat. Characterization and comparison with tumor necrosis factor. *J Clin Invest* **87**, 1360-6.
- Quevillon S., Agou F., Robinson J. C. and Mirande M. (1997) The p43 component of the mammalian multi-synthetase complex is likely to be the precursor of the endothelial monocyte-activating polypeptide II cytokine. *J Biol Chem* **272**, 32573-9.
- Radek K. and Gallo R. (2007) Antimicrobial peptides: natural effectors of the innate immune system. *Semin Immunopathol* **29**, 27-43.
- Ramsauer M., Krause D. and Dermietzel R. (2002) Angiogenesis of the blood-brain barrier in vitro and the function of cerebral pericytes. *Faseb J* **16**, 1274-6.
- Ransohoff R. M., Kivisakk P. and Kidd G. (2003) Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol* **3**, 569-81.
- Retzius G. (1891) Zur Kenntniss des centralen Nervensystems der Würmer. *Biologische Untersuchungen Neue Folge*, pp . 1-28.
- Rezaie P., Male D., Cairns N. J. and Male D. K. (1997) Expression of adhesion molecules on human foetal cerebral vessels: relationship to colonisation by microglial precursors
Expression of adhesion molecules on human fetal cerebral vessels: relationship to microglial colonisation during development. *Biochem Soc Trans* **25**, 170S.
- Ring A., Weiser J. N. and Tuomanen E. I. (1998) Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. Molecular analysis of a novel bidirectional pathway. *J Clin Invest* **102**, 347-60.
- Robinson M. J., Sancho D., Slack E. C., LeibundGut-Landmann S. and Reis e Sousa C. (2006) Myeloid C-type lectins in innate immunity. *Nat Immunol* **7**, 1258-65.
- Rogers N. C., Slack E. C., Edwards A. D., Nolte M. A., Schulz O., Schweighoffer E., Williams D. L., Gordon S., Tybulewicz V. L., Brown G. D. and Reis e Sousa C. (2005) Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity* **22**, 507-17.
- Rothfuchs A. G., Bafica A., Feng C. G., Egen J. G., Williams D. L., Brown G. D. and Sher A. (2007) Dectin-1 interaction with *Mycobacterium tuberculosis* leads to enhanced IL-12p40 production by splenic dendritic cells. *J Immunol* **179**, 3463-71.

- Ryu J., Pyo H., Jou I. and Joe E. (2000) Thrombin induces NO release from cultured rat microglia via protein kinase C, mitogen-activated protein kinase, and NF-kappa B. *J Biol Chem* **275**, 29955-9.
- Salmaggi A., Gelati M., Dufour A., Corsini E., Pagano S., Baccalini R., Ferrero E., Scabini S., Silei V., Ciusani E. and De Rossi M. (2002) Expression and modulation of IFN-gamma-inducible chemokines (IP-10, Mig, and I-TAC) in human brain endothelium and astrocytes: possible relevance for the immune invasion of the central nervous system and the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Interferon Cytokine Res* **22**, 631-40.
- Salzet M. (2002) Leech thrombin inhibitors. *Curr Pharm Des* **8**, 493-503.
- Salzet M., Chopin V., Baert J., Matias I. and Malecha J. (2000) Theromin, a novel leech thrombin inhibitor. *J Biol Chem* **275**, 30774-80.
- Sanz J. M. and Di Virgilio F. (2000) Kinetics and mechanism of ATP-dependent IL-1 beta release from microglial cells. *J Immunol* **164**, 4893-8.
- Sato S., Gobbel G. T., Li Y., Kondo T., Murakami K., Sato M., Hasegawa K., Copin J. C., Honkaniemi J., Sharp F. R. and Chan P. H. (1997) Blood-brain barrier disruption, HSP70 expression and apoptosis due to 3-nitropropionic acid, a mitochondrial toxin. *Acta Neurochir Suppl* **70**, 237-9.
- Sattelle D. B. and Buckingham S. D. (2006) Invertebrate studies and their ongoing contributions to neuroscience. *Invert Neurosci* **6**, 1-3.
- Savarese E., Chae O. W., Trowitzsch S., Weber G., Kastner B., Akira S., Wagner H., Schmid R. M., Bauer S. and Krug A. (2006) U1 small nuclear ribonucleoprotein immune complexes induce type I interferon in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Blood* **107**, 3229-34.
- Sawada M., Hara N. and Ichinose M. (1992) Interleukin-2 inhibits the GABA-induced Cl⁻ current in identified Aplysia neurons. *J Neurosci Res* **33**, 461-5.
- Sawada M., Suzumura A., Yamamoto H. and Marunouchi T. (1990) Activation and proliferation of the isolated microglia by colony stimulating factor-1 and possible involvement of protein kinase C. *Brain Res* **509**, 119-24.
- Sawyer R. T. (1986) Leech Biology and Behaviour. *Clarendon Press, Oxford, England*.
- Schlee M., Hornung V. and Hartmann G. (2006) siRNA and isRNA: two edges of one sword. *Mol Ther* **14**, 463-70.
- Schluesener H. J., Seid K. and Meyermann R. (1999) Effects of autoantigen and dexamethasone treatment on expression of endothelial-monocyte activating polypeptide II and allograft-inflammatory factor-1 by activated macrophages and

microglial cells in lesions of experimental autoimmune encephalomyelitis, neuritis and uveitis. *Acta Neuropathol (Berl)* **97**, 119-26.

Schluesener H. J., Seid K., Zhao Y. and Meyermann R. (1997) Localization of endothelial-monocyte-activating polypeptide II (EMAP II), a novel proinflammatory cytokine, to lesions of experimental autoimmune encephalomyelitis, neuritis and uveitis: expression by monocytes and activated microglial cells. *Glia* **20**, 365-72.

Schwarz M., Lee M., Zhang F., Zhao J., Jin Y., Smith S., Bhuva J., Stern D., Warburton D. and Starnes V. (1999a) EMAP II: a modulator of neovascularization in the developing lung. *Am J Physiol* **276**, L365-75.

Schwarz M. A., Kandel J., Brett J., Li J., Hayward J., Schwarz R. E., Chappey O., Wautier J. L., Chabot J., Lo Gerfo P., Stern D., Schwarz M., Lee M., Zhang F., Zhao J., Jin Y., Smith S., Bhuva J., Warburton D. and Starnes V. (1999b) Endothelial-monocyte activating polypeptide II, a novel antitumor cytokine that suppresses primary and metastatic tumor growth and induces apoptosis in growing endothelial cells EMAP II: a modulator of neovascularization in the developing lung. *J Exp Med* **190**, 341-54.

Schwarz M. A., Zheng H., Liu J., Corbett S. and Schwarz R. E. (2005) Endothelial-monocyte activating polypeptide II alters fibronectin based endothelial cell adhesion and matrix assembly via $\alpha 5 \beta 1$ integrin. *Exp Cell Res* **311**, 229-39.

Schwarz R. E. and Schwarz M. A. (2004) In vivo therapy of local tumor progression by targeting vascular endothelium with EMAP-II. *J Surg Res* **120**, 64-72.

Sedgwick J. D., Schwender S., Imrich H., Dorries R., Butcher G. W. and ter Meulen V. (1991) Isolation and direct characterization of resident microglial cells from the normal and inflamed central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 7438-42.

Selmaj K., Walczak A., Mycko M., Berkowicz T., Kohno T. and Raine C. S. (1998) Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis with a TNF binding protein (TNFbp) correlates with down-regulation of VCAM-1/VLA-4. *Eur J Immunol* **28**, 2035-44.

Sengupta R., Sahoo R., Mukherjee S., Regulski M., Tully T., Stuehr D. J. and Ghosh S. (2003) Characterization of *Drosophila* nitric oxide synthase: a biochemical study. *Biochem Biophys Res Commun* **306**, 590-7.

Shafer O. T., Chen A., Kumar S. M., Muller K. J. and Sahley C. L. (1998) Injury-induced expression of endothelial nitric oxide synthase by glial and microglial cells in the leech central nervous system within minutes after injury. *Proc Biol Sci* **265**, 2171-5.

Shalak V., Kaminska M., Mitnacht-Kraus R., Vandenabeele P., Clauss M. and Mirande M. (2001) The EMAP II cytokine is released from the mammalian multisynthetase complex after cleavage of its p43/proEMAP II component. *J Biol Chem* **276**, 23769-76.

- Shukaliak J. A. and Dorovini-Zis K. (2000) Expression of the beta-chemokines RANTES and MIP-1 beta by human brain microvessel endothelial cells in primary culture. *J Neuropathol Exp Neurol* **59**, 339-52.
- Si Q., Nakamura Y. and Kataoka K. (2000) A serum factor enhances production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha from cultured microglia. *Exp Neurol* **162**, 89-97.
- Sieling P. A. and Modlin R. L. (2002) Toll-like receptors: mammalian "taste receptors" for a smorgasbord of microbial invaders. *Curr Opin Microbiol* **5**, 70-5.
- Singhrao S. K., Neal J. W., Rushmere N. K., Morgan B. P. and Gasque P. (2000) Spontaneous classical pathway activation and deficiency of membrane regulators render human neurons susceptible to complement lysis. *Am J Pathol* **157**, 905-18.
- Sonetti D. and Peruzzi E. (2004) Neuron-microglia communication in the CNS of the freshwater snail *Planorbium corneus*. *Acta Biol Hung* **55**, 273-85.
- Sonnenfeld M. J. and Jacobs J. R. (1995) Macrophages and glia participate in the removal of apoptotic neurons from the Drosophila embryonic nervous system. *J Comp Neurol* **359**, 644-52.
- Speth C., Dierich M. P. and Gasque P. (2002) Neuroinvasion by pathogens: a key role of the complement system. *Mol Immunol* **38**, 669-79.
- Stahl P. D. and Ezekowitz R. A. (1998) The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr Opin Immunol* **10**, 50-5.
- Stefano G. B., Kahoud J. and Hughes T. K. (1999) Inhibition of microglial egress in excised ganglia by human interleukin 10: implications for its activity in invertebrates. *Acta Biol Hung* **50**, 247-56.
- Stehlik C., Hayashi H., Pio F., Godzik A. and Reed J. C. (2003) CARD6 is a modulator of NF-kappa B activation by Nod1- and Cardiac-mediated pathways. *J Biol Chem* **278**, 31941-9.
- Sterka D., Jr. and Marriott I. (2006) Characterization of nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) protein expression in primary murine microglia. *J Neuroimmunol* **179**, 65-75.
- Sterka D., Jr., Rati D. M. and Marriott I. (2006) Functional expression of NOD2, a novel pattern recognition receptor for bacterial motifs, in primary murine astrocytes. *Glia* **53**, 322-30.
- Stins M. F., Badger J. and Sik Kim K. (2001) Bacterial invasion and transcytosis in transfected human brain microvascular endothelial cells. *Microb Pathog* **30**, 19-28.

- Streit W. J. and Kreutzberg G. W. (1987) Lectin binding by resting and reactive microglia. *J Neurocytol* **16**, 249-60.
- Streit W. J., Walter S. A. and Pennell N. A. (1999) Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol* **57**, 563-81.
- Strober W., Murray P. J., Kitani A. and Watanabe T. (2006) Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol* **6**, 9-20.
- Stuehr D. J. (1999) Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta* **1411**, 217-30.
- Suzumura A., Sawada M., Yamamoto H. and Marunouchi T. (1990) Effects of colony stimulating factors on isolated microglia in vitro. *J Neuroimmunol* **30**, 111-20.
- Tahara K., Kim H. D., Jin J. J., Maxwell J. A., Li L. and Fukuchi K. (2006) Role of toll-like receptor signalling in Abeta uptake and clearance. *Brain* **129**, 3006-19.
- Takeda K., Kaisho T. and Akira S. (2003) Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* **21**, 335-76.
- Takeshita F., Gursel I., Ishii K. J., Suzuki K., Gursel M. and Klinman D. M. (2004) Signal transduction pathways mediated by the interaction of CpG DNA with Toll-like receptor 9. *Semin Immunol* **16**, 17-22.
- Takeuchi O., Hoshino K. and Akira S. (2000) Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to Staphylococcus aureus infection. *J Immunol* **165**, 5392-6.
- Takeuchi O., Kawai T., Muhlradt P. F., Morr M., Radolf J. D., Zychlinsky A., Takeda K. and Akira S. (2001) Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* **13**, 933-40.
- Takeuchi O., Sato S., Horiuchi T., Hoshino K., Takeda K., Dong Z., Modlin R. L. and Akira S. (2002) Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* **169**, 10-4.
- Tan J., Town T., Saxe M., Paris D., Wu Y., Mullan M., Mori T., Suo Z., Crawford F., Mattson M. P. and Flavell R. A. (1999) Ligation of microglial CD40 results in p44/42 mitogen-activated protein kinase-dependent TNF-alpha production that is opposed by TGF-beta 1 and IL-10 Microglial activation resulting from CD40-CD40L interaction after beta-amyloid stimulation. *J Immunol* **163**, 6614-21.
- Tandle A. T., Mazzanti C., Alexander H. R., Roberts D. D. and Libutti S. K. (2005) Endothelial monocyte activating polypeptide-II induced gene expression changes in endothelial cells. *Cytokine* **30**, 347-58.
- Tao-Cheng J. H., Nagy Z. and Brightman M. W. (1987) Tight junctions of brain endothelium in vitro are enhanced by astroglia. *J Neurosci* **7**, 3293-9.

- Tapping R. I. and Tobias P. S. (1997) Cellular binding of soluble CD14 requires lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein. *J Biol Chem* **272**, 23157-64.
- Taylor P. R., Brown G. D., Reid D. M., Willment J. A., Martinez-Pomares L., Gordon S. and Wong S. Y. (2002) The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J Immunol* **169**, 3876-82.
- Teismann P. and Schulz J. B. (2004) Cellular pathology of Parkinson's disease: astrocytes, microglia and inflammation. *Cell Tissue Res* **318**, 149-61.
- Tenner A. J. (1999) Membrane receptors for soluble defense collagens. *Curr Opin Immunol* **11**, 34-41.
- Termeer C., Benedix F., Sleeman J., Fieber C., Voith U., Ahrens T., Miyake K., Freudenberg M., Galanos C. and Simon J. C. (2002) Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med* **195**, 99-111.
- Territo M. C., Ganz T., Selsted M. E. and Lehrer R. (1989) Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils. *J Clin Invest* **84**, 2017-20.
- Ting J. P. and Davis B. K. (2005) CATERPILLER: a novel gene family important in immunity, cell death, and diseases. *Annu Rev Immunol* **23**, 387-414.
- Tong N., Perry S. W., Zhang Q., James H. J., Guo H., Brooks A., Bal H., Kinnear S. A., Fine S., Epstein L. G., Dairaghi D., Schall T. J., Gendelman H. E., Dewhurst S., Sharer L. R. and Gelbard H. A. (2000) Neuronal fractalkine expression in HIV-1 encephalitis: roles for macrophage recruitment and neuroprotection in the central nervous system. *J Immunol* **164**, 1333-9.
- Trajkovic V., Vuckovic O., Stosic-Grujicic S., Miljkovic D., Popadic D., Markovic M., Bumbasirevic V., Backovic A., Cvetkovic I., Harhaji L., Ramic Z. and Mostarica Stojkovic M. (2004) Astrocyte-induced regulatory T cells mitigate CNS autoimmunity. *Glia* **47**, 168-79.
- Tsai B. M., Wang M., Clauss M., Sun P. and Meldrum D. R. (2004) Endothelial monocyte-activating polypeptide II causes NOS-dependent pulmonary artery vasodilation: a novel effect for a proinflammatory cytokine. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **287**, R767-71.
- Tschopp J., Martinon F. and Burns K. (2003) NALPs: a novel protein family involved in inflammation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 95-104.
- Ulvestad E., Williams K., Vedeler C., Antel J., Nyland H., Mork S. and Matre R. (1994) Reactive microglia in multiple sclerosis lesions have an increased expression of receptors for the Fc part of IgG. *J Neurol Sci* **121**, 125-31.

- Underhill D. M., Ozinsky A., Smith K. D. and Aderem A. (1999) Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 14459-63.
- Underhill D. M., Rossmagle E., Lowell C. A. and Simmons R. M. (2005) Dectin-1 activates Syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production. *Blood* **106**, 2543-50.
- Vadeboncoeur N., Segura M., Al-Numani D., Vanier G. and Gottschalk M. (2003) Pro-inflammatory cytokine and chemokine release by human brain microvascular endothelial cells stimulated by *Streptococcus suis* serotype 2. *FEMS Immunol Med Microbiol* **35**, 49-58.
- Van Beek J., Chan P., Bernaudin M., Petit E., MacKenzie E. T. and Fontaine M. (2000) Glial responses, clusterin, and complement in permanent focal cerebral ischemia in the mouse. *Glia* **31**, 39-50.
- van Horssen R., Eggermont A. M. and ten Hagen T. L. (2006) Endothelial monocyte-activating polypeptide-II and its functions in (patho)physiological processes. *Cytokine Growth Factor Rev* **17**, 339-48.
- Viala J., Sansonetti P. and Philpott D. J. (2004) Nods and 'intracellular' innate immunity. *C R Biol* **327**, 551-5.
- Vincent V. A., Tilders F. J. and Van Dam A. M. (1997) Inhibition of endotoxin-induced nitric oxide synthase production in microglial cells by the presence of astroglial cells: a role for transforming growth factor beta. *Glia* **19**, 190-8.
- von Bernhardi R. and Muller K. J. (1995) Repair of the central nervous system: lessons from lesions in leeches. *J Neurobiol* **27**, 353-66.
- von Meyenn F., Schaefer M., Weighardt H., Bauer S., Kirschning C. J., Wagner H. and Sparwasser T. (2006) Toll-like receptor 9 contributes to recognition of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin by Flt3-ligand generated dendritic cells. *Immunobiology* **211**, 557-65.
- Wagner S., Lynch N. J., Walter W., Schwaeble W. J. and Loos M. (2003) Differential expression of the murine mannose-binding lectins A and C in lymphoid and nonlymphoid organs and tissues. *J Immunol* **170**, 1462-5.
- Wang J., Tokarz R. and Savage-Dunn C. (2002) The expression of TGFbeta signal transducers in the hypodermis regulates body size in *C. elegans*. *Development* **129**, 4989-98.
- Wang X., Bae J. H., Kim S. U. and McLarnon J. G. (1999) Platelet-activating factor induced Ca(2+) signaling in human microglia. *Brain Res* **842**, 159-65.

- Weber M., Lange C., Gunther W., Franz M., Kremmer E. and Kolb H. J. (2003) Minor histocompatibility antigens on canine hemopoietic progenitor cells. *J Immunol* **170**, 5861-8.
- Wellings R. P., Lash G. E., Murray J. C., Tas M., Ward W., Trew A. J. and Baker P. N. (1999) Endothelial monocyte-activating polypeptide-2 is increased in pregnancy but is not further increased in preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig* **6**, 142-6.
- Wu P. C., Alexander H. R., Huang J., Hwu P., Gnant M., Berger A. C., Turner E., Wilson O. and Libutti S. K. (1999) In vivo sensitivity of human melanoma to tumor necrosis factor (TNF)-alpha is determined by tumor production of the novel cytokine endothelial-monocyte activating polypeptide II (EMAPII). *Cancer Res* **59**, 205-12.
- Wyllie D. H., Kiss-Toth E., Visintin A., Smith S. C., Boussouf S., Segal D. M., Duff G. W. and Dower S. K. (2000) Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses. *J Immunol* **165**, 7125-32.
- Yadav M. and Schorey J. S. (2006) The beta-glucan receptor dectin-1 functions together with TLR2 to mediate macrophage activation by mycobacteria. *Blood* **108**, 3168-75.
- Yamamoto M., Fukushima T., Ueno Y., Hayashi S., Kimura H., Soma G. and Tomonaga M. (2000) Clinical significance of the expression of endothelial-monocyte activating polypeptide II (EMAPII) in the treatment of glioblastoma with recombinant mutant human tumor necrosis factor-alpha (TNF-SAM2). *Anticancer Res* **20**, 4081-6.
- Yamamoto M., Sato S., Hemmi H., Hoshino K., Kaisho T., Sanjo H., Takeuchi O., Sugiyama M., Okabe M., Takeda K. and Akira S. (2003) Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* **301**, 640-3.
- Yang D., Chen Q., Hoover D., Staley P., Tucker D., Lubkowski J. and Oppenheim J. J. (2003) Many chemokines including CCL20/MIP-3 alpha display antimicrobial activity. *Journal of Leukocyte Biology* **74**, Septembre 2003.
- Yang L. S., Yin Z. X., Liao J. X., Huang X. D., Guo C. J., Weng S. P., Chan S. M., Yu X. Q. and He J. G. (2007) A Toll receptor in shrimp. *Mol Immunol* **44**, 1999-2008.
- Yasuda K., Ogawa Y., Yamane I., Nishikawa M. and Takakura Y. (2005) Macrophage activation by a DNA/cationic liposome complex requires endosomal acidification and TLR9-dependent and -independent pathways. *J Leukoc Biol* **77**, 71-9.
- Yau K. W. (1976) Physiological properties and receptive fields of mechanosensory neurones in the head ganglion of the leech: comparison with homologous cells in segmental ganglia. *J Physiol* **263**, 489-512.
- Yrjanheikki J., Keinänen R., Pellikka M., Hokfelt T. and Koistinaho J. (1998) Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15769-74.

- Yu B., Hailman E. and Wright S. D. (1997) Lipopolysaccharide binding protein and soluble CD14 catalyze exchange of phospholipids. *J Clin Invest* **99**, 315-24.
- Zasloff M. (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**, 389-95.
- Zhang D., Zhang G., Hayden M. S., Greenblatt M. B., Bussey C., Flavell R. A. and Ghosh S. (2004) A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* **303**, 1522-6.
- Zhang F., Endo S., Cleary L. J., Eskin A. and Byrne J. H. (1997) Role of transforming growth factor-beta in long-term synaptic facilitation in Aplysia. *Science* **275**, 1318-20.
- Zhang S. C. and Fedoroff S. (1996) Neuron-microglia interactions in vitro. *Acta Neuropathol (Berl)* **91**, 385-95.
- Zheng M., Schwarz M. A., Lee S., Kumaraguru U. and Rouse B. T. (2001) Control of stromal keratitis by inhibition of neovascularization. *Am J Pathol* **159**, 1021-9.

**PUBLICATIONS
&
COMMUNICATIONS**

Publications

Articles Publiés :

- Tasiemski A., Schikorski D., Le Marrec-Croq F., Pontoire-Van Camp C., Boidin-Wichlacz C., and Sautière PE. Hedistin: A novel antimicrobial peptide containing bromotryptophan constitutively expressed in the NK cells-like of the marine annelid, *Nereis diversicolor*. *Developmental and Comparative Immunology*, Volume 31, Issue 8, 2007, Pages 749-762.
- Grumiaux F., Demuynck S., Schikorski D., Lemièrre S., Vandebulcke F., and Leprêtre A. Effect of fluidized bed combustion ashes used in metal polluted soil remediation on life history traits of the oligochaeta *Eisenia andrei*. *European Journal of Soil Biology*, September 2007.
- Demuynck S., Grumiaux F., Mottier V., Schikorski D., Lemièrre S., and Leprêtre A. Cd/Zn exposure interactions on metallothionein response in *Eisenia fetida* (Annelida, Oligochaeta). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, Volume 145, Issue 4, May 2007, Pages 658-668.
- Demuynck S., Grumiaux F., Mottier V., Schikorski D., Lemièrre S., and Leprêtre A. Metallothionein response following cadmium exposure in the oligochaete *Eisenia fetida*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, Volume 144, Issue 1, September 2006, Pages 34-46.

Articles soumis ou en préparation :

- Schikorski D., Cuvillier Hot V., Leippe M., Macagno E., Salzert M., and Tasiemski A. The medicinal leech as a model for studying the antimicrobial response of the central nervous system
- Schikorski D., Cuvillier Hot V., Salzert M., and Tasiemski A. Molecular cloning and lesional expression of *Hm* Endothelial Monocyte Activating Polypeptide II (*HmEMAP II*) following experimental injury in the nervous system of the medicinal leech *Hirudo medicinalis*.

Communications



- **Schikorski D., Cuvillier Hot V., Salzert M., and Tasiemski A., 2007.**
Molecular cloning and lesional expression of *Hm* Endothelial Monocyte Activating Polypeptide II (*Hm*EMAP II) following experimental injury in the nervous system of the medicinal leech *Hirudo medicinalis*. 11^{ème} journée scientifique de réseau LARC-Neurosciences, Rennes, France, septembre 2007.
- **Schikorski D., Slomianny C., Cuvillier-Hot V., Lefebvre C., Salzert M. and Tasiemski A., 2007.** – Molecular characterization of two antibacterial peptides inducible upon microbial challenge in the nervous system of the medicinal leech; possible implication of a Toll like receptor? *International Congress GRC (Gordon Research Conferences) antibacterial peptides section*. Du 29 avril au 4 mai 2007, Il Ciocco, Lucca (Barga), Italie.
- **Schikorski D., Sautière P.E., Lemarrec-Croq F., Pontoire-Van Camp C., Boidin-Wichlacz C., Tasiemski A., 2006.** - Hedistin: a novel antimicrobial peptide containing bromotryptophans constitutively expressed in the NK cells-like of the marine annelid, *Nereis diversicolor*. 10^{ème} congrès international de l'ISDCI (International Society Of Development and Comparative Immunology). 1-6 juillet 2006, Charleston, South Carolina, USA
- **Demuynck S., Grumiaux F., Mottier V., Schikorski D., Deschamps M. et Leprêtre A., 2005.** – Metallothionein response following cadmium exposure in *Eisenia fetida*. *Congrès SETAC Europe, (15th Annual Meeting)*. 22-26 Mai 2005, Nouveau siècle, Lille.
- **Demuynck S., Grumiaux F., Mottier V., Schikorski D., Deschamps M. et Leprêtre A., 2005.** – Metallothionein response following cadmium exposure in *Eisenia fetida*. *Congrès SETAC Europe, 15th Annual Meeting*. 22-26 May 2005, Nouveau siècle, Lille.
- **Grumiaux F., Demuynck S., Schikorski D., Descamps M. and Leprêtre A., 2002.** - Comparison of two methods of detection of the oligochaeta metallothionein: immunological approach and the use of capillary electrophoresis. *First national meeting of research on the sites and polluted grounds, assessment and perspective*. Conference ADEME, 12/12 and 12/13 2002, Maison de la Chimie, Paris.
- **Demuynck S., Grumiaux F., Schikorski D., Deschamps M. and Leprêtre A., 2003.** - Evaluation of the effects of the LFC ashes addition to soils contaminated by metals on the oligochaeta worm *Eisenia fetida*. *Conference Ministry for Ecology and the Durable Development, French Association for the Grounds Studies, Higher Institute of Agriculture and National Institute of the Agronomic Research. To become and effects of the metal contaminants in the agrosystems and terrestrial ecosystems, Influence of the soils use*. Conference AFES, 03/20 and 03/21 2003, ISA, Lille.
- **Grumiaux F., Demuynck S., Bocquet-Muchembled B., Schikorski D., Deschamps M. and Leprêtre A., 2003.** - Estimate of the metals impact on the soil oligochaetas by detections methods of the metallothioneins. *Conference Ministry for Ecology and the Durable Development, French Association for the Grounds Studies, Higher Institute of Agriculture and National Institute of the Agronomic Research. To become and effects of the metal contaminants in the agrosystems and terrestrial ecosystems, Influence of the grounds use*. 03/20 and 03/21 2003, ISA, Lille.