

Rôle de MIF (Macrophage Migration Inhibitory Factor) dans l'immunité innée et la réponse anti-schistosome chez Biomphalaria glabrata

Alvaro Baeza Garcia

▶ **To cite this version:**

Alvaro Baeza Garcia. Rôle de MIF (Macrophage Migration Inhibitory Factor) dans l'immunité innée et la réponse anti-schistosome chez Biomphalaria glabrata. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2010. Français. NNT : 2010LIL2S030 . tel-00665113

HAL Id: tel-00665113
https://theses.hal.science/tel-00665113

Submitted on 1 Feb 2012

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

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

Université du Droit et de la Santé de Lille
Ecole Doctorale Biologie-Santé
N° d'ordre :

THESE
Pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE II
Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie
Présentée et soutenue publiquement par

Alvaro BAEZA GARCIA
Le 9 NOVEMBRE 2010

Rôle de MIF (Macrophage Migration Inhibitory Factor) dans l'immunité innée et la réponse anti-schistosome chez *Biomphalaria glabrata*

Devant le jury composé de :

Président:	**Professeur El Moukhtar ALIOUAT**
Rapporteurs:	**Docteur Thierry ROGER**
	Docteur André THERON
Examinateurs :	**Professeur Guillaume MITTA**
	Docteur Raymond PIERCE

Centre d'infection et d'immunité de Lille

Université Lille Nord de France-Inserm U1019-CNRS UMR 8204-Institut Pasteur de Lille

Remerciements

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Messieurs les membres du Jury : le Professeur El Moukhtar Aliouat pour présider ce jury, le Professeur Guillaume Mitta pour prendre les fonctions d'examinateur et tout spécialement à Messieurs les Docteurs Thierry Roger et André Théron pour avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse.

A Monsieur le Docteur Raymond Pierce. Merci Raymond pour avoir accepté de prendre la cotutelle de cette thèse, pour ta rigueur dans l'écriture d'un article scientifique et pour nous donner cette liberté que l'on a dans le laboratoire que tu diriges.

A Madame le Docteur Colette Dissous. Colette je ne saurai jamais te remercier des moments passés au labo à parler de science ou des choses de la vie. Merci pour ton enthousiasme, pour tes conseils aiguisés et pour ta façon aussi facile de voir les choses et surtout merci pour m'apprendre ce qu'est la rigueur scientifique. Merci encore.

A Monsieur le Docteur Benjamin Gourbal. Benjamin, lors de mon séjour à Perpignan, j'ai beaucoup appris sur le mollusque et sur le parasite et j'espère un jour pouvoir travailler ensemble, qui sait. Merci aussi pour toutes les manips qui ont permis d'ajouter plus d'intérêt à ce travail.

A Monsieur le Professeur Thierry Calandra pour nous avoir accueillis dans son laboratoire lors de notre visite à Lausanne et pour nous avoir conseillés sagement dans ce monde fascinant de MIF.

S'il y a une personne que je dois remercier, cette personne c'est toi Elvyne. Gracias por haber soportado todos los findes en el laboratorio, mis noches en vela y por haberme animado en los momentos mas dificiles. Si he podido hacer esta tesis es en gran parte gracias a ti.

Gracias a ti también mi peque Unai, por haber soportado mis ausencias y mis presencias delante del ordenador.

Gracias a mis padres por haberme apoyado siempre y haberme dado la oportunidad de realizar estudios y por haber confiado siempre en mi.

J'adresse finalement mes remerciements à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail de thèse.

RESUME

Schistosoma mansoni est un parasite helminthe responsable de la schistosomiase intestinale, qui affecte 200 millions de personnes dans les zones tropicales et subtropicales, et l'on estime que 600 millions de personnes sont exposées au risque de cette infection. Le cycle de vie du parasite est complexe et il requiert un hôte définitif, l'homme et un hôte intermédiaire, un mollusque d'eau douce appelé *Biomphalaria glabrata*. C'est chez le mollusque que le parasite se multiplie de façon massive d'où l'importance du mollusque dans la transmission du parasite à l'homme.

Lors de l'infection le mollusque met en place des réponses cellulaire et humorale très marquées pouvant dans certains cas tuer le parasite. Malgré l'importance du mollusque dans la transmission du parasite à l'homme, les mécanismes moléculaires qui gouvernent ces réponses sont largement inconnus et l'étude de l'immunité du mollusque est donc une priorité en recherche médicale.

Nous avons identifié deux orthologues de la cytokine de mammifère MIF (Macrophage Migration Inhibitory Factor) *Bg*MIF et *Bg*MIF2. En utilisant des approches biochimiques et moléculaires en combinaison avec la technique de RNAi *in vitro* et *in vivo*, nous avons démontré le rôle de *Bg*MIF et *Bg*MIF2 comme régulateurs centraux de l'immunité innée du mollusque. En particulier, *Bg*MIF régule l'activation des hémocytes et la réponse d'encapsulation lors de l'infection. D'autre part, *Bg*MIF2 régule la réponse antibactérienne.

Nos résultats montrent que chez *B. glabrata* il y a une régulation fine de la réponse immune innée et une capacité pour répondre de façon différente lors d'un challenge immunitaire. De plus une régulation par une cytokine de type vertébré dans un invertébré n'avait jusqu'à présent jamais été décrite. Nos travaux établissent les bases pour mieux comprendre les relations hôte-parasite dans une maladie comme la schistosomiase, et constituent aussi une avancée importante du point de vue de l'évolution de l'immunité innée en général.

TABLE DE MATIERES

INTRODUCTION 1

I. IMMUNITE INNEE 2

I.1. Bases moléculaires de la réponse immune chez les vertébrés. 5

• Les Toll-like receptors (TLR). 6

a. Structure des TLR 7

b. Reconnaissance des pathogènes par les TLR 8

c. Voies métaboliques déclenchées par les TLR 9

i) Voie MyD88 dépendante. 9

ii) Voie TRIF dépendante 9

d. Les récepteurs TLR et le contrôle de l'immunité adaptative 10

I.2. Les mécanismes généraux de l'immunité innée chez les invertébrés 11

I.2.1. La réponse cellulaire. 11

a. La phagocytose 11

b. L'encapsulation 12

c. La mélanisation 13

I.2.2. La réponse humorale. 11

I.2.3. La réconnaissance 11

a. Les immunolectines 16

b. Les Thioester-Containing Proteins (TEPs) 17

c. Les Peptidoglycan Recognition Proteins (PGRPs) 19

d. Les Gram Negative Binding Proteins (GNBP) 22

I.3. Les mécanismes moléculaires qui régulent la réponse immune innée chez les invertébrés 23

a. La voie Toll 24

b. La voie Imd 26

c. La voie JAK/STAT 27

I.4. Evidences de processus de diversification et d'adaptation de l'immunité des invertébrés 29

a. Les DsCam chez les insectes..... 29

b. Les VCBP chez Branchiostoma floridae 31

c. Les FREP 32

I.5. Conclusion 34

II. LES CYTOKINES CHEZ LES INVERTEBRES..... 34

II.1. Evidence pour l'existence des cytokines chez les invertébrés..... 35

II.2. Les ressemblances entre IL-1 et Spätzle chez *D. melanogaster*..... 36

II.3. Ressemblances entre les voies TNF et Imd chez D. *melanogaster*..... 37

II.4. Existence de molécules régulatrices de la réponse immune innée..... 39

III. MIF (MACROPHAGE MIGRATION INHIBITORY FACTOR): UN REGULATEUR DE L'IMMUNITE INNEE 40

III.1.Historique. 40

III.2. Structure du gène et de la protéine. 40

a. Structure du gène 40

b. Structure de la protéine. 42

III.3. Activité enzymatique. 43

III.4. Profil d'expression de MIF. 44

III.5. Mode d'action de MIF 45

III.5.1.Activation de la voie de signalisation ERK1/ERK2..... 46

III.5.2. Régulation de TLR4..... 47

III.5.3. Inhibition de l'activité de p53..... 47

III.5.4. Les récepteurs de MIF..... 48

a. CD74..... 48

b. Les récepteurs des chemokines CXCR2 et CXCR4..... 49

III.6. MIF dans l'infection 50

III.6.1. MIF et les infections bactériennes..... 50

III.6.2. MIF et les réponses à autres pathogènes..... 51

III.6.2.1. MIF et les infections par les parasites protozoaires..... 51

a. *Plasmodium*..... 51

b. *Leishmania*.....51

c. *Trypanosoma* 52

III.6.2.2. MIF et les infections par les parasites helminthes.....52

a. *Schistosoma*.....52

b. *Taenia*.....53

c. Nématodes.....53

III.7. Conclusion.....54

IV. *B. glabrata* : UN MODELE POUR L'ETUDE DE L'IMMUNITE INNEE DES INVERTEBRES.....55

IV.1. Le système *B. glabrata/S. mansoni* 56

IV.1.1. Le mollusque *B. glabrata*.....56

IV.1.2. Cycle de vie de *S.mansoni*.....57

IV.1.3. Importance du système *B.glabrata/S.mansoni*.....58

IV.2. Les réponses immunitaires chez *B. glabrata*.....59

IV.2.1.Les réponses cellulaires.....59

IV.2.2. Les facteurs humoraux.....60

IV.2.3. Caractérisation des gènes impliqués dans la réponse immune de *B. glabrata*.....62

IV.3. Etat actuel des connaissances sur l'immunité de *B. glabrata*.....63

IV.4. Conclusion.....65

V. OBJECTIFS DE L'ETUDE SUR LES CYTOKINES MIF CHEZ LE MOLLUSQUE *B.glabrata*.....66

RESULTATS..... 67

I. CARACTERISATION DE L'ACTIVITE ET DE LA FONCTION DE *Bg*MIF 67

II. IMPLICATION DE LA CYTOKINE MIF2 DANS L'IMMUNITE INNEE DU MOLLUSQUE D'EAU DOUCE *B.glabrata* 88

Perspectives dans l'étude de BgMIF2 120

DISCUSSION 121

I. CARACTERISATION DE L'ACTIVITE ET DE LA FONCTION DE *Bg*MIF.....122

I.1. *Bg*MIF possède les caractéristiques d'un membre de la famille MIF 122
I.2. *Bg*MIF est impliqué dans la réponse immunitaire innée du mollusque contre *S. mansoni*..... 123
II. CARACTERISATION FONCTIONNELLE DE *Bg*MIF2..... 126
III. LE SYSTEME IMMUNITAIRE DE *B. glabrata* : UN MODELE D'ETUDE DE L'IMMUNITE DES INVERTEBRES……..130
CONCLUSION ET PERSPECTIVES..... 132
BIBLIOGRAPHIE..... 134

INTRODUCTION

Ce travail de thèse s'intègre dans le projet plus large de l'étude de l'immunité innée et de la réponse antiparasitaire de *Biomphalaria glabrata*, premier hôte intermédiaire de *Schistosoma mansoni*, le parasite trématode responsable de la bilharziose intestinale. Outre l'importance de *B. glabrata* comme vecteur de la schistosomiase, l'étude de l'immunité innée chez ce mollusque a son importance du point de vue évolutif étant donné que la plupart des connaissances sur l'immunité des invertébrés viennent de modèles biologiques comme l'insecte *Drosophila* ou le ver nématode *Caenorhabditis elegans*.

De plus, l'étude de l'immunité des mollusques (Lophotrochozoaires) est d'autant plus importante qu'il semble exister des différences majeures avec ce qui est connu pour l'immunité des insectes et des nématodes (Ecdysozoaires). Un exemple frappant est la découverte récente, chez *B. glabrata*, d'un processus de diversification des molécules de reconnaissance, jusqu'alors inconnu chez les invertébrés. En effet, il existe dans le plasma de *B. glabrata* de nombreuses Fibrinogen-RElated Proteins (FREPs), molécules de la superfamille des immunoglobulines, capables de lier et précipiter des antigènes parasitaires solubles. Le mode de diversification de ces molécules rappelle le système connu chez les vertébrés puisqu'il fait intervenir des mutations ponctuelles et des processus de recombinaison somatique. Ces dernières années, de nombreux efforts ont été réalisés par la communauté scientifique qui s'intéresse à l'immunité de *B. glabrata* dans le contexte de son interaction avec le parasite *S. mansoni*. En effet, le début du séquençage de son génome et les travaux visant la découverte des gènes potentiellement impliqués dans ces interactions, ont permis la caractérisation de plusieurs gènes candidats impliqués dans les relations mollusque/ trématode. Parmi les gènes caractérisés, on trouve celui d'un orthologue de la cytokine de mammifère MIF pour Macrophage Migration Inhibitory Factor, un régulateur central de l'immunité innée chez les vertébrés. La découverte d'un gène orthologue de cytokine de mammifères est d'autant plus importante que jusqu'à présent les seules études de ces molécules chez les invertébrés, étaient basées sur des essais d'immuno-réactivité et n'avaient abouti à aucune caractérisation de séquence. La caractérisation de ce type de molécule chez le mollusque, ouvre ainsi de nouvelles perspectives en ce qui concerne l'immunité des invertébrés, l'évolution des systèmes immunitaires et les relations hôte-parasite.

Au cours de ma thèse (co-financement Région Nord Pas de Calais- Université de Lille2 et la FRM) je me suis intéressé à la caractérisation de l'activité et de la fonction de

BgMIF, la première molécule de ce type décrite chez un mollusque. J'ai démontré que, comme chez les mammifères, BgMIF est capable d'induire la prolifération d'une lignée cellulaire du mollusque (cellules Bge), d'inhiber l'apoptose et qu'il possède une activité dopachrome tautomérase. BgMIF est sécrété par les cellules Bge lors d'un stimulus parasitaire (parasites ou extrait parasitaire) et l'invalidation de son expression par RNAi entraîne une absence d'activation hémocytaire qui se traduit par un nombre plus élevé de parasites implantés dans le mollusque. Tous ces résultats montrent que BgMIF possède les mêmes activités et vraisemblablement les mêmes fonctions que le MIF de mammifères, démontrant la conservation de certains des mécanismes d'immunité innée à travers de l'évolution.

En parallèle à ces études, le criblage des données de séquences disponibles pour *B. glabrata* m'a permis de découvrir une deuxième molécule MIF (appelé BgMIF2) dont j'ai entrepris l'étude. De façon étonnante, j'ai pu démontrer que le profil d'expression et la fonction de BgMIF2 sont différents de ceux de BgMIF1 semblant indiquer une spécialisation de la réponse à des stimuli différents (parasitaire ou bactérien). Ce type de régulation de la réponse immune contrôlée face à un stimulus immunologique ouvre les portes à un nouveau système de régulation jusqu'à présent inconnu chez un invertébré en démontrant une fois de plus que l'immunité des invertébrés n'est pas aussi primitive qu'on le supposait jusqu'à présent.

Dans ce mémoire, je ferai une analyse de l'état actuel des connaissances sur l'immunité innée, avec un chapitre sur les molécules de type TLR qui ont un rôle central dans l'immunité innée des vertébrés, et une analyse plus détaillée sur l'immunité innée des invertébrés. J'aborderai ensuite l'étude de la cytokine MIF et de son rôle comme régulateur de l'immunité innée. Celle-ci sera suivie de la présentation du modèle biologique *B. glabrata* et des résultats obtenus sur la caractérisation de *Bg*MIF1 et *Bg*MIF2 ainsi que d'une discussion sur ces résultats et les perspectives qu'ils ouvrent dans l'étude de l'immunité innée.

I. IMMUNITE INNEE

Tous les métazoaires sont contraints de se défendre contre les pathogènes (bactéries, champignons, virus, parasites). Une première ligne de défense commune à tous les métazoaires est représentée par des mécanismes rassemblés sous le terme générique d'immunité innée, apparue avant la séparation des vertébrés et des invertébrés et qui est considéré comme un système primitif (Medzhitov and Janeway, 1998). L'autre système de défense immunitaire est connu sous le nom d'immunité adaptative. La différence majeure

entre l'immunité innée et l'immunité adaptative concerne en tout premier lieu les mécanismes de reconnaissance des pathogènes ;

- Dans l'immunité innée, la reconnaissance est basée sur l'existence de récepteurs dont la spécificité est génétiquement déterminée et n'est pas variable (PRR pour Pattern Recognition Receptor). Ces récepteurs reconnaissent des motifs structuraux invariants communs au pathogènes, les PAMP (Pathogen- Associated Molecular Pattern). Leur nombre est limité et ne dépasse probablement pas celui d'une ou deux centaines par espèce et leur spectre de reconnaissance est dirigé vers des motifs structuraux absents des cellules de l'hôte. Parmi ces motifs, on peut citer les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries à Gram-négatif, les peptidoglycanes bactériens ou les glucanes de champignons et levures. Ces structures sont communes à de très nombreux pathogènes pour lesquels elles jouent un rôle essentiel dans la physiologie et la survie, rendant peu probable des mutations importantes permettant l'échappement de leur reconnaissance par le système immunitaire inné (Iwasaki and Medzhitov).

- Dans l'immunité adaptative, la reconnaissance se fait grâce à des récepteurs très diversifiés générés par des processus de recombinaisons somatiques pendant l'ontogénèse de chaque individu. Ces recombinaisons sont faites par un système enzymatique appelé RAG (Recombination Activating Genes), (Flajnik and Kasahara., 2010). L'immunité adaptative est probablement apparue il y a environ 450 millions d'années avec l'introduction d'un transposon, portant les précurseurs de RAG, dans la lignée germinale des ancêtres du poisson cartilagineux (Hoffmann et al., 1999). La création de chaque récepteur se fait au hasard au sein de chaque cellule, et si cette cellule produit un récepteur qui reconnaît un pathogène, il y aura une prolifération massive des cellules identiques à la première, et une expansion clonale. Certaines de ces cellules se transforment en cellules mémoire ce qui permettra une réaction plus rapide lors de la réinfection au même type de pathogène. La comparaison des caractéristiques de l'immunité innée avec l'immunité adaptive dans la **Figure 1** souligne les différences principales et montre leur complémentarité, voir leur interdépendance fonctionnelle.

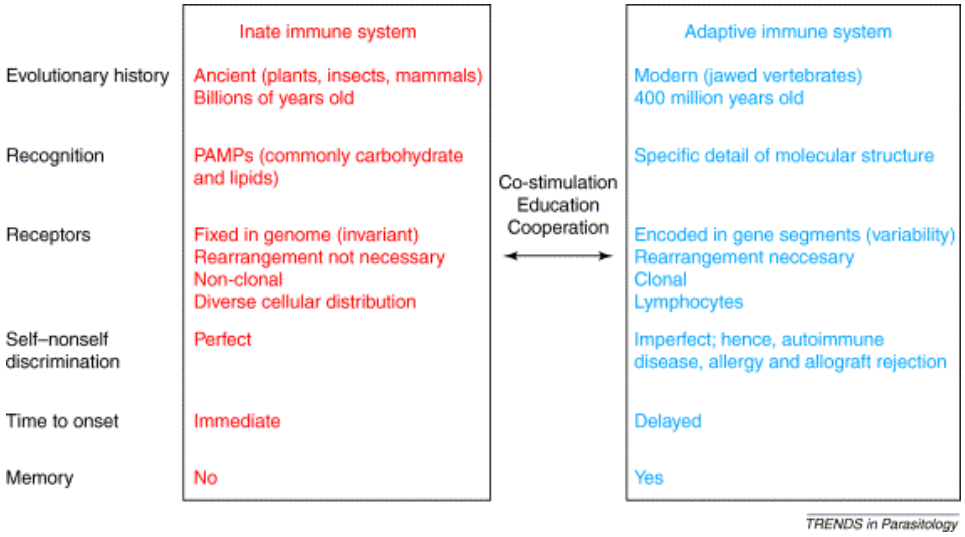


Figure 1. Différences essentielles des réponses immunes innée et adaptative. Malgré l'existence des différences significatives entre les deux types de réponse, leur coévolution mutuelle détermine leur interdépendance fonctionnelle pour assurer des réponses optimales face aux pathogènes. D'après (McGuinness et al., 2003)

Mais aussi précis qu'il soit, le répertoire de l'immunité adaptative n'est pas capable de différencier un agent infectieux d'un agent banal de l'environnement, et la discrimination entre le soi et le non-soi est imparfaite. Par exemple, la mise en place de la réaction de défense, surtout lors de l'expansion clonale, dure entre 3 et 5 jours, ce qui donne largement le temps aux pathogènes de nuire à l'hôte. C'est là que l'immunité innée intervient puisqu'elle est capable de différencier entre le soi et le non-soi et la mise en place de la réponse est très rapide laissant le temps nécessaire pour que la réponse adaptative soit efficace.

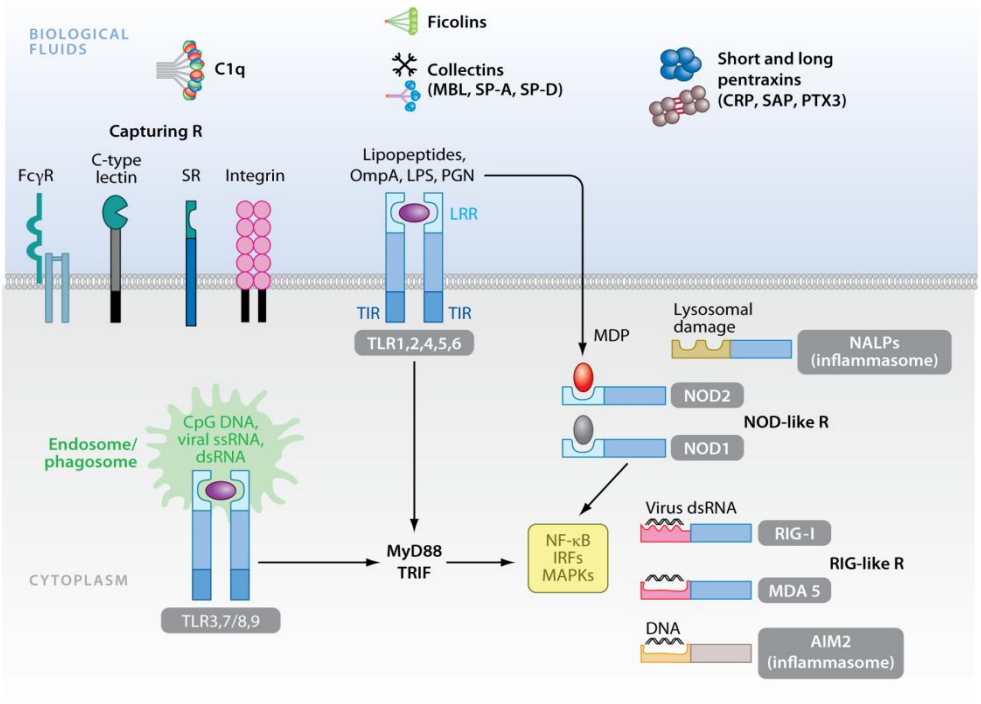
La capacité de développer une réponse immune adaptative n'existe que chez les vertébrés (environ 45000 espèces) et par conséquent les invertébrés (environ 2 millions d'espèces connues) n'auraient que l'immunité innée comme mécanisme de défense. Malgré l'absence de l'immunité adaptative, les invertébrés sont capables de développer des réponses immunitaires efficaces (Loker et al., 2004). Il faut noter que l'absence présumée chez les invertébrés de mécanismes moléculaires, tels que les réarrangements somatiques à l'origine des anticorps chez les vertébrés, a été mise en cause ces dernières années par la découverte des molécules FREPs (Fibrogen Related Proteins) chez *Biomphalaria glabrata* et *Anopheles gambiae* (Zhang et al., 2004), les DsCam chez les insectes ((Watson et al., 2005), (Dong et al., 2006)) ou les VCBP chez *Branchiostoma floridae* (Cannon et al., 2002).

I.1. Bases moléculaires de la réponse immune chez les vertébrés.

Comme nous l'avons évoqué précédemment, les métazoaires sont constamment confrontés à l'interaction avec d'autres organismes protozoaires ou métazoaires, avec lesquels ils engagent une relation d'antagonisme ou de commensalisme. Les voies de signalisation qui gouvernent et différencient ces deux types d'interactions sont utilisées par le système immunitaire, d'une part, pour maintenir l'équilibre entre l'hôte et l'organisme commensal et, d'autre part, pour déclencher les mécanismes de défense dans le cas d'une invasion par des pathogènes (Iwasaki and Medzhitov, 2010).

Chez les vertébrés, il y a deux types d'immunité : l'immunité innée et l'immunité adaptative. L'immunité innée est la première ligne de défense contre une infection par des pathogènes, telle que les bactéries à Gram négatif et positif, les champignons, les parasites ou les virus. Les cellules du système immune inné comme les cellules dendritiques (DCs pour *dendritic cells*) ou les macrophages tuent directement les pathogènes par l'intermédiaire de la phagocytose ou par l'induction des cytokines qui aident à l'élimination du pathogène. La reconnaissance du pathogène par le système immun inné, se fait par l'intermédiaire des PPR. Au niveau cellulaire, l'immunité innée repose sur les DCs, les macrophages et les neutrophiles. De son côté l'immunité adaptative repose sur les lymphocytes de type B et T.

Comme nous l'avons dit précédemment, la reconnaissance d'un pathogène par le système immune inné chez les vertébrés est basée, de la même façon que chez les invertébrés, sur les PRR localisés stratégiquement dans différents compartiments cellulaires ; dans les fluides corporaux, pour les PRR comme les colectines, les ficolines et les pentraxines; ancrés à la membrane cytoplasmatique comme les TLR (Toll Like Receptor), les lectines de type C les SR (scavenger receptors) ou les intégrines; et finalement les PRR qui sont localisés dans le cytoplasme des cellules, comme les RLR (retinoic acid–inducible gene I (RIG-I)–like receptors) et les NLR (nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat–containing receptors). La **figure 2** illustre l'organisation des différents PRR au sein d'un organisme vertébré et montre qu'ils forment un système intégré et complémentaire.



Bottazzi B, et al. 2010.
Annu. Rev. Immunol. 28:157–83

Figure 2. Vue schématique montrant les défenses cellulaires et humorales du système immune inné chez les vertébrés. D'après (Bottazzi et al., 2010).

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons aux TLR pour être les PRR les mieux étudiés. Nous verrons quels sont les différents types de TLR et les PAMPs qu'ils reconnaissent, les cellules les exprimant et les voies qu'ils déclenchent.

• *Les Toll-like receptors (TLR).*

Les récepteurs Toll ont été originalement identifiés dans la mouche du fruit, *Drosophila melanogaster* comme étant impliqués dans la polarité dorsiventrale pendant le développement embryonnaire (Anderson et al., 1985), mais en 1996 Lemaitre et collaborateurs ont démontré leur rôle essentiel dans une réponse immune efficace au champignon *Aspergillus fumigatus* (Lemaitre et al., 1996). Ces études ont permis l'identification des protéines Toll chez l'homme et chez la souris (Medzhitov et al., 1997) et actuellement il y a 10 TLR chez l'homme et 13 chez la souris.

a. Structure des TLR : Ce sont des glycoprotéines membranaires de type I avec un domaine extracellulaire LRR (Leucine-Riche Repeat), un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique TIR (Toll/IL-1 Receptor), (Kumar et al., 2009).

Le **domaine TIR** reçoit son nom de sa ressemblance avec le domaine cytoplasmique du récepteur de l'IL-1(IL-1R) avec lequel il partage trois régions, appelées box 1, 2 et 3, (Akira and Takeda, 2004) (**Figure 3**).

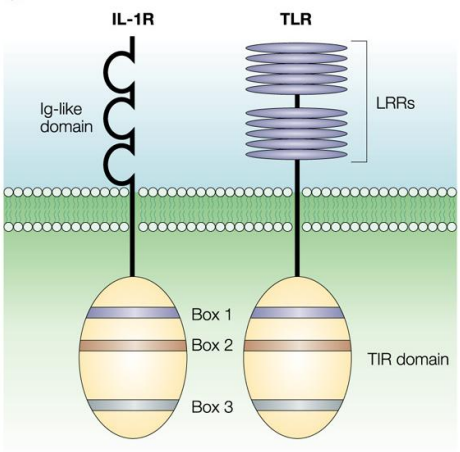


Figure 3. Figure représentant la structure des TLR en comparaison avec celle des IL-1R. Les récepteurs TLR sont composés d'un domaine extracellulaire LRR et un domaine cytoplasmique TIR avec trois régions très homologues à celles du domaine cytoplasmique des IL-1R. Le domaine extracellulaire des TLR est formé par des répétitions en tandem de type LRR, tandis que celui des IL-1R est formé par trois domaines Ig(Immunoglobulines) –like. Modifiée de (Akira and Takeda, 2004).

Les trois régions conservées sont les responsables de la traduction des signaux à travers des récepteurs TLR. L'analyse des structures du domaine TIR des récepteurs TLR1 et TLR2 a montré qu'il est formé par cinq feuilles β centrales entourées de cinq hélices α de chaque côté et connectées par des boucles et ce sont les domaines conservés box 1 et box 2 avec la boucle qui les unit, les responsables de l'interaction avec les molécules adaptatrices qui traduisent le signal (Xu et al., 2000). Ces molécules adaptatrices sont la MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88), la TIRAP [TIR-containing adaptor protein, also known as MAL (MyD88-adaptor-like], la TRIF [TIR-containing adaptor-inducing IFN (interferon)-β, et TRAM (TRIF-related adaptor molecule), (Kumar et al., 2009).

En ce qui concerne le **domaine extracellulaire LRR**, il est formé par 16-28 répétitions en tandem du motif LRR dont la signature est LxxLxxNxL, où L correspond à Leu, Ile, Val ou Phe et N correspond à Asn, Ser ou Cys et X peut être n'importe quel acide aminé (Matsushima et al., 2007). Au niveau structural, les répétitions sont formées par une

feuille β et une hélice α connectées par des boucles. Ce domaine forme une structure sous la forme de fer à cheval dont la partie concave est la responsable de la reconnaissance des pathogènes. Cette reconnaissance se fait à partir de la liaison avec des ligands comme les protéines (flagelline et porine des bactéries), les sucres (le zymosan des champignons), les lipides (LPS (lipopolisaccharide), LTA (acide lipoteichoïque)) des bactéries, les acides nucléiques (DNA contenant des motifs CpG des bactéries et virus, et RNA viral), les dérivés de protéines ou de peptides (lipoprotéines et lipopeptides de plusieurs pathogènes) et le diacyl polipeptide des mycoplasmes. L'union du ligand avec le domaine LRR entraîne la dimérisation du récepteur, pouvant être une hétérodimérisation, comme dans le cas de TLR1 et TLR2, ou une homodimérisation comme pour TLR3 ou TLR4 (Jin and Lee, 2008).

b. Reconnaissance des pathogènes par les TLR: Il existe plusieurs types de TLR en fonction du ligand reconnu, la **Figure 4** représente les différents types des TLR et les ligands qu'ils reconnaissent ainsi que leurs différentes molécules adaptatrices. Les TLR sont exprimés par différents types cellulaires comme les cellules B, les cellules NK (natural killer), les DCs, les macrophages, les fibroblastes, les cellules épithéliales et les cellules endothéliales (Iwasaki and Medzhitov, 2004). Ils sont localisés à des endroits différentes des cellules ; les récepteurs TLR1, TLR2, TLR4, TLR6 et TLR5 sont localisés à la surface des cellules, et les récepteurs TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 sont localisées dans les endosomes (Kumar et al., 2009).

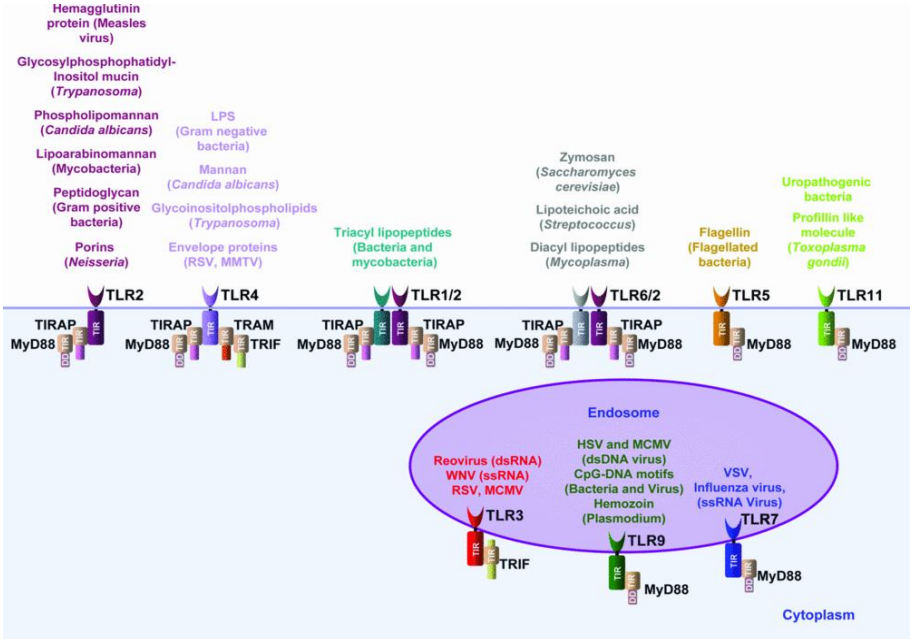


Figure 4. Les récepteurs TLR. Les différents types de récepteurs TLR avec leur localisation dans la cellule, les PAMPs qu'ils reconnaissent et les adaptateurs avec lesquels ils sont associés. D'après (Kumar et al., 2009).

c. Voies métaboliques déclenchées par les TLR : comme nous l'avons déjà évoqué les différents types de TLR s'associent à différents types d'adaptateurs contenant eux-mêmes des motifs TIR, et de cette association va dépendre la voie déclenchée par la reconnaissance du PAMPs. Par exemple, les récepteurs TLR5, 7, 9 et 11 s'associent à la molécule MyD88, les TLR1, 2, 4 et 6 utilisent l'adaptateur TIRAP qui les lie à MyD88 ; le TLR3 utilise seulement TRIF, qui est utilisé aussi par le TLR4 en association avec TRAM. De façon générale les voies de signalisation déclenchées par les TLR4 peuvent être divisées en deux groupes ; les voies MyD88 dépendantes et les TRIF dépendantes, (Akira and Takeda, 2004), (Kumar et al., 2009). Ces voies sont illustrées dans la **Figure 5.**

i) Voie MyD88 dépendante: lorsque le TLR reconnaît son ligand, MyD88 recrût les protéines de la famille IRAK (IL-1 receptor-associated kinase), et TRAF6. A son tour TRAF6 active TAK1 (transforming-growth-factor-β-activated kinase 1), ce qui entraîne la phosphorylation du complexe IKK (IκB kinase), formé par IKKα, IKKβ et NEMO (NF-κB essential modifier), qui phosphoryle IκB qui sera ubiquitinylé et dégradé. Ceci entraîne la libération du facteur de transcription NFκB et sa translocation vers noyau et l'initiation des gènes des cytokines inflammatoires. La transcription des gènes de cytokines est aussi déclenchée par la phosphorylation de la voie MAPK (Mitogen-activated protein kinase) entraînée par TAK1.

ii) Voie TRIF dépendante : lors de la reconnaissance du ligand par le TLR, la voie dépendante de TRIF a plusieurs possibilités. La première entraîne le recrutement de RIP1 et TRAF 6 ce qui provoque l'activation de NF-κB ou de la voie MAPK aboutissant dans la transcription des gènes de cytokines inflammatoires. La deuxième voie possible a lieu lorsque TRIF interagit avec TRAF3 qui active le complexe TBK/IKKi et entraîne la phosphorylation et la dimérisation d'IRF3 et 7 qu'une fois transloqués vers le noyau entraînent la transcription des gènes de IFN (interféron) de type I.

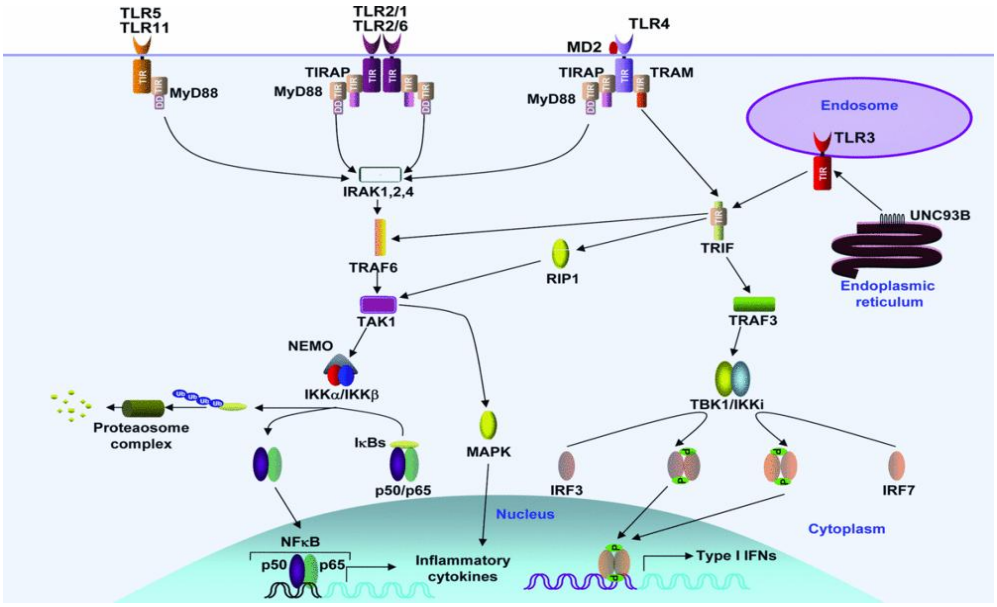


Figure 5. Voies de signalisation entraînées par les TLR. D'après (Kumar et al., 2009).

d. Les récepteurs TLR et le contrôle de l'immunité adaptative : outre la fonction des TLR dans la reconnaissance des PAMPs, l'activation de cytokines inflammatoires, et l'induction des défenses antimicrobiennes ou antiparasitaires, l'activation des DCs par les TLRs est nécessaire pour la maturation des DCs et l'initiation des réponses associées à l'immunité adaptative (Iwasaki and Medzhitov, 2004), (Iwasaki and Medzhitov, 2010). En effet, les DCs sont importantes pour l'activation de lymphocytes de type T et leur différentiation en cellules de type Th1 (T helper type1), Th2 ou cellules T cytotoxiques. Une fois qu'elles ont reconnu l'antigène, elles sont activées et migrent vers les tissus lymphatiques où elles vont présenter les antigènes reconnus et associés au MCHII (major histocompatibility complex class II). Ce processus implique la reconnaissance et la phagocytose du pathogène, l'induction des molécules du MCH et la sécrétion des chémokines. Ces événements sont gouvernés par des PRR exprimés par les DCs parmi lesquels les plus importants sont les TLRs, car la capacité des DCs pour répondre aux différents types de pathogènes est donnée par l'expression de différents types de TLR (Iwasaki and Medzhitov, 2004).

I.2. Les mécanismes généraux de l'immunité innée chez les invertébrés.

La réponse d'un organisme lors d'une infection par un pathogène se fait par l'intermédiaire de la réponse cellulaire et la réponse humorale qui aboutissent à l'activation des gènes de l'immunité.

I.2.1. La réponse cellulaire.

Chez les invertébrés les cellules de défense sont appelées hémocytes et en fonction du type d'invertébré on peut les classifier différemment, par exemple chez les insectes on distingue les prohémocytes, les granulocytes, les plasmatocytes, les spherulocytes et les oenocytoides (Lavine and Strand, 2002). Chez les crustacés on peut distinguer les hyalinocytes, les granulocytes et les semigranulocytes (Taylor et al., 2009). En ce qui concerne les mollusques on peut les classer en hyalinocytes et granulocytes basophiles ou eosinophiles (Goedken and De Guise, 2004), (Martins-Souza et al., 2009), ces mêmes types cellulaires sont également identifiables chez les annélides (Engelmann et al., 2004). Les acteurs majeurs de la réponse cellulaire chez les vertébrés sont les cellules dendritiques, elles détectent des pathogènes directe ou indirectement (à travers des facteurs sécrétés par d'autres cellules immunes, comme les macrophages, les neutrophiles, les granulocytes ou les cellules NK (Natural Killers) en intégrant cette information pour orchestrer la réponse immune (Pulendran et al., 2010). Ces cellules sont les acteurs majeurs de la réponse cellulaire lors de l'infection par un pathogène et elles sont responsables des réponses de défense comme la phagocytose, l'encapsulation et la mélanisation (chez les arthropodes).

a. La phagocytose : est un processus cellulaire très conservé qui a lieu dans tous les métazoaires. C'est un processus très bien étudié chez les leucocytes des mammifères comme les macrophages (Aderem and Underhill, 1999) mais il est moins bien étudié chez les invertébrés d'un point de vue mécanistique. Cependant les études réalisées chez les insectes indiquent que les signaux impliqués dans la régulation de la phagocytose sont conservés entre les invertébrés et les vertébrés (Foukas et al., 1998), (Metheniti et al., 2001). Dernièrement, en utilisant le moustique *Anopheles gambiae* comme modèle le groupe de Kafatos a identifié des régulateurs du processus de phagocytose et des voies de signalisation impliquées (Moita et al., 2005). De façon générale, le processus de phagocytose comprend plusieurs étapes : la reconnaissance des particules étrangères, l'attachement et la formation de pseudopodes,

l'ingestion dans le phagosome, la dégradation par des mécanismes dépendant de l'oxygène par l'intermédiaire de la fusion du phagosome avec les lysosomes et l'élimination des produits de dégradation (**Figure 6**).

b. L'encapsulation : l'encapsulation permet l'élimination de particules de taille supérieure à celle des hémocytes. Elle correspond à une accumulation d'hémocytes disposés en couches concentriques autour du corps étranger, pouvant être des parasites, protozoaires ou nématodes. Une fois que les hémocytes ont reconnu la cible, ils vont former une capsule hémocytaire qui dans le cas des arthropodes sera accompagnée d'une mélanisation. A l'intérieur de la capsule hémocytaire le pathogène est tué par la production des radicaux libres de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS). Chez le mollusque gastéropode *B. glabrata*, lors de l'encapsulation du parasite helminthe *S. mansoni* il y a production de FREPs (Hertel et al., 2005) et de RNS (Hahn et al., 2009a). De la même façon une production de RNS et ROS a été décrite lors de l'encapsulation des guêpes parasitoïdes du genre *Leptopilina* par *Drosophila* (Nappi et al., 1995). Il faut dire que chez les arthropodes la formation de capsule hémocytaire est accompagnée d'une mélanisation (Marmaras and Lampropoulou, 2009), qui n'est pas observée chez les mollusques.

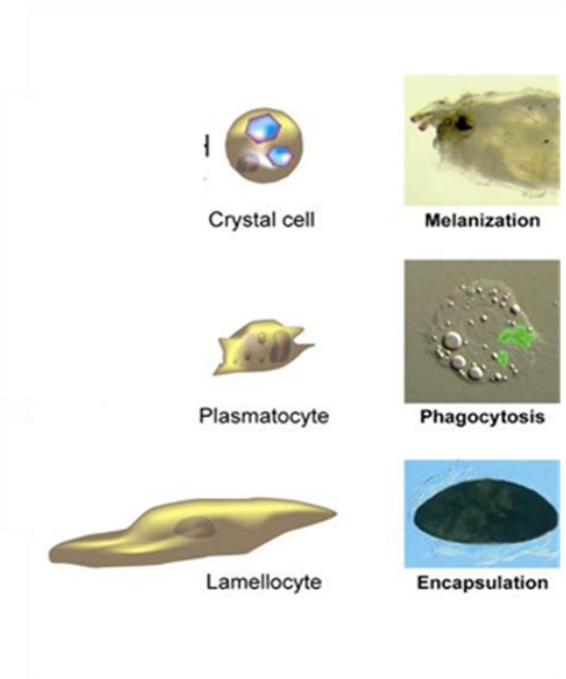


Figure 6. Mélanisation, encapsulation et phagocytose chez *D.melanogaster* et les cellules responsables. Modifiée de (Lemaitre and Hoffmann, 2007)

c. La mélanisation : est un processus spécifique des invertébrés qui a un rôle central dans la défense contre une grande variété de pathogènes et dans la réparation de blessures ainsi que dans la formation de la capsule hémocytaire chez les arthropodes (**Figure 6**). C'est un processus biochimique dans lequel la tyrosine est convertie en dopa par la phénoloxydase (PO) activée. La dopa est ensuite décarboxylée par la dopamine décarboxylase pour former la dopamine ou bien oxydée par la PO pour former la dopaquinone. Ce sont les dérivés métaboliques de la dopamine qui vont intervenir dans la mélanisation (Cerenius et al., 2008) la **Figure 7** décrit le processus d'activation de la pro-phénoloxydase (proPO) chez les crustacés. Le rôle de la mélanisation dans l'immunité est encore controversé ; en effet elle est parfois considérée comme un processus secondaire et de plus il a été démontré que l'activité PO n'est pas nécessaire chez la drosophile pour la résistance aux infections microbiennes (Leclerc et al., 2006) et la mélanisation chez *A. gambiae* n'affecte pas non plus la survie du parasite *Plasmodium falciparum* (Michel et al., 2006).

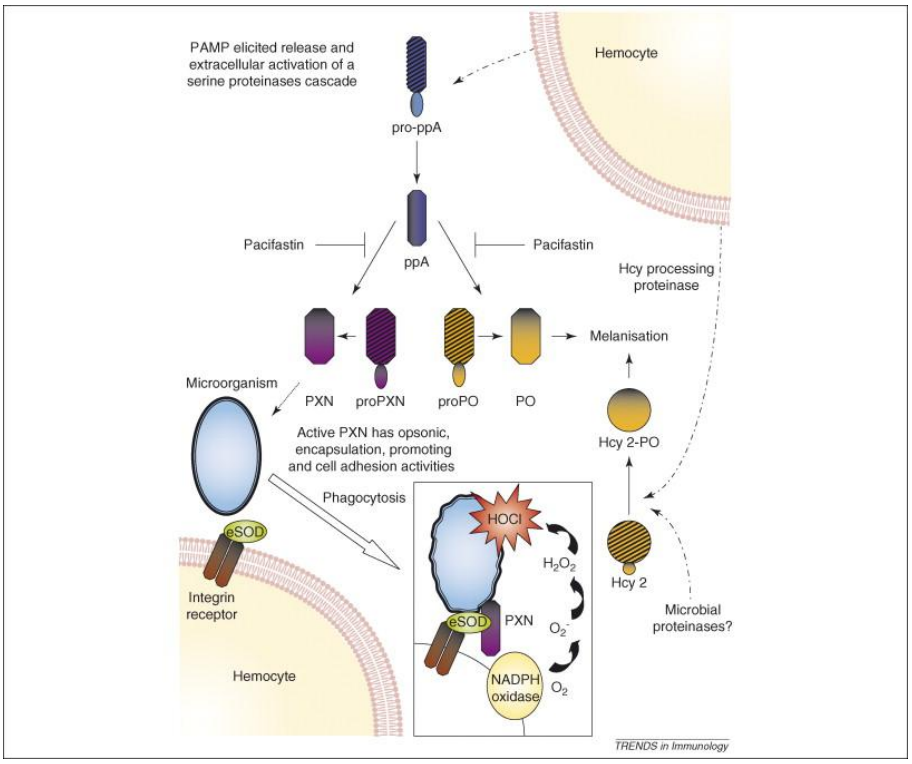


Figure 7. Activation de la pro-phénoloxydase (proPO) qui aboutissent à la formation des dérivés métaboliques de la dopamine qui vont intervenir dans la mélanisation chez les crustacés. Abréviations : ppA (prophenoloxidase-activating enzyme), PXN (peroxinectin), eSOD (extracellular superoxide dismutase), ppA 1 (proPO-activating enzyme) , Hcy2 (plasma hemocyanin 2), PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) D'après (Cerenius et al., 2008)

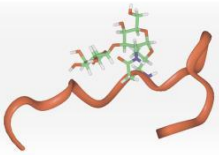
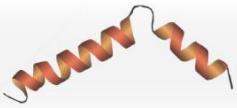
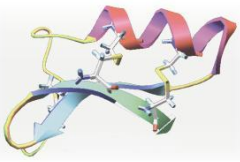
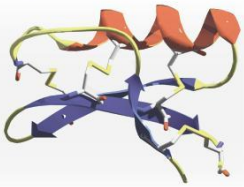
I.2.2. La réponse humorale.

Lors de l'infection par un pathogène, différents facteurs sont produits et excrétés dans les fluides corporels (sang ou hémolymphe). Ce type de réponse appelée humorale diffère entre les vertébrés et les invertébrés.

Chez les mammifères c'est la production des cytokines qui est prédominante. Les cytokines sont des protéines avec un rôle central dans la communication entre les cellules du système immunitaire, elles sont sécrétées et peuvent agir d'une façon autocrine ou bien d'une façon paracrine en affectant les cellules adjacentes ou plus éloignées. Elles favorisent l'inflammation qui est un phénomène comprenant l'augmentation de la perméabilité tissulaire (hyperémie), le recrutement et l'activation des leucocytes et la destruction et reconstruction des tissus. Ces réponses sont orchestrées par les cytokines produites par les cellules de l'hôte qui font face à l'infection, comme par exemple les macrophages (Kimbrell and Beutler, 2001).

Les effecteurs principaux de la réponse humorale chez les invertébrés sont les peptides antimicrobiens, ils ont été étudiés principalement chez les insectes comme la drosophile (Lemaitre and Hoffmann, 2007) mais leur existence a été documentée chez d'autres invertébrés comme les mollusques (Mitta et al., 2000), crustacés (Evelyne et al., 2004) ou nématodes (Millet and Ewbank, 2004). Lors de l'infection il y a une production massive de peptides antimicrobiens produits par les hémocytes et par le corps gras (analogue du foie des mammifères, chez les insectes) et qui sont libérés dans l'hémolymphe. Comme on le verra plus tard cette production est spécifique du pathogène envahissant, de façon à assurer l'efficacité de la réponse, et cette production est régulée de façon assez fine.

Si l'on se réfère toujours à la drosophile, on peut compter jusqu'à 20 peptides antimicrobiens immunoinductibles, que l'on peut grouper en sept classes (**Figure 8**) différentes en fonction de leurs cibles : la diptericine, la drosocine et l'attacine sont très efficaces contre les bactéries à Gram négatif. La défensine est active contre les bactéries à Gram positif tandis que la drosomycine et la metchnikowine sont actives contre les champignons. De son côté la cecropine A1 présente un spectre plus large en reconnaissant des bactéries et des champignons (Lemaitre and Hoffmann, 2007).

Peptides	# of genes	Main activity	Concentration	3-D structure
Diptericin	2	Gram-negative bacteria	0.5 µM	nd
Attacin	4	Gram-negative bacteria	nd	nd
Drosocin	1	Gram-negative bacteria	40 µM	
Cecropin	4	Gram-negative bacteria	20 µM	
Defensin	1	Gram-positive bacteria	1 µM	
Drosomycin	7	Fungi	100 µM	
Metchnikowin	1	Fungi	10 µM	nd

Lemaitre B, Hoffmann J. 2007.
Annu. Rev. Immunol. 25:697–743

Figure 8 Les peptides antimicrobiens de la drosophile. Leurs noms, le nombre de gènes dans le génome, leurs activités antimicrobiennes, la concentration estimée dans l'hémolymphe après l'injection de bactéries et leur structure 3D. D'après (Lemaitre and Hoffmann, 2007)

Le mécanisme d'action des peptides antimicrobiens dépend du type mais de façon générale, ils ont un poids moléculaire assez bas (<10kDa), une charge nette positive ce qui fait qu'ils sont attirés électrostatiquement vers la membrane des pathogènes chargée négativement. Cette interaction permet la liaison des parties hydrophobes du peptide avec l'intérieur lipidique de la membrane, ce qui provoque une déformation de celle-ci. Cette tension est partiellement relâchée lorsque les peptides se déplacent collectivement pour former des pores transmembranaires. Ces pores permettent à d'autres molécules peptidiques et à l'eau d'entrer à l'intérieur du pathogène et de plus empêchent la bactérie de générer de l'énergie métabolique, finalement la combinaison de ces effets mène à la mort du pathogène (Bulet et al., 1999), (Lemaitre and Hoffmann, 2007).

Mise à part l'activité bactéricide des peptides antimicrobiens, des études transcriptomiques et protéomiques récentes ont révélé qu'il y a aussi production d'autres types de peptides et protéines qui font partie d'une réponse humorale. Parmi ces protéines il y

a des régulateurs de la réponse, des composants du système de mélanisation ou du système de coagulation (Levy et al., 2004), (De Gregorio et al., 2001), (Irving et al., 2001),(Vierstraete et al., 2004).

I.2.3. La reconnaissance.

Pour que les réponses cellulaire et humorale aient lieu il est indispensable qu'il y ait une étape de reconnaissance du pathogène. Cette reconnaissance se fait par l'intermédiaire de molécules de reconnaissance appelées PRR (pour Pattern Recognition Receptors). Ces molécules reconnaissent des motifs structuraux présents uniquement sur les pathogènes comme les lipopolysaccharides (LPS), les peptidoglycanes bactériens, les mannanes et les β-(1,3)-glucanes de champignons et levures, les acides désoxyribonucléiques de virus ainsi que les phosphoglycanes de parasites (Kimbrell and Beutler, 2001). Parmi les molécules de reconnaissance les plus étudiées nous pouvons citer les immunolectines, les thioester-containing proteins (TEPs), les Peptidoglycan recognition proteins (PGRPs) et les Gram negative binding proteins (GNBPs). Nous décrirons ci-après ces molécules en nous basant sur les études faites surtout sur les insectes qui sont les invertébrés les plus étudiés.

a. Les immunolectines : ce sont des membres de la superfamille des lectines de type C, qui possèdent un double domaine CRD (carbohydrate receptor domain) et qui sont impliquées dans la liaison Ca^{2+} dépendante des carbohydrates. Elles ont une fonction dans l'adhésion cellulaire, l'élimination des glycoprotéines et se lient aux molécules pathogènes (Zelensky and Gready, 2005). Le séquençage des génomes des invertébrés comme la drosophile et *C. elegans* a montré une grande diversité de ces lectines chez les invertébrés (dans le génome de *C. elegans* les protéines contenant des CTLD (C-type lectin domains) sont les septièmes protéines les plus représentées (Schulenburg et al., 2008)). Cependant peu est connu sur la fonction de CTLD chez les invertébrés. La majorité de CTLD d'insectes sont induites en réponse à une blessure septique. Par exemple, les immunolectines 1 et 2 (IML-1 et IML-2) ont été purifiées de l'hémolymphe des larves de la chenille du tabac *Manduca sexta* infectées avec des bactéries (Yu et al., 2002), on peut citer aussi la protéine BmLBP (Lipopolysaccharide Binding Protein) du ver à soie *Bombyx mori* qui lie le LPS et qui induit la nodulation (Koizumi et al., 1999). Pour les invertébrés non insectes on peut citer la caractérisation d'autres CTLD similaires à celles d'insectes avec une fonction démontrée ou suggérée dans l'immunité innée; par exemple l'incilarine chez les mollusques (Yuasa et al.,

1998), la sélectine de *B. glabrata* (Duclermortier et al., 1999) ou les crustacés (Luo et al., 2003).

b. Les Thioester-Containing Proteins (TEPs): ce sont des composants majeurs de la réponse immune innée des invertébrés comme les insectes, les coraux, les mollusques, les arthropodes et les échinodermes (Nonaka and Kimura, 2006). Les TEP appartiennent à la famille des protéines contenant un domaine thioester (TE) et ce sont des homologues des facteurs du système du complément C3/C4/C5 et des membres de la famille des α2-macroglobulines (α2M), des inhibiteurs universels des protéases chez les vertébrés ((Dodds M and Law S, 1998), pour revue). Le système du complément chez les vertébrés comprend environ 35 protéines sériques et de surface intervenant dans une cascade qui aboutit à l'opsonisation des pathogènes (bactéries ou parasites) et des réponses inflammatoires. Il y a trois voies différentes qui aboutissent à l'activation du système du complément, commençant toutes par la reconnaissance et la liaison des facteurs solubles à la surface de l'hôte (**Figure 9**):

1. La **voie classique** initiée par l'union de la collectine C1q aux complexes anticorps-antigène.
2. La **voie lectine** qui est initiée par l'union de la lectine MBL (mannan-binding protein) au mannose et à d'autres motifs sucrés présents à la surface des microorganismes.
3. La **voie alternative** déclenchée par l'hydrolyse du facteur du complément C3 qui se lié aux surfaces des pathogènes.

Toutes ces voies déclenchent des cascades protéolytiques qui aboutissent à l'activation du facteur C3 en permettant la génération d'une série de molécules qui assurent les principales fonctions du système du complément, on peut citer par exemple;

1. Les anaphylatoxines C3a, C4a et la C5a dérivées des facteurs C3, C4 et C5, déclenchent l'inflammation et le recrutement des phagocytes vers le lieu d'infection.
2. Le fragment C3b résultant de la protéolyse de C3 qui facilite l'opsonisation de la surface des microorganismes en amorçant la formation du complexe formé par les facteurs C5-C9 qui forment un pore dans la membrane du pathogène en provoquant ainsi la lyse cellulaire.
3. Le fragment iC3b résultant du clivage de C3b par le facteur I et qui se lie aux surfaces des pathogènes par l'intermédiaire de son domaine TE, et qui est reconnu par les récepteurs du complément et facilite le recrutement des pathogènes par phagocytose.

4. Des produits de la dégradation de iC3b contenant un fragment C3d attaché à la surface cible et qui sont reconnus par les récepteurs du complément et activés par les lymphocytes B, les α2M et qui fonctionnent comme des inhibiteurs de protéases.

En ce qui concerne l'activation des molécules TEP des invertébrés le système pour lequel elles sont activées n'est pas très bien connu. Cependant un modèle a été proposé pour la TEP1 du moustique *A. gambiae* (Blandin et al., 2008) ; à la différence du facteur C3, TEP1 serait sécrété sous la forme d'une seule chaîne dans l'hémolymphe et il ne serait pas clivé par une convertase spécifique mais par une protéase car elle contient une région avec plusieurs sites potentiels de clivage pour un grand nombre de protéases (**Figure 5**).

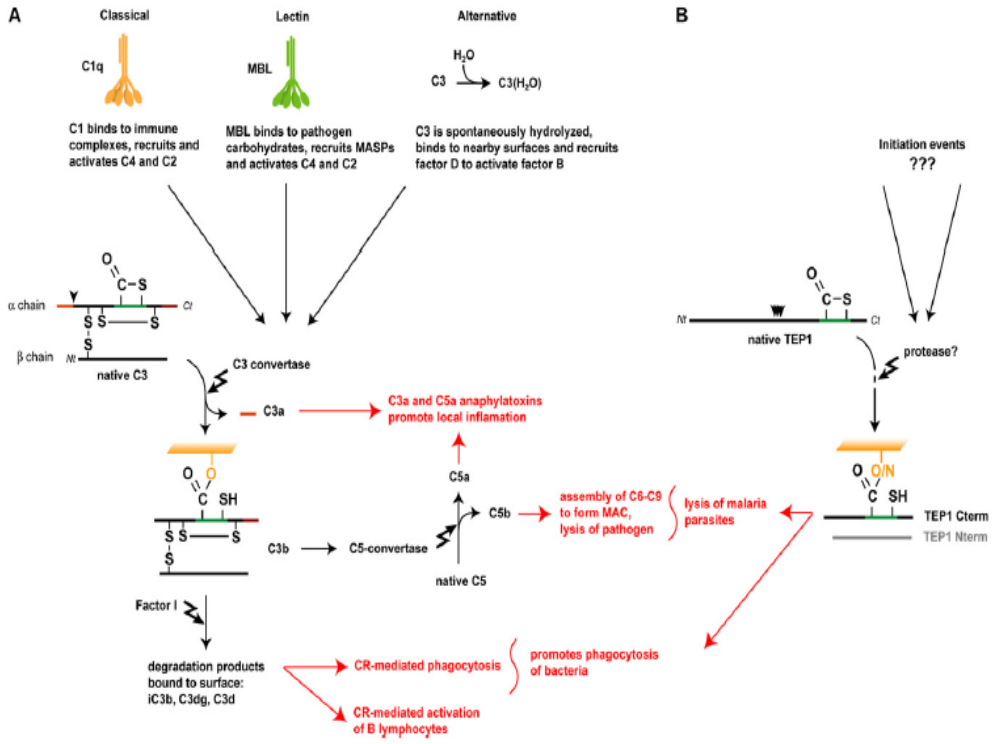


Figure 9. Ressemblance entre le système du complément des vertébrés (A) et celui des moustiques (B). A la différence de C3, TEP1 est sécrétée dans l'hémolymphe du moustique sous la forme d'une seule chaîne et elle est dépourvue d'un domaine anaphylatoxine et vraisemblablement elle est clivée par une protéase. De la même que C3, TEP1 est capable d'opsoniser des bactéries à travers de sa liaison par la partie C-term et a besoin du site TE. D'après (Blandin et al., 2008)

Au niveau structural, les TEP ont des caractéristiques du facteur C3 du complément des vertébrés et des alpha-2-macroglobulines (α_2M). Il existe une grande conservation entre le facteur C3 et les TEP, des résidus clés impliqués dans l'attachement covalent aux surfaces des

bactéries qui est dépendant d'une liaison thioester et qui va permettre la phagocytose (Levashina et al., 2001). Il a été proposé que chez l'anophèle la TEP lie les bactéries à Gram négatif et à Gram positif (*E. coli* et *S. aureus*), et a un rôle déterminant dans la reconnaissance et l'élimination de *Plasmodium berghei* (Blandin et al., 2004).

La localisation des protéines TEP dans les tissus varie entre les différentes espèces. Par exemple, chez les mammifères la synthèse et la sécrétion de C3 et des α2M se fait principalement au niveau du foie et plus de 90 % sont produits par les hépatocytes (Tilo et al., 1983). Dans le cas des invertébrés, les hémocytes sont considérés comme étant la première source de synthèse de TEP et de l'α_2M comme chez l'oursin (Al-Sharif et al., 1998), le moustique (Levashina et al., 2001), les crustacés (Lin et al., 2007), (Vaseeharan et al., 2007) et les tuniciés (Raftos et al., 2004). Par contre d'autres localisations sont possibles comme par exemple une expression dans l'hépatopancréas, l'intestin ou par exemple chez la drosophile une forte localisation dans le corps gras (Lagueux et al., 2000) l'équivalent fonctionnel du foie des mammifères. De manière générale l'expression des protéines TEP est induite lors d'une infection par un pathogène.

L'homologie existant entre les composants du système du complément et les TEP et α_2M indique clairement leur origine ancestrale commune et une séparation qui aurait pu avoir lieu avant la division entre protostomes et deutérostomes, ce d'après l'analyse de la séquence de cnidaires (Dishaw et al., 2005).

c. Les Peptidoglycan Recognition Proteins (PGRPs) : Ce sont des molécules qui contiennent un domaine de liaison au peptidoglycane similaire aux amidases de type 2 des bactériophages et bactéries. Les insectes ont plusieurs gènes codant des PGRP classifiés, selon la longueur des transcrits, en PGRP-L (pour *Long*) ou PGRP-S (pour *Short*), et ils sont très souvent soumis à un épissage alternatif donnant jusqu'à 19 protéines différentes (Håkan, 2004). Les PGRPs sont aussi présentes chez les mollusques, echinodermes et vertébrés mais les plantes et les métazoaires les plus primitifs, comme le nématode *C. elegans* n'en possèdent pas (Dziarski and Gupta, 2006). Chez les mammifères quatre gènes PRGPs avaient été nommés initialement PGRP-S, PGRP-L, PGRP-Iα et PGRP-Iβ (*Intermediate*) par analogie aux PGRP des insectes (Liu et al., 2001), (Dziarski and Gupta, 2006) (**Figure 10**).

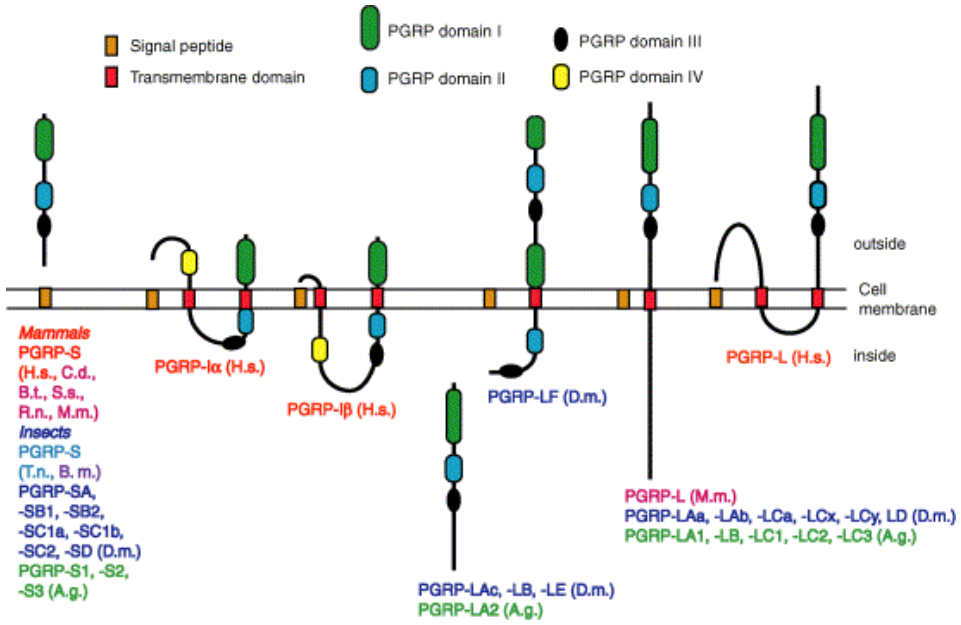


Figure 10. Les protéines PGRP d'insectes et de mammifères: domaines et localisations cellulaires prédites
D'après (Dziarski, 2003).

Au niveau structural la plupart des PGRP sont constituées d'un domaine amidase de type 2 dans la partie carboxy-terminale longue d'environ 165 acides aminés, ce domaine est aussi appelé domaine PGRP et il est très bien conservé dans toutes les protéines PGRP avec 42% d'identité et 55% de similarité. Les PGRP-S sont composées de 200 acides aminés et possèdent un peptide signal et un domaine PGRP d'environ 18-20 kDa. Les PGRPL sont au moins deux fois plus grandes et possèdent un domaine PGRP plus une séquence amino terminale de longueur variable et qui est unique pour chaque PGRP donnée. Il existe aussi des PGRP avec un domaine transmembranaire comme les PGRP-LC de *Drosophila*, tandis que la plupart des PGRP possèdent soit un peptide signal et sont sécrétées, ou n'ont pas de peptide signal et sont intracellulaires (Dziarski, 2003) (**Figure 6**).

Les PGRP sont exprimées dans les organes immunocompétents. Par exemple, les PGRP-S d'insectes sont exprimées dans l'hémolymphe et dans la cuticule et par les cellules du corps gras, les cellules de l'épiderme, l'estomac et par les hémocytes. Les PGRP-L sont exprimées principalement par les hémocytes et certaines sont retrouvées dans l'hémolymphe. Les PGRP sont des molécules effectrices avec des fonctions dans la reconnaissance et la signalisation qui sont importantes pour l'immunité innée antimicrobienne. Par exemple, trois PGRP de la drosophile ; PGRP-SA, PGRP-SD, et PGRP-SC1 reconnaissent des peptidoglycanes bactériens et activent la voie Toll, en réponse à des bactéries à Gram positif

et aussi aux champignons *(cf. Chapitre I.2. Les mécanismes moléculaires qui régulent la réponse immune innée)* (**Figure 11 a**).

L'activation de PGRP-LC de *Drosophila* par les bactéries à Gram négatif déclenche une autre voie de signalisation, la voie Imd (pour Immunodeficiency) *(cf. Chapitre I.2. Les mécanismes moléculaires qui régulent la réponse immune innée* (**Figure 11 b**). Chez le moustique *A. gambiae* il a été démontré que la taille des populations de bactéries symbiotiques et leur prolifération après un repas sanguin par les moustiques femelles sont contrôlées par des PGRPLC. De plus ces mêmes travaux ont montré que cette réponse de défense module l'intensité de l'infection des moustiques par l'agent responsable du paludisme, *Plasmodium falciparum* (Meister et al., 2009).

Les PGRP-S du ver à soie (*Bombyx mori*) et du ver de farine (*Tenebrio molitor*) sont présents dans l'hémolymphe et dans la cuticule et se lient aux bactéries et aux lysines des DAP- peptidoglycanes, en activant la cascade de la prophenol-oxidase. Cela génère la production de produits antimicrobiens tels que la mélanine et des ROS (**Figure 11 c**).

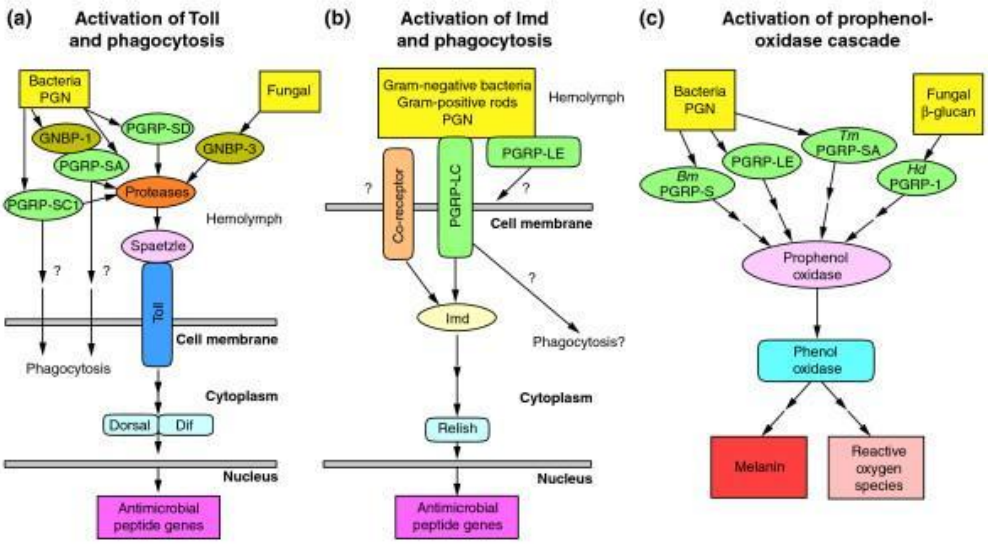


Figure 11. Fonctions des PGRP d'insectes. Différentes voies métaboliques déclenchées par les PGRP d'insectes, a) Voie Toll b) Voie Imd et c) Cascade de la prophénol-oxidase. Les deux premières voies aboutissent à la production de peptides antimicrobiens et la troisième aboutisse à la mélanisation et à la production des ROS. D'après (Dziarski and Gupta, 2006).

d. Les Gram Negative Binding Proteins (GNBP): la GNBP du ver à soie, *B. mori*, a été la première protéine de ce type identifiée ; elle avait été décrite comme une protéine se liant à la paroi cellulaire des bactéries à Gram négatif (Lee et al., 1996). Les GNBP sont formées par un domaine N-terminal de liaison au β-1, 3 glucane et un domaine C-terminal β-1, 3 glucanase-like qui ressemble à celui de la protéine β-1, 3 glucanase de *Bacillus circulans* mais l'absence des deux résidus glutamiques du site actif ne permet pas l'activité glucanase. Chez la drosophile il y a trois GNBP différentes (DmGNBP-1, 2-3), DmGNBP-1 existe sous une forme soluble et sous une forme ancrée à la membrane par sa liaison au glycosylphosphatidylinositol (GPI), elle a une grande affinité pour des molécules bactériennes comme le LPS ou le β-1, 3 glucane, tandis qu'aucune affinité n'a été détectée pour le β-1, 4 glucane, peptidoglycane ou chitine (Kim et al., 2000). Il a été aussi démontré que la DmGNBP1 est nécessaire pour l'activation de la voie Toll en réponse à une infection par des bactéries à Gram-positif (Gobert et al., 2003). Un rôle de la DmGNBP-3 dans la reconnaissance fongique a été proposé car les mouches mutantes pour le gène GNBP3 sont sensibles à une infection fongique et incapables d'activer la voie Toll (Gottar et al., 2006).

Chez le moustique *A. gambiae* la famille des GNBP comprend six membres répartis en deux sous-familles A et B (GNBPA1, GNBPA2, GNBPB1, GNBPB2, GNBPB3 et GNBPB4). Les membres de la sous-famille A sont apparentés aux GNBP de la drosophile et de *Bombyx* et les membres de la sous-famille B sont propres à l'anophèle (Christophides et al., 2002). Tous les membres de la famille GNBP de l'anophèle ont un peptide signal ce qui indique que ce sont des protéines sécrétées, et seulement la GNBPA1 possède un domaine transmembranaire en position N-terminale, ce qui suggère qu'il s'agit d'une protéine présente à la surface cellulaire. D'autre part comme la DmGNBP1 (Kim et al., 2000), les GNBPB1, B2 et B3 ont un domaine d'ancrage au GPI, ce qui suggère qu'elles pourraient être secrétées ou relarguées rapidement en présence d'un stimulus immunitaire. En plus les GNBPA1, B1 et B3 contiennent plusieurs sites potentiels de N-glycosylation ce qui indiquerait que ces protéines sont glycosylées, une caractéristique commune des protéines impliquées dans la reconnaissance cellule-cellule et dans l'adhésion (Warr et al., 2008). L'invalidation de ces gènes par RNAi a permis de démontrer que les GNBPA2, B1, B3, et B4 sont impliquées dans une réponse antibactérienne à Gram négatif, tandis que seulement les GNBPB1 et B4 sont impliquées dans une réponse antibactérienne à Gram positif (Warr et al., 2008). La même étude a montré que les GNBPA2, GNBPB3 et GNBPB4 sont également impliquées aussi dans la réponse contre les parasites du genre *Plasmodium*, et plus précisément la GNBPB4 qui est

fortement exprimée lors d'une infection par des bactéries et par le parasite dont le moustique est le vecteur intermédiaire (en effet, lors d'une infection elle a été co-localisée avec le parasite). De plus, cette réponse contre une infection parasitaire est fortement diminuée lorsque le gène *GNBP4* est invalidé par RNAi ainsi que des gènes activés par la voie Imd (Warr et al., 2008). Par ailleurs, cette voie a été décrite comme étant impliquée dans la réponse à l'infection par *Plasmodium* chez le moustique (Osta et al., 2004).

L'existence des GNBP a été récemment mise en évidence chez, le mollusque *B. glabrata* (Zhang et al., 2007). Chez ce mollusque il y a une seule forme de GNBP qui, de façon étonnante, a été prédite comme étant une protéine non sécrétée à la différence des autre GNBP décrites. De plus des analyses bioinformatiques ont prédit que *Bg*GNBP n'aurait pas de domaine d'ancrage au GPI, ce qui impliquerait qu'il s'agisse d'une molécule non liée à la membrane.

Parmi ces molécules de reconnaissance nous n'avons pas cité les molécules impliquées dans la reconnaissance des pathogènes, comme les FREPs (Fibrogen Related Proteins) chez *B. glabrata* et *Anopheles gambiae* (Zhang et al., 2004), les DsCam chez les insectes ((Watson et al., 2005), (Dong et al., 2006)) ou les VCBP chez *Branchiostoma floridae* (Cannon et al., 2002), mais qui sont soumises à des processus de réarrangements par recombinaisons homologues, somatiques à l'origine des anticorps des vertébrés.

I.3. Les mécanismes moléculaires qui régulent la réponse immune innée chez les invertébrés.

L'expression massive des peptides antimicrobiens suite à une infection est régulée au niveau transcriptionnel. Pendant les années 90 a été réalisé le clonage des gènes codant des peptides antimicrobiens comme la Cecropin A1 et la Diptericin chez la drosophile, et des régions promotrices avec des sites de liaison au facteur de transcription NF-κB et des sites de liaison GATA reconnus par le factor Serpent (Tingvall et al., 2001). Ce type de régulation des gènes de l'immunité par l'intermédiaire du facteur NF-κB est bien conservé et a été caractérisé dans plusieurs phyla d'invertébrés, comme les mollusques (Montagnani et al., 2004), les ascidies (Azumi et al., 2003) ou les échinodermes (Hibino et al., 2006). Il est surtout très bien étudié chez les insectes et notamment chez *D. melanogaster*. Il y a trois protéines « NF-κB/Rel-like » codées par le génome de la drosophile. Dorsal et Dif contenant un domaine N-terminal de liaison à l'ADN (acide désoxyribonucléique) de type Rel avec un domaine transactivateur en position C-terminale (Ferrandon et al., 2007). L'autre est la

protéine Relish similaire à la p105 des mammifères qui contient un domaine N-terminal de type Rel et un domaine C-terminal avec trois répétitions inhibitrices de type ankyrine (Ferrandon et al., 2007). Ces trois protéines se fixent aux sites κB des gènes qui codent les peptides anti-microbiens en activant leur transcription (Ferrandon et al., 2007). Il y a d'autres voies comme la voie JAK/STAT qui ne dépendent pas des facteurs de transcription de type Rel.

a. La voie Toll : initialement décrite comme une voie qui avait un rôle dans la mise en place de l'axe dorso-ventral des embryons de *Drosophila* et dans d'autres processus du développement (Belvin and Anderson, 1996). En 1996 il avait été démontré que l'induction de la drosomycine et de façon plus générale la résistance à l'infection par des champignons nécessitait la présence du recepteur transmembranaire Toll et des autres composants de cette voie (Lemaitre et al., 1996). A présent il est admis que la voie Toll contrôle aussi la réponse immune lors d'une infection par des bactéries à Gram positif (Rutschmann et al., 2002). Les composants de cette voie sont la cytokine Spätzle (qui partage des similarités de structure avec le NGF (nerve growth factor)), le récepteur transmembranaire Toll, le complexe TISC (Toll-induced signalling complex) formé par les adaptateurs Tube, MyD88 (Myeloide differentiation primary-response gene) et la kinase Pelle contenant tous les trois un domaine de mort (Death domain), l'homologue d'IκB Cactus et les facteurs de transcription « Rel-like » Dorsal et Dif (Belvin and Anderson, 1996), (Tauszig-Delamasure et al., 2002). L'induction de la voie Toll est déclenchée lorsque des molécules PGRP reconnaissent des bactéries à Gram positif (PGRP-SA, PGRP-SD, GNBP1) ou des β-glucanes des champignons (GNBP3) et activent une cascade protéolytique aboutissant au clivage de la cytokine Späetzle par une SPE (*Spätzle processing enzyme*) (Jang et al., 2006), (Weber et al., 2003). Elle peut aussi être déclenchée par des facteurs de virulence, comme des protéases fongiques, reconnus comme étant des signaux de danger et qui déclenchent des cascades protéolytiques dans lesquelles interviennent des serine protéases comme Persephone (Ligoxygakis et al., 2002), (Chamy et al., 2008). La liaison de la forme clivée et dimerisée de Spätzle, appelée Spätzle C106, au récepteur Toll active la voie de signalisation intracellulaire par le biais du recrutement de MyD88, Tube et Pelle, ce qui aboutit à la phosphorylation de Cactus qui est dégradé par le protéasome, libérant Dif et Dorsal qui subissent une translocation nucléaire et activent la transcription de gènes de la réponse immunitaire comme la drosomycine (Manfruelli et al., 1999), (Meng et al., 1999) (**Figure 12**).

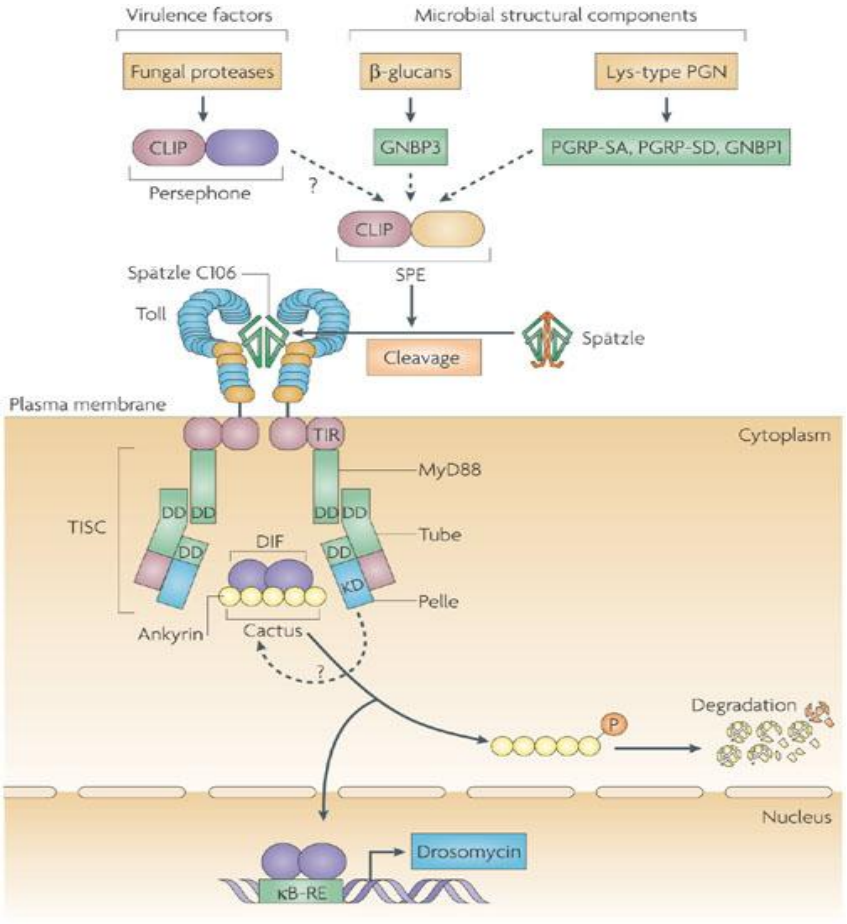


Figure 12. Voie Toll chez *D. melanogaster*. Le récepteur Toll est activé par la cytokine Späetzle clivé par une cascade protéolytique déclenchée par des bactéries à Gram positif ou des champignons. La traduction du signal au niveau intracellulaire nécessite des protéines MyD88, Tube et Pelle. Ceci permet la phosporylation de cactus qui est dégradé, ce qui permet la libération de DIF et Dorsal qui sont transloqués et augmentant la transcription de la drosomycine. D'après (Ferrandon et al., 2007)**.**

Beaucoup des composants de la voie Toll sont eux aussi régulés d'une façon Toll dépendante lors de l'infection (De Gregorio et al., 2002). Il faut noter qu'à la différence des TLRs (Toll-like receptor) des vertébrés, Toll ne fonctionne pas comme un PPR mais qu'il est activé par la cytokine Spätzle. De plus de la même façon que chez les vertébrés le génome de *Drosophila* code jusqu'à huit protéines Toll mais leur implication dans l'immunité n'est pas encore claire (Tauszig et al., 2000). Il faut aussi noter que la voie Toll de *Drosophila* partage de fortes ressemblances avec la voie métabolique de l'IL-1 des vertébrés, ce qui nous laisse penser à l'existence d'un ancêtre commun de ces mécanismes immuns (Hoffmann, 2003). Ce point sera abordé dans le Chapitre II.2.

b. La voie Imd : Cette voie a été initialement découverte grâce à l'identification d'une mutation appelée *immune deficiency* (*imd*) qui diminuait l'expression de plusieurs gènes codant des peptides antimicrobiens mais qui n'affectait pas la production de drosomycine (Lemaitre et al., 1995). Les drosophiles qui portent la mutation *imd* succombent à une infection par des bactéries à Gram négatif mais sont plus résistantes aux infections par des bactéries à Gram positif ou des champignons que les mutants *Toll*. Le gène *imd* code une protéine avec un domaine de mort similaire à celui de la protéine RIP (Receptor Interacting Protein) de la voie métabolique du TNF-R (Tumor Necrosis Factor receptor) des vertébrés. La surexpression du gène *imd* déclenche la transcription des peptides antimicrobiens en l'absence d'une infection (Georgel et al., 2001). Cette voie est déclenchée lorsque le PGRP-LC ou le PGRP-LE forment des multimères en présence de bactéries à Gram négatif et interagissent par l'intermédiaire de leur motif RHIM (RIP homotypic interaction motif) avec la protéine IMD. Celle-ci contrôle la phosphorylation de l'homologue d'IκB, Relish, au travers de l'activation du complexe formé par la kinase TAK1 ((TGF-β)-activated kinase 1) et l'IKK (IκB kinase). Après phosphorylation, IκB est clivée dans son domaine ankyrine par l'homologue des caspases DREDD (death-related ced-3/Nedd2-like protein). Ensuite la sous-unité Rel de Relish, subit une translocation nucléaire et active la transcription de gènes de la réponse immunitaire comme la Diptericine (Ferrandon et al., 2007) (**Figure 13**). Les mouches qui présentent une mutation pour un des gènes impliqués dans cette voie présentent le même phénotype que celles qui possèdent la mutation *imd* et qui sont infectées. Les mouches non infectées sont viables et jusqu'à présent aucune fonction dans le développement n'a été démontrée. La voie Imd présente des similarités avec la voie TNF-R de vertébrés (Hoffmann, 2003) et Chapitre II.3.

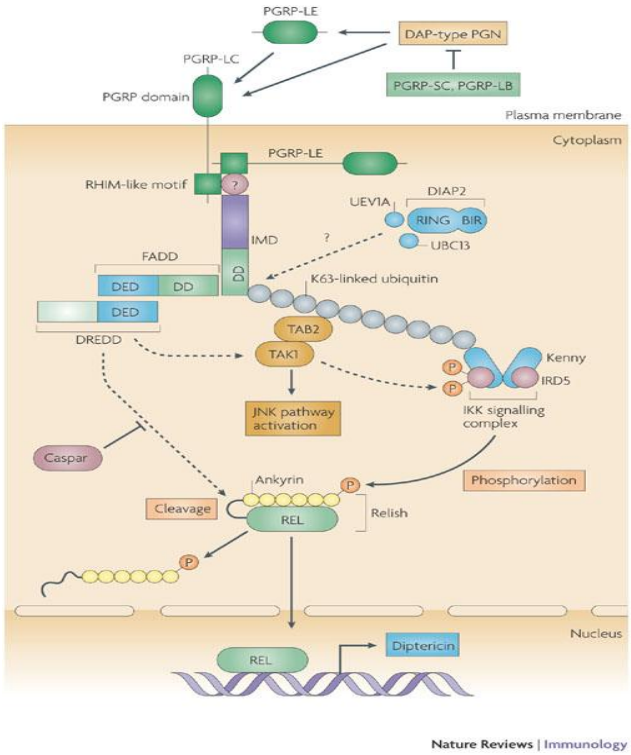


Figure 13. La voie Imd chez *D. melanogaster*. La voie IMD est induite par des bactéries à Gram négatif et positif. La protéine IMD avec un domaine de mort est alors recrutée ce qui induit sa liaison avec FADD et avec DREDD. DREDD s'associe avec Relish dont la partie N-terminale Rel qui se lie à l'ADN, est clivée et transloquée au noyau et en se liant à l'ADN induit la transcription du gène de la Diptérin. D'après (Ferrandon et al., 2007)

c. La voie JAK/STAT : A la différence des voies Toll et Imd qui sont bien caractérisées, les connaissances sur les réponses induites par la voie JAK/STAT sont plus restreintes. Cette voie avait été identifiée d'abord chez les mammifères comme étant une voie cytokine dépendante (Watling et al., 1993) et un acteur clé de la réponse antivirale (Dupuis et al., 2003). La première évidence de l'implication de cette voie dans l'immunité des invertébrés vient des études chez le moustique *A. gambiae* qui démontraient que cette voie est impliquée dans la réponse face à une infection bactérienne (Barillas-Mury et al., 1999). Des études ultérieures ont permis la caractérisation chez *D. melanogaster* des gènes exprimés lors de l'infection et régulés par la voie JAK/STAT (Boutros et al., 2002). Actuellement il est établi que cette voie est impliquée aussi dans une réponse lors d'une infection par les parasites du genre *Plasmodium* (Gupta et al., 2009) et dans la réponse anti-dengue du moustique *A. aegypti* (Souza-Neto et al., 2009) et dans la réponse antivirale chez *D. melanogaster* (Dostert et al., 2005). L'activation de cette voie se fait par la liaison d'une cytokine sécrétée par les

hémocytes et appelée Upd-3(Unpaired), qui se fixe au récepteur de membrane Dome (Domeless) lors de l'infection (Brown et al., 2001), (Agaisse et al., 2003). Cette fixation à Dome entraîne un changement dans sa conformation qui entraîne la phosphorylation de la protéine JAK (Janus Kinase Hopscotch) qui est associée à Dome. Le complexe Dom/Hop induira la phosphorylation du facteur de transcription STAT qui forme un dimère et qui subit une translocation dans le noyau et active la transcription des gènes spécifiques (Arbouzova and Zeidler, 2006) (**Figure 14**). Les gènes dont la transcription est activée sont par exemple le gène codant la protéine du système du complément TEP2 (Lagueux et al., 2000) et des gènes *Turandot* induits par des conditions de stress et spécialement par des blessures septiques (Ekengren et al., 2001).

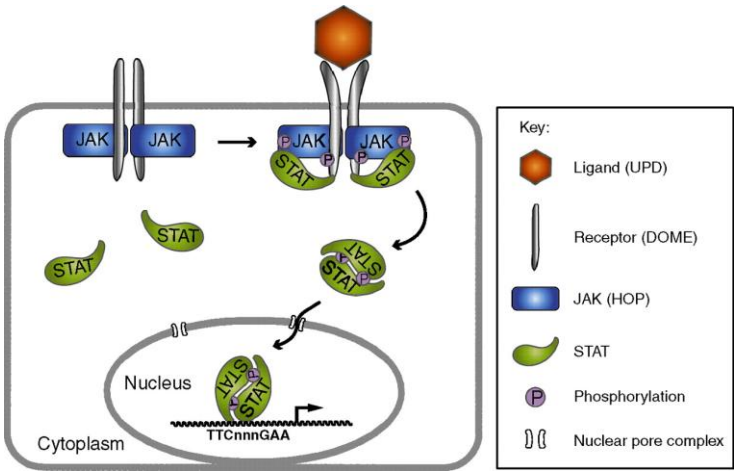


Figure 2. Modèle pour de la voie JAK/STAT.. La liaison du ligand entraine les phosphorylations successives de JAK et du facteur de transcription STAT qui migre vers le noyau et active la transcription de gènes cibles. D'après (Arbouzova and Zeidler, 2006)

Cette voie est donc conservée tout au long de l'évolution et en plus des insectes et des mammifères où elle a été bien caractérisée, des études génomiques ou transcriptomiques ont mis en évidence l'existence de certains partenaires de cette voie chez les crustacés (Liu et al., 2007), chez *C. intestinalis* (Hino et al., 2003) ou encore chez les échinodermes (Hibino et al., 2006).

I.4. Evidences de processus de diversification et d'adaptation de l'immunité des invertébrés.

Le paradigme de Janeway et Medzhitov (Medzhitov and Janeway, 1997) est aujourd'hui remis en cause, par une série de travaux qui mettent en évidence l'existence d'une *mémoire immune* et d'un certain degré de *spécificité* vis-à-vis du pathogène chez les invertébrés.

Deux exemples frappants sont le cas du bourdon *Bombus terrestris* qui est capable de développer une spécificité de réponse lorsqu'il est infecté par deux espèces de bactéries du genre *Paenibacillus* (Sadd and Schmid-Hempel, 2006). Un autre exemple est celui du crustacé copépode *Macrocyclops albidus* et son parasite *Schistocephalus solidus*, chez qui le succès d'une réinfection par le parasite dépend de la ressemblance des antigènes des parasites entre la première et la deuxième infection (Kurtz and Franz, 2003). Les bases moléculaires de cette spécificité ou mémoire ne sont pas connues mais sont en cours d'investigation.

Par contre des études menées sur plusieurs espèces d'invertébrés ont révélé l'existence de mécanismes de diversification des gènes codant des PRR et/ou des effecteurs de la réponse immune. Ces mécanismes permettraient la reconnaissance du variant moléculaire d'un antigène par un variant de PRR et ce de façon spécifique selon un mécanisme de serrure/clé (Schulenburg et al., 2007). Ces gènes hôtes, pour lesquels les systèmes de diversification commencent à être bien connus, sont par exemple les DsCam (Down syndrome cell adhesion molécules) chez les diptères, les FREPS (Fibrinogen-Related proteins) chez les mollusques et insectes, les VCBP (Variable Chitin-Binding Protein) chez *Branchiostoma floridae*.

a. Les DsCam chez les insectes

Comme nous l'avons vu précédemment, le système immunitaire des insectes est activé dès que des PAMP des pathogènes sont reconnus spécifiquement par des PRR. Ces récepteurs de l'hôte vont induire l'élimination du pathogène soit par des réponses cellulaires comme l'encapsulation ou la phagocytose, soit par l'activation des voies de signalisation qui aboutissent à la transcription des gènes immunitaires (Lemaitre and Hoffmann, 2007). Ces mécanismes permettent une défense efficace contre la grande diversité de pathogènes rencontrés sans besoin d'une immunité adaptative. Toutefois, les analyses des génomes de deux espèces de diptères, *D. melanogaster* et *A. gambiae*, ont révélé la présence d'environ 140 à 150 gènes codant des protéines possédant des domaines de type Ig. Les gènes

*Dm*Dscam de *D. melanogaster* (Watson et al., 2005) et son orthologue chez *A. gambiae*, *Ag*Dscam (Dong et al., 2006) ont été bien étudiés. Ils sont en copie unique et codent une molécule transmembranaire avec un domaine extracellulaire de type Ig et fibronectine ainsi qu'un domaine cytoplasmique (**Figure 15**). Chez *D. melanogaster* ce gène a une fonction essentielle dans l'interconnexion neurale, mais il a été démontré qu'il avait un rôle aussi dans la liaison aux microorganismes envahissants et qu'il participe aux processus de phagocytose (Watson et al., 2005). Ce gène comprend 24 exons parmi lesquels l'exon 4 (12 copies), l'exon 6 (48 copies) et l'exon 9 (33 copies) codent différentes parties du domaine Ig et sont variables, entourés par des exons constants. La combinaison des différentes possibilités par un phénomène d'épissage alternatif donne jusqu'à 18000 isoformes pour la partie Ig de ce molécule. Les Dscam sont exprimés dans le cerveau, dans les hémocytes et dans le corps gras des mouches et la diminution de l'expression du gène dans les hémocytes réduit le taux des bactéries phagocytées.

En ce qui concerne le gène *Ag*Dscam, il est formé par 101 exons dont les exons 4, 6 et 10 qui codent le domaine Ig, ont 14, 30 et 38 copies respectivement, ce qui donne 31000 isoformes possibles de cette molécule. Il a été démontré que l'inhibition d'*Ag*DsCam par RNAi dans des moustiques infectés par des bactéries provoque une prolifération accrue de ces bactéries. De la même façon lors d'une infection par *Plasmodium* il y a 65% de plus d'oocystes de *Plasmodium* chez les moustiques où l'expression d'*Ag*DsCam a été inhibée, que chez les moustiques infectés témoins (Dong et al., 2006).

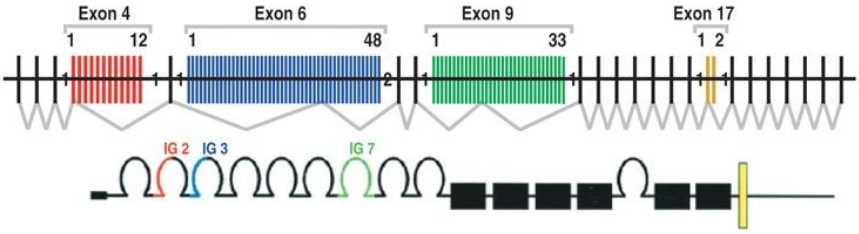


Figure 3. Structure des gènes et des protéines des Dscam de *Drosophila*. Les splicing alternatif ont lieu dans les exons 4, 6, 9 et 17. Modifié de (Watson et al., 2005).

Les Dscam de diptères semblent donc intervenir dans la réponse immunitaire innée, mais de manière spécifique. En effet, chez l'anophèle, la réponse à une infection ne se traduit pas par une augmentation globale des trancrits du gène *AgDscam* mais il y a plutôt une modification de la représentativité de certains exons variables, au sein du répertoire, par épissage alternatif dans la phase aigue de l'infection. De plus, cette modification est

spécifique car des infections par différents pathogènes induisent la production de répertoires différents. Ainsi suite à une infection, le répertoire va s'enrichir en récepteurs possédant certains domaines de type Ig ayant une affinité prononcée vis-à-vis des antigènes d'un pathogène donné (Dong et al., 2006).

Les Dscam sont donc des PRR hypervariables et essentiels du système immunitaire des insectes (au moins diptères). Ils possèdent une plasticité phénotypique leur permettant de s'adapter de façon spécifique à différents spectres de pathogènes. De plus cette diversification se fait au niveau somatique, ce qui révolutionne le paradigme de Janeway et Medzithov selon lequel la diversité des PRR des vertébrés est limitée et codée dans la lignée germinale (Medzhitov and Janeway, 1997).

Dans le contexte plus général de l'immunité des invertébrés ces résultats montrent que comme les vertébrés, les invertébrés utilisent des récepteurs codés dans la lignée germinale spécifiques des PAMP et des récepteurs diversifiés générés par des mécanismes somatiques capables de réagir rapidement au changement antigénique du pathogène (Kurtz and Franz, 2003).

b. Les VCBP chez Branchiostoma floridae

La famille des gènes VCBP (Variable Chitin-Binding Protein) de *B. floridae*, est une famille multigénique codant des protéines avec une région N-terminale variable composée de deux domaines de type Ig-V (domaine protéique variable des immunoglobulines), organisés en tandem, la région C-terminale comprenant un domaine de liaison à la chitine. Ce sont des molécules solubles (non ancrées à la membrane) et exprimées dans l'intestin, (Cannon et al., 2002). Il existe cinq familles de gènes VCBP relativement variables (VCBP 1-5), qui codent des protéines partageant de 27 à 41 % de similarité de séquence en acides aminés. Toutefois, les régions V des VCBP2 et VCBP5 sont très semblables (78%) même si le reste du gène diverge, (Cannon et al., 2004).

Les cinq familles de VCPB sont codées par cinq familles de gènes (*vcbp* 1-5). L'analyse de la région hypervariable des VCBP2, au niveau génomique et au niveau des transcrits, et à partir des animaux de la même région géographique a révélé qu'il y a un polymorphisme de cette région au niveau intra- et interindividuel. Cela signifie que chaque individu dispose d'un répertoire VCBP2 unique codé dans la lignée germinale (Cannon et al., 2004), (Cannon et al., 2002).

En ce qui concerne la fonction de VCBP, il a donc été proposé que la région hypervariable pourrait avoir une fonction sous une forte pression sélective, telle que la reconnaissance d'un pathogène. D'autre part la localisation des transcrits des VCBP de façon spécifique et abondante seulement dans l'intestin qui est un site de passage des pathogènes appuie l'idée d'une fonction immunitaire. Par ailleurs, ces molécules pourraient être bifonctionnelles, d'une part parce qu'il y a une partie hypervariable N-terminale qui présente les caractéristiques des récepteurs de l'immunité adaptative, et d'autre part une partie C-terminale qui possède un domaine de liaison à la chitine qui pourrait jouer un rôle dans l'immunité innée des invertébrés. De plus, la capacité à maintenir un niveau de diversification suffisant de ces récepteurs représente un avantage face aux stratégies d'évitement des pathogènes. Donc ce haut niveau de polymorphisme des récepteurs de l'immunité innée pourrait compenser l'absence de réarrangements somatiques.

c. Les FREP

Les FREPs (Fibrinogen-RElated Proteins) sont une famille de gènes immuns conservés au cours de l'évolution et qui sont présents chez les vertébrés (Matsushita et al., 1996) et les invertébrés (Adema et al., 1997), (Dong and Dimopoulos, 2009). Les protéines codées par ces gènes ont un peptide signal, une région N-terminale composée d'un ou deux domaines de type Ig et une région C-terminale composée d'un domaine fibrinogène (FBG).

Chez le mollusque *B. glabrata* les FREPs sont exprimées à la surface des hémocytes et dans l'hémolymphe (solubles). Actuellement, 13 sous-familles différentes de gènes FREP ont été identifiées chez ce mollusque (Zhang and Loker, 2004). Les séquences complètes de quatre de ces gènes sont connues (*FREP* 2, 3, 4, 7), les gènes *FREP* 2 et 4 possèdent quatre exons et codent des FREP possédant un seul domaine Ig. Le premier exon code un peptide signal, le second et le troisième codent le domaine Ig et le quatrième code le domaine fibrinogène (Léonard et al., 2001). Les gènes *FREP* 3 et 7 présentent une organisation similaire mais ils possèdent 6 exons, et codent des protéines avec 2 domaines Ig (Zhang et al., 2001). La diversité de ces gènes au niveau des domaines FBG et Ig, est manifeste pour la famille FREP3 pour laquelle 45 séquences différentes ont été isolées à partir d'un seul individu (Zhang et al., 2004) (**Figure 16**).

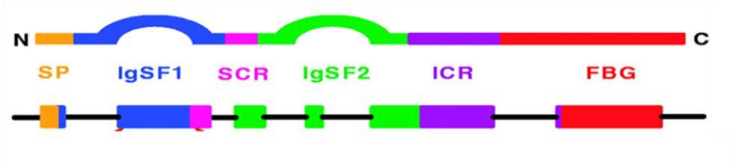


Figure 4. Schéma supérieur : organisation du polypeptide FREP3. **Schéma du bas :** la structure intron-exon du *FREP3*. SP, peptide signal ; IgSF, domaine de la superfamille des immunoglobulines ; SCR, petite région charnière ; ICR, région intercédante ; FBG, domaine fibrinogène. Les couleurs identifient les régions codantes et les domaines des protéines correspondantes. Modifiée de (Zhang et al., 2004)

Les auteurs suggèrent que ce haut niveau de diversification pourrait être généré à partir d'un nombre limité de gènes présents dans la lignée germinale. Ces gènes seraient soumis durant la différenciation des cellules somatiques à des mutations ponctuelles (qui généreraient de nouveaux variants) et des recombinaisons somatiques entre les gènes sources (conduisant à des gènes mosaïques). Cela indiquerait que chaque individu serait capable d'exprimer une certaine diversité de récepteurs à partir d'un nombre limité de gènes présents dans la lignée germinale.

En plus de cette diversité des études ont montré que l'expression des FREPs est induite lors d'une infection par un trématode (Hertel et al., 1994), (Adema et al., 1997) et de façon intéressante des études récentes réalisées avec des parasites, bactéries et levures ont démontré que les FREPs reconnaissent de façon spécifique différents types de pathogènes (Zhang et al., 2008). Cela indique que les FREPs sont impliqués dans la réponse immune du mollusque permettant à celui-ci de reconnaitre plusieurs variantes de pathogènes.

Chez le moustique *A. gambiae* cette famille de gènes est beaucoup plus importante en nombre que chez le mollusque, puisqu'elle possède 59 membres contre 14 de *B. glabrata* ou de *D. melanogaster*. Il a été démontré que le mécanisme d'expansion de ces gènes est le résultat des duplications en tandem du domaine fibrinogène (Dong and Dimopoulos, 2009). La plupart de ces gènes sont exprimés lors d'une infection avec des bactéries, des champignons ou avec le parasite *Plasmodium*. L'utilisation de la technique de RNAi pour l'invalidation des FREPs a permis de démontrer que ces gènes sont essentiels pour l'immunité innée du moustique et pour le maintien de l'homéostasie (Dong and Dimopoulos, 2009).

En conclusion, les FREPs apportent une spécificité au système immun inné des vertébrés. De plus il s'agit du premier exemple de mécanismes somatiques des gènes de l'immunité chez les invertébrés.

I.5. Conclusion

La découverte chez les invertébrés, des mécanismes de diversification des PPR, d'une spécificité de réponse vis-à-vis des pathogènes, et d'une « mémoire » donne une nouvelle perception des capacités de l'immunité innée des invertébrés. En effet, ces mécanismes montrent que les invertébrés, même s'ils sont dépourvus d'une immunité dite adaptative comme chez les vertébrés, sont capables de mettre en place i) une réponse efficace et rapide, ii) une réponse adaptée aux différents types de pathogènes par l'intermédiaire des processus de diversification des PRR régulés d'une façon très fine, et iii) des mécanismes qui permettent d'établir un certain degré de mémoire (Little et al., 2005).

II. LES CYTOKINES CHEZ LES INVERTEBRES

Nous avons vu que lors de l'infection par un pathogène, il y a chez les invertébrés une reconnaissance par des PRR, une réponse cellulaire avec phagocytose, encapsulation et mélanisation et une réponse humorale avec des molécules de reconnaissance qui déclenchent des voies Toll, Imd et JAK/STAT qui aboutissent à la production des peptides antimicrobiens.

Chez les vertébrés, les réponses cellulaires et l'activation des voies TLR et NF-κB sont précédées et suivies par la production de protéines appelées cytokines. Ce sont de petites protéines (≈25kD) qui sont sécrétées par plusieurs types cellulaires, en réponse à une infection ou stimulus de stress, cette sécrétion induisant des réponses cellulaires au travers de la liaison à des récepteurs spécifiques. Les cytokines peuvent agir d'une façon autocrine ou bien d'une façon paracrine en affectant les cellules adjacentes ou plus éloignées. La sécrétion de ces cytokines permettra d'une part de tuer le pathogène et d'autre part de recruter vers l'endroit de l'infection des cellules dendritiques, des leucocytes et en somme de favoriser l'inflammation. Il s'agit d'un phénomène très complexe qui entraîne une augmentation de la perméabilité tissulaire (hyperémie), le recrutement et l'activation de leucocytes et la destruction et la reconstruction des tissus. Ces réponses sont orchestrées par les cytokines produites par les cellules de l'hôte qui font face à l'infection (Kimbrell and Beutler, 2001). Les cellules endothéliales et épithéliales ainsi que les macrophages, neutrophiles et lymphocytes, produisent et sécrètent des cytokines pro-inflammatoires comme IL-1 (interleukine-1), IL-6 (interleukine-6), IL-12 (interleukine-12), TNF-α (tumor necrosis factor). IL-1, IL-6 et TNF-α

activent les hépatocytes du foie, qui produisent des molécules de la phase aigue de l'inflammation. Ces protéines se lient à la surface des pathogènes reconnus ainsi par les neutrophiles et macrophages. Ces cellules phagocytaires, répondent par la sécrétion d'enzymes granulaires et la production des ROS, ce qui vont tuer le pathogène. Cette phase aigue est suivie d'une phase dans laquelle d'autres cytokines comme l'IL-10, le TGF-β (Transformation Growth Factor-β) ou l'IL-13 arrêtent la production des médiateurs pro-inflammatoires et préparent l'immunité adaptative (Riedemann et al., 2003) (**Figure 17**).

Nous avons donc vu que les cytokines sont des acteurs majeurs de la réponse immune innée chez les vertébrés, mais qu'en est-il de l'existence des cytokines chez les invertébrés?

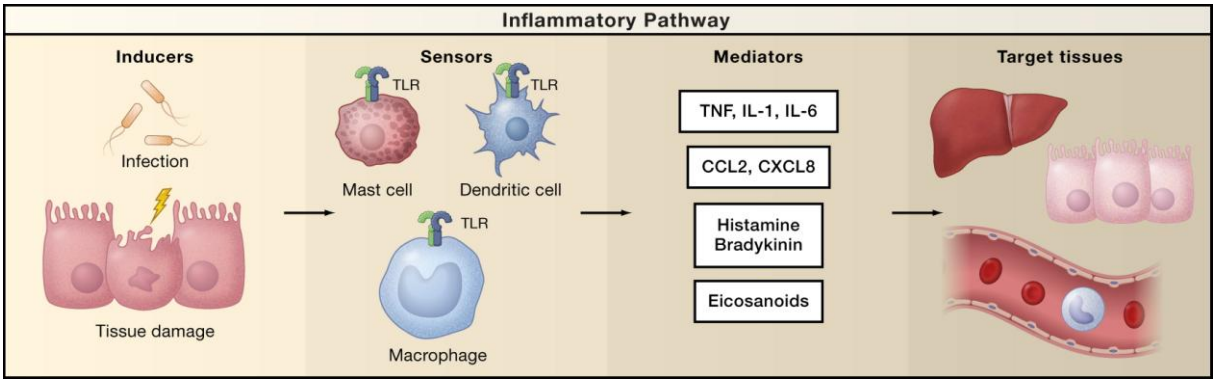


Figure 5. Les étapes du processus inflammatoire. Figure montrant les différentes étapes de la réponse inflammatoire. Les inducteurs (bactéries, champignons, virus ou parasites) vont initier la réponse en étant détectés par les senseurs tels que les TLR exprimés par des les cellules de défense comme les macrophages, cellules dendritiques ou macrophages. Ceci induit la production des médiateurs de la réponse, comme les chemokines, cytokines, histamines ou les molécules du système du complément, qui agissent sur des organes cibles provoquant la vasodilation, l'extravasion des neutrophiles et l'arrivée du plasma aux endroits de l'infection. De leur côté les hépatocytes du foie vont produire des protéines de la phase aigüe comme des facteurs coagulants et qui activent la production des prostaglandines comme la PEG_2. D'après (Medzhitov).

II.1. Evidence pour l'existence des cytokines chez les invertébrés.

Si l'on considère les ressemblances entre les mécanismes de défense innée des vertébrés et des invertébrés, il semble plausible qu'il y ait chez les invertébrés des molécules ayant les mêmes fonctions que chez les vertébrés (Beschin et al., 2001). Les études qui ont tenté de mettre en évidence l'existence de cytokines chez les invertébrés, ont utilisé des approches qui consistaient à évaluer la sensibilité des hémocytes à l'action des cytokines des vertébrés ou bien la réaction des cellules immunitaires de vertébrés aux facteurs des

invertébrés. D'autres travaux ont utilisé des anticorps bloquant les cytokines des vertébrés pour détecter une « réactivité croisée » dans l'hémolymphe, hémocytes ou système endocrine d'invertébrés. Dans certaines études biochimiques, des poids moléculaires ou des pI (point isoélectrique) similaires entre cytokines de vertébrés et des analogues fonctionnels d'invertébrés ont été considérés comme une évidence d'homologie moléculaire.

Etant donné le rôle majeur d'IL-1, IL-6 et TNF-α dans la réponse inflammatoire des vertébrés, ce sont ces cytokines qui ont été les plus recherchées chez les invertébrés. Des molécules portant ces activités ont été détectées chez les annélides, mollusques, insectes échinodermes et prochordés ; une revue exhaustive de tous ces travaux a été faite par Beschin et collaborateurs (Beschin et al., 2001). Globalement ces observations suggèrent que les mécanismes de défense des deutérostomes et protostomes utiliseraient des molécules de type cytokine, mais en absence d'information sur la séquence de ces protéines il est prématuré de dire que ces molécules d'invertébrés partagent des ressemblances phylogénétiques avec leurs homologues chez les vertébrés. Cependant des travaux ont mené à la caractérisation de molécules de type TNF-α et qui sont impliquées dans la réponse immune, chez les crustacés (Mekata et al.), les mollusques (De Zoysa et al.) et les insectes (Igaki et al., 2002). Par ailleurs, chez *D. melanogaster* il a été décrit plusieurs molécules cytokine-like dont on connaît la séquence et même le mode d'action. Nous pouvons citer par exemple la cytokine Spätzle qui est en amont de la voie Toll (Ligoxygakis et al., 2002) ou Eiger l'homologue de TNF-α (Moreno et al., 2002) ou encore la cytokine Upd-3 qui active la voie JAK/STAT (Brown et al., 2001). Il a été proposé chez *Drosophila* un parallèle entre la fonction de Spätzle et IL-1 dans les voies Toll, et un parallèle entre la voie Imd et la voie TNFR, toutes ces voies aboutissant à l'activation de NF-κB (Hoffmann, 2003).

II.2. Les ressemblances entre IL-1 et Spätzle chez D. melanogaster.

Les voies Toll (chez *D. melanogaster*) et TLR (chez les vertébrés) aboutissent toutes les deux à une activation de NF-κB qui passe dans le noyau cellulaire et active la transcription de peptides antimicrobiens et cytokines. Une différence entre ces deux voies est leur mécanisme d'induction, la voie Toll étant activée par la cytokine Späetzle qui a été clivée, et la voie TLR étant activée directement par les PAMP du pathogène. Cependant il faut savoir que l'activation de TLR qui aboutit à la production des peptides antimicrobiens peut être induite par une cytokine. Par exemple, il a été démontré que dans l'épiderme, les cellules de Langerhans ainsi que les monocytes et macrophages répondent au LPS par l'intermédiaire de

TLR4 et produisent de grandes quantités d'IL-1. Cette cytokine induit, après son clivage, une production massive de HBD-2 (human β-defensin-2) dans les kératinocytes avoisinants (Liu et al., 2003). Comme on peut voir dans la **Figure 18**, l'induction de la drosomycine chez *D. melanogaster* lors d'une invasion par des pathogènes est déclenchée par la reconnaissance par exemple de peptidoglycanes. Ceux-ci vont être reconnus par des PGRPs, ce qui induira le clivage de Späetzle en activant la voie Toll et la production de drosomycine. Donc dans les deux cas, la production de peptides anti-microbiens est déclenchée par une cytokine (IL-1 ou Spätzle) ce qui démontre que, sans être des homologues, ces cytokines induisent le même type de réponse en s'activant par clivage (Hoffmann, 2003).

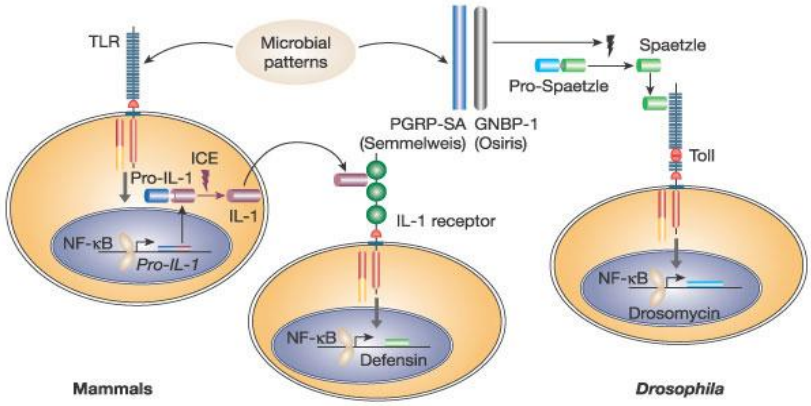


Figure 6. Ressemblances entre les fonctions de l'IL-1 et Späetzle. La reconnaissance d'une infection par des bactéries à Gram positif est faite par les récepteurs TLRs et des cellules immunes chez les mammifères et par des PRR chez *Drosophila* (D'après (Hoffmann, 2003)).

II.3. Ressemblances entre les voies TNF et Imd chez D. melanogaster.

Les voies TNF (chez les vertébrés) et Imd (chez *D.melanogaster*) ont des ressemblances importantes. En effet, plusieurs membres de la voie Imd sont des homologues ou sont très similaires aux acteurs de la voie initiée par la cytokine TNF-α et des récepteurs TNFR chez les vertébrés (FADD ; DREDD/caspase-8, les domaines de mort d'Imd et RIP par exemple). De plus, l'activation de Relish est dépendante de TAK1, l'homologue d'IKK-β et d'IKK-γ (Hoffmann, 2003) (**Figure 19**).

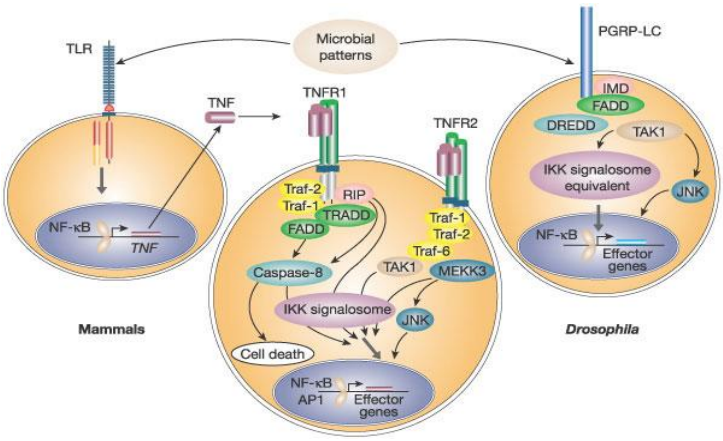


Figure 7. Ressemblances entre les voies TNFR et Imd. La reconnaissance d'une infection avec des bactéries à Gram négatif chez *Drosophila* est faite en partie par le récepteur PGRP-LC qui entraîne l'activation de NF-κB à travers d'une voie de signalisation avec plusieurs molécules homologues aux partenaires de la voie TNFR chez les mammifères. D'après (Hoffmann, 2003).

Cette affirmation est soutenue par la découverte récente d'Eiger, l'homologue du TNF-α chez *D. melanogaster* (Igaki et al., 2002), (Kanda et al., 2002) et de Wengen (Kauppila et al.), qui suggère l'existence d'une voie TNF-like. La susceptibilité des mutants *Eiger* aux bactéries extracellulaires suggèrent que la voie Eiger/Wengen pourrait avoir un rôle dans la réponse immune innée de *D. melanogaster* (Schneider et al., 2007). Le génome de la drosophile code deux facteurs associés au récepteur TNF, Traf1et Traf2 ; l'association de Wengen avec Traf2 active la voie qui mène à l'apoptose et l'association avec Traf1 amène à l'activation de la voie Imd avec la production des peptides anti-microbiens (Cha et al., 2003), (Cristin et al., 2009) (**Figure 20**).

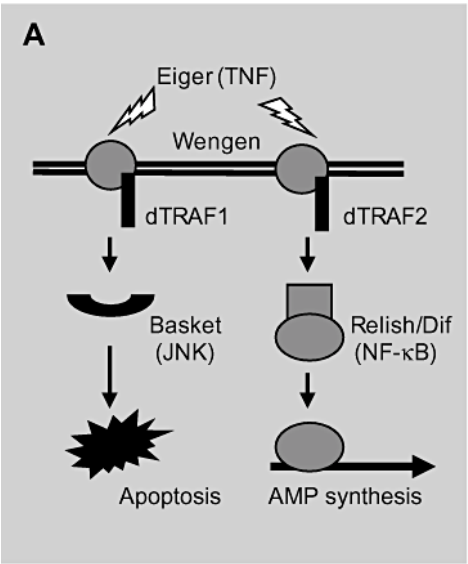


Figure 20. Composants de la voie TNF chez *Drosophila* (modifiée de (Cristin et al., 2009).

II.4. Existence de molécules régulatrices de la réponse immune innée.

Nous pouvons penser que si l'état de connaissance sur la présence ou non de cytokines chez les invertébrés est limité à quelques études peu concluantes et aux connaissances chez *D. melanogaster*, il n'en est pas moins pour celui des molécules qui régulent leur production et en conséquence les réponses immunes. Chez les vertébrés il existe une molécule qui a été décrite comme étant un régulateur de l'immunité innée par sa capacité à induire la production d'un grand répertoire de molécules pro-inflammatoires comme des cytokines, du NO, COX2 et des produits de la voie de l'acide arachidonique tels que la PGE_2 (prostaglandine 2) et plusieurs métalloprotéinases matricielles et leur inhibiteurs : il s'agit de la cytokine appelée MIF (Macrophage Migration Inhibitory Factor) (Calandra and Roger, 2003), (Riedemann et al., 2003) (**Figure 21**).

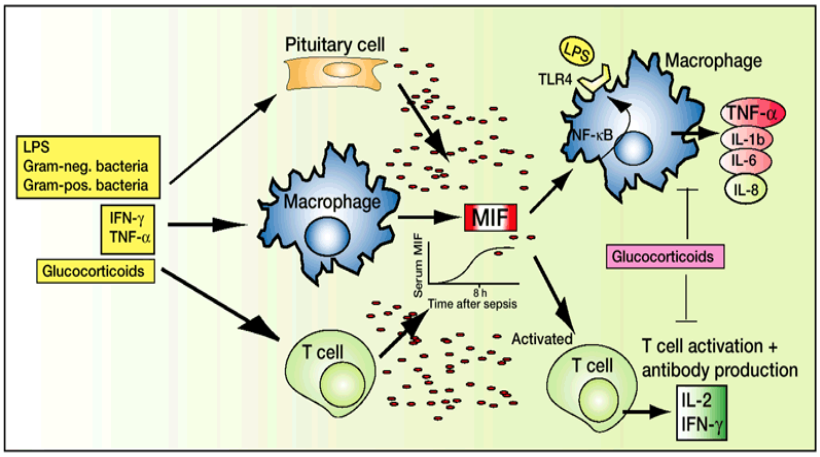


Figure 21. Mecanisme d'action de MIF dans la réponse septique. Le LPS, les cytokines et les glucocorticoides stimulent les macrophages les lymphocytes et les cellules de la glande pituitaire, provoquant l'augmentation de la concentration de MIF dans le sérum dans les premières heures de la réponse. MIF induit alors l'activation des lymphocytes et la production d'anticorps et de cytokines comme IL-2 et l'IFN-γ. Chez les macrophages, MIF induit la production de TLR4 d'une façon Ets dépendante ce qui permet l'augmentation de la réponse des macrophages face au LPS. MIF induit également la production de cytokines pro-inflammatoires chez les macrophages et est capable d'empêcher l'action négative des glucocorticoïdes sur l'activation des macrophages et cellules T. D'après (Riedemann et al., 2003).

Nous verrons ensuite (Chapitre III) quel est le mécanisme d'action et dans quels processus est impliquée cette cytokine MIF. Ce qu'il faut noter c'est que cette molécule se trouve aussi bien chez les vertébrés que chez les invertébrés. On la retrouve chez les mollusques (Wang et al., 2009) (et chapitre résultats), chez les nématodes (Vermeire et al., 2008), chez les prochordés (Du et al., 2004), chez les arthropodes (Jaworski et al., 2001)

(Umemiya et al., 2007) et chez les échinodermes (Hibino et al., 2006). La présence de MIF chez tous les bilatériens démontre sa conservation à travers l'évolution ainsi que son importance dans la régulation des réponses immunes.

III. MIF (MACROPHAGE MIGRATION INHIBITORY FACTOR): UN REGULATEUR DE L'IMMUNITE INNEE

III.1.Historique.

MIF est la première cytokine à avoir été découverte et décrite comme un facteur inhibant la migration cellulaire *in vitro* (David, 1966) (Bloom and Bennett, 1966). Par contre, jusqu'à son clonage en 1989 (Weiser et al., 1989) la fonction de MIF restait assez ambigüe. C'est au début des années 90 que MIF a été « redécouvert » par l'intermédiaire des travaux qui cherchaient des nouveaux régulateurs de l'inflammation. On a vu alors que la protéine MIF était secrétée par les cellules de la glande pituitaire antérieure lors de l'exposition au LPS (Bernhagen et al., 1993). Le fait d'être secrétée par une glande évoquait un rôle de médiateur liant les systèmes endocrine et immunitaire. A partir de ce moment plusieurs études ont décortiqué les maintes fonctions que possède MIF, et que nous décrirons ci-dessous. Il est accepté que MIF joue un rôle central comme régulateur de l'immunité innée et des réponses inflammatoires.

III.2. Structure du gène et de la protéine.

a. Structure du gène

Chez l'homme le seul gène *MIF* est localisé sur le chromosome 22. Chez la souris on trouve jusqu'à neuf pseudogènes (Kozak et al., 1995). Cependant dans le génome humain le seul gène qui montre une homologie avec *MIF* est le gène de la DDT (D-dopachrome tautomerase) (Esumi et al., 1998). Il est possible qu'il s'agisse d'une duplication car tous les deux se trouvent dans le chromosome 22. La structure du gène *MIF* humain est detaillée dans la **Figure 22** d'après (Calandra and Roger, 2003). La partie 5' non codante contient plusieurs séquences consensus de liaison à l'ADN pour les facteurs de transcription AP1, NF-κB, ETS, GATA, SP1 et CREB (cAMP response element binding protein). En ce qui concerne ces sites

de liaison plusieurs études démontrent leur implication dans la régulation transcriptionelle de MIF. Par exemple, l'activation transcriptionelle de MIF par le CRF(Corticotropin-Releasing Factor) dans les cellules de la glande pituitaire est faite par l'intermédiaire d'un élément CRE (cAMP-responsive element) sur lequel se fixe la protéine CREB phosphorylée en présence d'AMPc (Waeber et al., 1998). Nous pouvons citer aussi des travaux qui montrent l'activation de MIF dans des tissues soumis à des conditions d'hypoxie. Cette induction au niveau transcriptionnel est faite par l'intermédiaire du facteur HIF-1 (Hypoxia-inducible factor 1) (Baugh et al., 2006) et la protéine CREB. Le HIF-1 se fixe sur un élément HRE (Hipoxia-reponsive élement) situé dans le promoteur de MIF dans des conditions d'hypoxie crées par les tissus qui suivent un processus inflammatoire comme dans les cas de l'asthme, fibrose poulmonaire, choc septique ou rthrites rhumatoïdes. Les auteurs démontrent aussi que dans des conditions d'hypoxie cette augmentation de la transcription est favorisée par l'élimination de CREB qui inhibe dans certains cas la transcription de MIF (Baugh et al., 2006). D'autres travaux montrent aussi la régulation de MIF dans des cellules de l'endométriome, par le TNF-α. Celui-ci induit la production du facteur NF-κB qui se fixe sur le promoteur de MIF induisant une augmentation de la quantité de ARNm et de la sécrétion de la protéine (Cao et al., 2006). Cette augmentation de l'expression de MIF pourrait avoir une implication importante dans des pathologies de cet organe comme l'endométriose (Cao et al., 2006). Une autre séquence de liaison à l'ADN trouvée dans le promoteur du gène *MIF* est celle du facteur de transcription Sp1. Des travaux réalisés par l'équipe de T. Calandra (Roger et al., 2007), ont démontré que le traitement des cellules THP-1 et de PBMC avec des produits microbiens augmente la transcription de *MIF* et que cette augmentation est liée à celle de l'activité de liaison du facteur Sp1 au promoteur de *MIF*. De plus, les mêmes travaux montrent que la mutation du site de liaison pour CREB diminue de façon significative l'activité promotrice de *MIF* lors d'une stimulation bactérienne (Roger et al., 2007) ce qui impliquerait que la stimulation de la production *MIF* par des bactéries se fait d'une façon CREB-dépendante.

Deux polymorphismes de la partie 5' régulatrice ont été décrits comme étant liés à des maladies humaines. L'un des polymorphismes est au niveau d'une séquence CATT répétée de cinq à huit fois, dans la position -794 (-794 $CAAT_n$) et d'un SNP (single nucléotide polymorphism) dans la position -173 (-173G/C). Ces deux polymorphismes du gène sont associés à une surexpression de MIF et une incidence du cancer de la prostate (Meyer-Siegler et al., 2007). Egalement les polymorphismes -173G/C et -794 $CATT_{5-8}$ sont associés à une baisse de la quantité de protéine MIF dans le sérum, ce qui implique dans le cadre d'une

infection palustre, une incidence plus grande d'anémie sévère (Awandare et al., 2009). On peut citer aussi des travaux qui montrent que ces polymorphismes sont associés à un taux élevé de MIF circulant et à des lésions articulaires de type rhumatoïde (Timothy et al., 2005)

. D'autres exemples de maladies pour lesquelles l'association des différentes formes alléliques des polymorphismes CATT et SNP ont été démontrées sont la sarcoïdose (Amoli et al., 2002), (Plant et al., 2007), l'asthme (Mizue et al., 2005), le psoriasis (Donn et al., 2004) ou la colite ulcérative (Nohara et al., 2004). En ce qui concerne la liaison de ces polymorphismes à l'incidence de la sepsis sévère, des études récentes ont établit une liaison entre les polymorphismes -173C et -794 CATT7 et la mortalité des patients ayant souffert un épisode de sepsis (Lehmann et al., 2009).

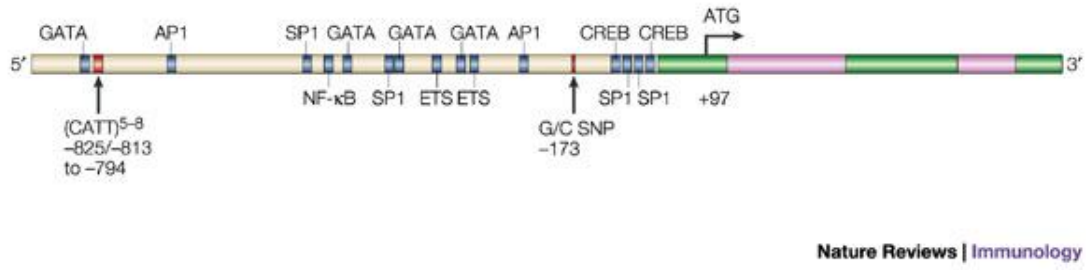


Figure 22. Structure du gène MIF humain. Le gène MIF humain est formé par trois exons (vert) et trois introns (rose). La région promotrice contient plusieurs séquences de liaison à l'ADN pour des facteurs de transcription comme AP1, NF-κB, ETS, GATA, SP1 et CREB. La figure représente aussi les deux types de polymorphisme (flèches) associés à plusieurs pathologies humaines. D'après (Calandra and Roger, 2003).

b. Structure de la protéine.

La protéine MIF, composée de 114 acides aminés non-glycosylée avec une taille de 12,5 kDa, est codée par un ARNm de ≈0,8kb chez l'homme, la souris et le rat. La détermination en 1996, par trois groupes indépendants, de la structure tridimensionnelle de MIF a permis la définition d'une nouvelle superfamille de protéines appelée tautomérase/MIF (Sun et al., 1996), (Kato et al., 1996), (Suzuki et al., 1996). A la différence d'autres cytokines connues, MIF forme un homotrimère et des études ultérieures ont montré qu'en réalité les monomères, dimères et trimères coexistent en solution, monomères et dimères étant les formes les plus répandues dans des conditions physiologiques (Mischke et al., 1998). Ces résultats on été remis en question récemment par une étude qui montre que c'est la forme trimérique qui serait la plus abondante (Philo et al., 2004). Les MIF d'autres espèces dont la structure à été déterminée, par exemple chez les nématodes (Vermeire et al., 2008) ou chez *Plasmodium* (Shao et al., 2010), ont la même structure tridimensionnelle même si elles

partagent une identité de séquence qui est dans certains cas de moins de 10%. La structure de MIF présente une grande homologie avec celle des protéines bactériennes 4-OT (4-oxalocrotonate tautomerase) et CHMI (5-carboxymethyl 2-hydroxymuconate isomérase), qui font partie aussi de la superfamille tautomérase/MIF. Même si l'homologie de séquence entre ces trois protéines est quasiment inexistante la structure tertiaire est très semblable (**Figure 23**).

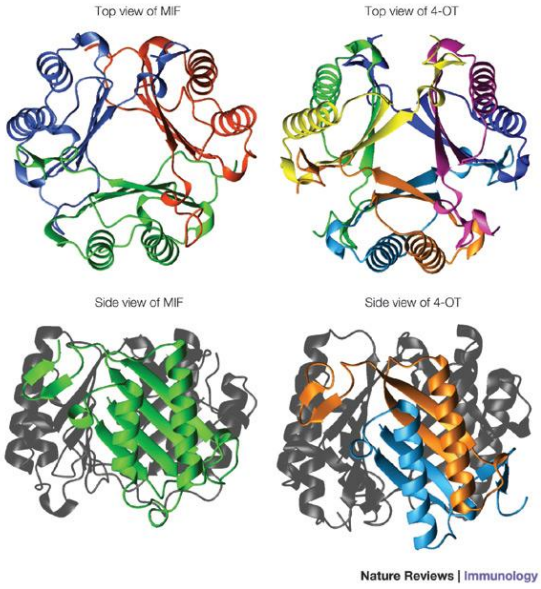


Figure 23. Structure de la protéine MIF. Comparaison des structures tertiaires de MIF et de la 4-0T bactérienne. D'après (Calandra and Roger, 2003).

De plus, elles partagent toutes les trois un résidu Proline qui se trouve en position 1 N-terminale après le clivage de la première Met, et qui constitue l'entrée de la poche catalytique responsable d'une activité tautomerase.

III.3. Activité enzymatique.

Deux substrats non physiologiques ont été trouvés de façon inattendue pour cette activité tautomerase, le D-dopachrome (2-carboxy-2,3 dihydroindole-5-6-quinone) converti en DHICA (5,6-dihydroindole-2-carboxylic acid) et l'HPP (hydroxyphenylpyruvate) converti en phenylpyruvate (Rosengren et al., 1996), (Rosengren et al., 1997).

La relation entre cette activité enzymatique, par ailleurs absente dans d'autres cytokines, et le pouvoir inflammatoire de MIF, est assez étonnante et actuellement étudiée. Jusqu'à présent une seule étude a démontré que cette activité n'était pas importante pour l'activité inflammatoire car il n'y avait pas de différence dans le profil de migration de

macrophages stimulés avec la forme mutée de MIF dans le site catalytique et la forme non mutée (Swope et al., 1998). Plusieurs études ont montré la relation entre le site catalytique et l'activité biologique. Par exemple la mutation du résidu Pro-1 montre qu'il est important dans la contrerégulation de l'effet des glucocorticoïdes (Lubetsky et al., 2002). D'autres études ont montré que ce mutant n'a pas d'effet sur la production des métalloprotéines par les fibroblastes synoviaux dans les cas de rhumatisme articulaire (Onodera et al., 2002). De plus l'inhibiteur de MIF ISO-1(S,R-3-(4-hydroxyphenyl)-4,5-dihydro-5-isoxazole acetic acid methyl ester) qui se fixe dans le site catalytique, inhibe l'action de MIF sur les effets des glucocorticoïdes, ainsi que l'induction de TNF-α par MIF (Lubetsky et al., 2002). En outre, résistance au choc septique est observée chez les souris traitées avec ISO-1 (Al-Abed et al., 2005).

Il est donc clair que ce site catalytique est important pour la capacité inflammatoire de MIF mais le mécanisme par lequel cette activité agit n'est pas encore connu. Une possibilité serait que MIF interagisse avec son récepteur à travers le site catalytique (Leng et al., 2003). Cette hypothèse semble être confortée par une étude récente avec des souris exprimant une version mutée de MIF (la Pro avait été remplacée par une Gly). Ceci a permis de mettre en évidence l'importance de la partie N-terminale de MIF dans les interactions protéine-protéine. Par contre, la présence d'une activité tautomerase n'est pas indispensable à l'activité cytokine de MIF (Fingerle-Rowson et al., 2009b).

D'un point de vue évolutif, cette activité tautomerase pourrait être vestigiale car les substrats L-dopachrome sont aussi ceux de la cascade qui conduit à la mélanisation chez les invertébrés (Bucala, 2007).

III.4. Profil d'expression de MIF.

Le premier type cellulaire décrit comme étant la principale source de MIF est le lymphocyte T (David, 1966), (Bloom and Bennett, 1966). Des études ultérieures ont montré que MIF était une cytokine exprimée par l'hypophyse (Bernhagen et al., 1993) et par les macrophages (Calandra et al., 1994), ainsi que par d'autres cellules du système immunitaire comme les cellules dendritiques, les cellules de type B et les mastocytes. A la différence d'autres cytokines, MIF est exprimé constitutivement et stocké à l'intérieur des cellules et, de ce fait, il est sécrété dans les premiers instants d'une réponse immune, sans avoir besoin d'être synthétisé *de novo*. Le fait que MIF ne possède pas de séquence signal N-terminale, indiquerait qu'il est sécrété par un système différent que celui d'autres cytokines. Il a été

démontré dans un modèle de stimulation de monocytes THP-1 humains par l'endotoxine, que MIF ne rentre pas dans le réticulum endoplasmique. De plus, sa sécrétion n'est pas inhibée par des inhibiteurs des voies classiques, comme la monensine ou la bréfeldine A, mais par des inhibiteurs des voies dites « non classiques » comme le glyburide et la probenicide, indiquant qu'il s'agit d'un système de type « ABC transporter » (Flieger et al., 2003).

MIF n'est pas seulement exprimé par le système immunitaire, mais aussi de façon générale par toutes les cellules et les tissus qui sont en contact avec l'environnement extérieur de l'hôte, tels que les poumons, les premières couches de la peau et les tractus digestifs et génito-urinaires. MIF est aussi fortement exprimé par les tissus du système endocrine, spécialement par les organes qui sont impliqués dans la réponse au stress.

III.5. Mode d'action de MIF

Comme on l'a déjà évoqué précédemment, MIF a été décrit comme ayant un rôle central dans la régulation de la réponse immune face à une infection. En effet MIF contrôle la production de diverses cytokines pro-inflammatoires comme la TNF, IFN-γ, IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, et la production de NO et de la PGE_2. De plus, beaucoup d'activités de MIF sont dues à son action comme contre-régulateur de l'effet suppresseur des glucocorticoïdes sur les réponses cellulaires (Calandra and Roger, 2003). Les principales activités de MIF sont l'activation de la prolifération cellulaire (Mitchell et al., 1999), l'induction de l'expression de TLR4 (la molécule traductrice du complexe qui reconnaît le LPS) (Roger et al., 2001a), l'inhibition de l'activation de p53 (Mitchell et al., 2002) et de Jab1 (JUN-activation domain protein 1) (Kleemann et al., 2000). Toutes ces activités sont impliquées dans le soutien de la réponse immune et l'augmentation de son efficacité (**Figure 24**).

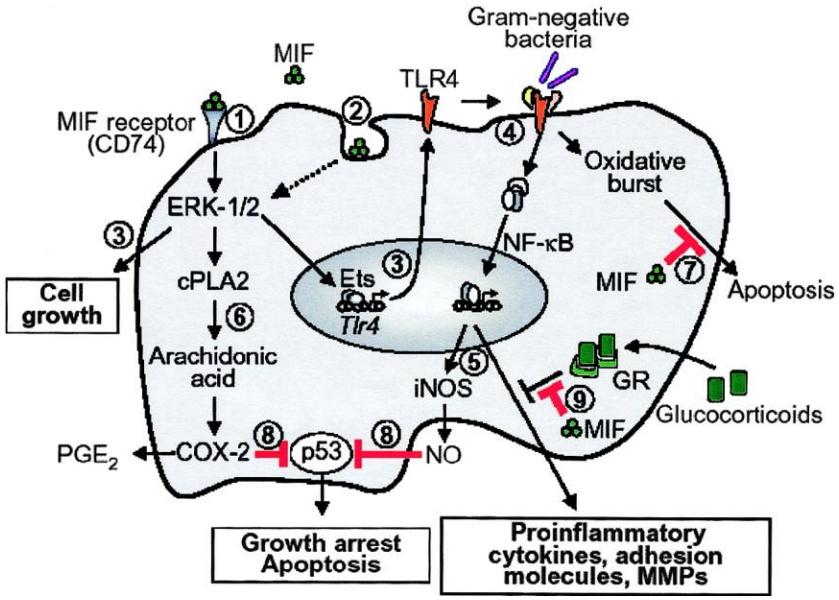


Figure 8. Mode d'action de MIF. MIF peut exercer ses effets biologiques *via* son récepteur (1) ou via une voie non classique d'endocytose (2). MIF active la voie MAPK ERK ce qui induit la prolifération cellulaire et active le facteur de transcription Ets (3) ce qui induit l'expression du gène *Tlr4* qui code le récepteur TRL4 qui fait partie du complexe récepteur du LPS. MIF facilite ainsi la reconnaissance des endotoxines (4) ce qui déclenche la production de médiateurs pro-inflammatoires, incluant des cytokines et du NO (5). MIF active une série des événements qui débutent par la phosphorylation d'ERK 1/2 et se suivent par la production de cPLA2, d'acide arachidonique et la prostaglandine PGE_2 (6). Via la generation d'une activité oxidoreductase, du NO, et de (COX)-2, MIF prévient l'activation d'une apoptose induit par un stress oxidatif (7) et par p53 (8). GR, glucocorticoid receptor; iNOS, inducible nitric oxide synthase; MMPs, matrix metalloproteinases; NF-κB, nuclear factor–κB. D'après (Renner et al., 2005).

III.5.1. Activation de la voie de signalisation ERK1/ERK2

Il a été démontré que MIF induit la prolifération cellulaire de fibroblastes quiescents grâce à l'activation (phosphorylation) des MAPK ERK1/ERK2 qui se produit dans les 30 premières minutes après l'induction et qui est maintenue jusqu'à 24 heures (Mitchell et al., 1999). Ce type d'activation par MIF dite soutenue est inhabituelle car la plupart du temps l'activation d'ERK1/ERK2 est transitoire, c'est-à-dire que leur phosphorylation disparaît en moins de 90 min. Seulement dans un contexte de mutation de l'oncogène *Ras* ou lors d'une activation médiée par les intégrines (Eliceiri et al., 1998) les MAPK restent activées pendant plusieurs heures. L'activation d'ERK1/ERK2 induit l'activation des molécules effectrices impliquées dans la réponse inflammatoire, comme les facteurs de transcription (c-myc, NF-κB et Ets), des protéines du cytosquelette impliquées dans la phagocytose, ainsi que des protéines kinases (Robinson and Cobb, 1997), (Roger et al., 2005). L'activation

d'ERK1/ERK2 par l'intermédiaire de MIF conduit à la phosphorylation d'Elk-1 (Mitchell et al., 1999) membre de la famille des facteurs de transcription Ets, et qui a un rôle dans l'induction de l'expression de TLR4 (Roger et al., 2005). Un effet majeur de l'activation d'ERK1/ERK2 par MIF est l'activation de la $cPLA_2$ (cytoplasmic phospholipase A2), qui est un composant important du processus inflammatoire. $cPLA_2$ est nécessaire pour la production d'acide arachidonique précurseur des prostaglandines et leukotrienes et qui active aussi JNK (c-jun N-terminal kinase) nécessaire à la traduction de l'ARNm de TNF-α. Donc MIF contre régule l'action inhibitrice des glucocorticoïdes sur la $cPLA_2$ (Mitchell et al., 1999) et par conséquent maintient le processus inflammatoire.

III.5.2. Régulation de TLR4

L'utilisation de macrophages exprimant l'ARN antisens de MIF ou issus des souris knock-out pour MIF a montré que ces cellules étaient insensibles au LPS (Roger et al., 2001b) (Roger et al., 2001a). Les macrophages déficients en MIF ne répondent pas à une stimulation immune par le LPS ou par des bactéries à Gram négatif. Cette absence de réponse est mesurée par la diminution de l'activité de NF-κB et de la production de TNF, IL-1, IL-12 et IL-6. Ce phénomène est dû à une réduction de la transcription du gène *TLR4* (Roger et al., 2001a). Comme nous l'avons indiqué précédemment, l'induction de l'expression de TLR4 par MIF est médiée par des facteurs de transcription de la famille Ets, qui sont activés par la voie de signalisation ERK1/ERK2 (Roger et al., 2005). En augmentant l'expression de TLR4, MIF facilite la détection des bactéries à Gram négatif et la production des cytokines pro-inflammatoires qui sont essentielles à la réponse rapide aux pathogènes bactériens. Cette réponse semble être très importante pour l'élimination des bactéries intracellulaires, nécessitant une activation des macrophages dépendante d'une production de cytokines de type Th1, car des souris KO pour MIF sont très sensibles à l'infection par *Salmonella typhimurium* (Koebernick et al., 2002a).

III.5.3. Inhibition de l'activité de p53

MIF soutient les réponses pro-inflammatoires et innées en augmentant l'expression de TLR4 grâce à l'activation de la voie ERK. En 1999 Hudson *et al*, ont démontré que MIF fonctionne comme un contre régulateur de l'action du gène suppresseur des tumeurs *p53*, c'est-à-dire que MIF inhibe l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose induits par p53 (Hudson et al., 1999). A la suite de ces observations, un autre travail a démontré que pour des

macrophages déficients en MIF, la capacité à induire l'inflammation (par la production de TNF, IL-1 et PGE_2) et la viabilité lors d'une induction avec du LPS, sont réduites par rapport à des macrophages témoins (Mitchell et al., 2002). Lors d'une induction microbienne les macrophages produisent du NO qui va tuer les bactéries, mais qui est aussi toxique pour les macrophages. Il a été démontré que dans les macrophages déficients en MIF le NO provoque une accumulation de p53 intracellulaire qui mène à l'apoptose, tandis que chez les macrophages témoins, l'accumulation intracellulaire de p53 est inhibée par MIF. Cette inhibition de l'action de p53 a besoin de l'activation d'ERK1/ERK2, de PLA_2, de la COX2 (cyclooxygenase 2) et de la PGE_2 (Mitchell et al., 2002).

III.5.4. Les récepteurs de MIF

a. CD74

La capacité de MIF d'induire l'activation de la voie ERK1/ERK2 (Mitchell et al., 1999), supportait fortement l'idée d'une interaction avec un récepteur membranaire. En utilisant une banque d'expression chez la lignée cellulaire monocytaire THP-1, Leng *et al* ont identifié en 2003 le récepteur de MIF; il s'agit de CD74, le domaine extracellulaire de la chaîne invariable du MHC (major histocompatibility complex) de Class II (Leng et al., 2003). CD74 est une protéine transmembranaire de type II de 31-41 kDa, exprimée sous forme d'homotrimère et décrite comme ayant un rôle dans la co-stimulation des cellules immunitaires en association avec CD44 (Naujokas et al., 1993) (Naujokas et al., 1995).

Il a été démontré que des macrophages issus de souris CD74-KO ne montrent pas une activation de la voie ERK1/ERK2 lorsqu'ils sont stimulés par MIF et qu'il n'y a pas non plus production de PEG_2. De plus lorsque des cellules COS-7 (qui n'expriment pas CD74 naturellement) sont transfectées avec un vecteur exprimant CD74 l'activation d'ERK1/ERK2 est retrouvée (Leng et al., 2003) en presence de MIF.

Le mécanisme de signalisation induit par la liaison de MIF à CD74 n'est pas encore bien connu. Cependant le fait que le domaine intra-cytoplasmique de CD74 soit assez court ainsi que l'absence de motifs d'activation de seconds messagers, laissent penser que CD74 pourrait interagir avec un autre récepteur membranaire. En effet, il a été démontré que le récepteur CD44 interagit avec CD74 et qu'il est nécessaire pour les activités de MIF (Shi et al., 2006). Lorsque MIF lie CD74 celui-ci est phosphorylé sur un résidu sérine de son domaine intracellulaire. Ceci induit la phosphorylation de CD44 activant la kinase Src qui

active à son tour GEF (guanine nucléotide exchange factor). Cette cascade aboutit à l'activation de Ras et ensuite à l'activation de la voie ERK1/ERK2 (Leng and Bucala, 2006) (**Figure 25**).

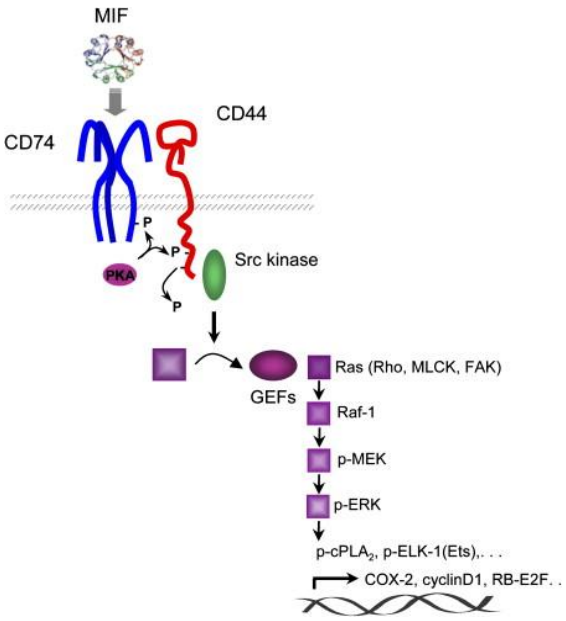


Figure 9. Modèle de la transduction de signal qui implique la liaison de MIF à CD74 et l'activation de son corécepteur CD44. D'après (Leng and Bucala, 2006).

b. Les récepteurs des chemokines CXCR2 et CXCR4.

Des études récentes ont montré que MIF est aussi un ligand non-classique des récepteurs aux chemokines CXCR2 et CXCR4 (Bernhagen et al., 2007). En effet, MIF promeut l'athérogenèse et le recrutement inflammatoire de monocytes et macrophages à travers CXCR2 (Bernhagen et al., 2007) et CXCR4 (Schwartz et al., 2009). Ces deux récepteurs forment des hétérodimères avec CD74 et s'il est clair que l'activation de la voie ERK1/2 MAPK se fait par l'intermédiaire de la liaison de MIF avec l'hétérodimère CD74/CXCR2, il a été démontré récemment que l'activation de JNK se par MIF se fait par l'intermédiaire de l'interaction entre MIF et l'hétéro-dimère CD74/CXCR4 dans des lignes cellulaires fibroblastiques et de cellules T (Lue et al., 2010). Ce dernier aspect démontre que MIF peut promouvoir des réponses inflammatoires d'une façon JNK dépendante comme la CXCL12, un ligand pour CXCR4.

III.6. MIF dans l'infection

Nous avons vu les mécanismes moléculaires qui font de MIF une molécule centrale dans la régulation de la réponse immune. En ce qui concerne le rôle de MIF face aux infections avec les différents types de pathogènes, il a été largement étudié.

III.6.1. MIF et les infections bactériennes

Le facteur principal de virulence des bactéries est le LPS des bactéries à Gram négatif (Beutler and Rietschel, 2003) et les peptidoglycanes ou l'acide lipotéichoïque des bactéries à Gram positif (John and Thomas, 2008). Le LPS ou des facteurs pro-inflammatoires des cellules immunes comme le TNF et l'IFN-γ, induisent la sécrétion de MIF par les macrophages (Calandra et al., 1994). Cette sécrétion de MIF dans le sérum ou dans les tissus va provoquer en même temps une réponse immune innée et adaptative à travers l'activation des macrophages et des lymphocytes respectivement. Même si MIF est nécessaire pour combattre l'infection en activant la survie de macrophages, et les réponses liées à l'activation de la voie initiée par TLR4 (Roger et al., 2001a), une production très élevée de MIF peut avoir un effet néfaste dû à un état d'endotoxémie. Des études faites sur des souris MIF KO infectées avec *Pseudomonas aeruginosa* ont montré que ces souris éliminaient plus facilement les bactéries que les souris MIF WT et avaient une accumulation de neutrophiles moins élevée dans le fluide bronchiolaire (Bozza et al., 1999). De la même façon, Calandra *et al*, ont démontré que l'utilisation des anticorps anti-MIF *in vitro* protégeait les souris d'une production massive et fatale de cytokines, et des expériences *in vivo* montraient également une protection contre une infection péritonéale, provoquée par une CPL (caecal ligation and puncture), après l'administration 8 heures après la CPL, des anticorps bloquant MIF (Calandra et al., 2000). MIF est sécrété par les macrophages lorsque ceux-ci sont induits par des exotoxines telles que la TSST1 (staphylococcal toxic-shock syndrome toxin 1) ou la SPEA (streptococcal pyrogenic exotoxin A) et cela induit des réponses pro-inflammatoires létales tandis que cette létalité est inhibée par l'administration d'anticorps bloquant MIF (Calandra et al., 1998)

Par contre, des études effectuées avec *Salmonella thyphimurium* (une bactérie intracellulaire) ont révélé que les souris MIF KO possédaient une faible réponse Th1 (démontrée par une faible production d'IL-12, IFNγ et TNF) et une activation incomplète des macrophages (Koebernick et al., 2002b) ce qui se traduit par une élimination moins efficace

des bactéries intracellulaires. De la même façon, des expériences réalisées avec *Mycobacterium tuberculosis* montrent que la neutralisation de MIF chez les macrophages induit la croissance bactérienne, tandis que l'administration de MIF a l'effet contraire (Oddo et al., 2005).

Pour expliquer ces observations contraires nous pouvons argumenter que MIF est essentiel pour la réponse de l'hôte aux infections bactériennes mais, par contre, des niveaux élevés de MIF peuvent provoquer une réponse inflammatoire trop forte qui peut être létale. En même temps il apparait évident que lors de l'infection par des bactéries intracellulaires qui s'attaquent aux macrophages la présence de MIF est essentielle.

III.6.2. MIF et les réponses à autres pathogènes.

MIF a été décrit comme étant impliqué dans les réponses aux infections parasitaires, comme par des parasites protozoaires tels que *Plasmodium*, *Leishmania*, et *Trypanosom*a ainsi que par des parasites helminthes nématodes ou trématodes.

III.6.2.1. MIF et les infections par les parasites protozoaires

a. Plasmodium

Dans le cas d'une infection par des parasites du genre *Plasmodium* responsables de la malaria, il a été démontré que lors d'une infection des souris BALB/c avec *P. chabaudi* la quantité de MIF dans le sang augmente significativement et que ces niveaux sont fortement corrélés avec la sévérité de la maladie et l'anémie que celle-ci provoque (Martiney et al., 2000). De plus, des études cliniques ont montré des niveaux élevés de MIF, dans les tissus périphériques des enfants et dans le placenta des femmes enceintes atteints de malaria (Chaiyaroj et al., 2004). D'autres études montrent que les niveaux de MIF dans le sang et dans les PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) des enfants infectés par *P. falciparum* sont faibles, ce qui pourrait augmenter la sévérité de la maladie par une diminution de l'efficacité de la réponse immune (Awandare et al., 2007).

b. Leishmania

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo*, ont montré le rôle majeur de MIF dans la réponse à une infection par *Leishmania*. Par exemple, l'administration orale de MIF recombinant chez

des souris augmente la résistance à *L. major* (Xu et al., 1998). D'autres études montrent que MIF, en liaison avec le TNFα, augmente la production de NO par les macrophages et induit la mort *in vitro* de *L. major* (Juttner et al., 1998). De plus, des souris MIF KO sont sensibles à l'infection cutanée par *L. major* (Satoskar et al., 2001). Même si le rôle précis de MIF dans la réponse anti-*Leishmania* n'est pas très bien connu il semble clair qu'il a un rôle central dans la médiation de la résistance à *Leishmania* en augmentant la réponse des macrophages.

c. Trypanosoma

Le rôle de MIF dans la régulation de la réponse immune de l'hôte à une infection par les parasites du genre *Trypanosoma* est très peu étudié. Une étude d'inhibition de MIF pendant l'infection montre que l'immunité antiparasitaire et la destruction des tissus sont corrélées à la production de MIF. De plus, des études sur des souris MIF KO ont montré que ces souris développent une charge parasitaire élevée, des pathologies cardiaques inflammatoires et succombent rapidement à l'infection (Reyes et al., 2006). Il a été démontré aussi que cette susceptibilité est associée à un titre bas des IgG2a anti-trypanosome, et aussi une production pauvre de cytokines pro-inflammatoires (Cláudia et al., 2007).

III.6.2.2. MIF et les infections par les parasites helminthes

a. Schistosoma

Des études mesurant l'expression de cytokines au niveau de l'axe hypothalamus-hypophyse-glandes surrénales de babouins infectés par *S. mansoni* (et donc avec des granulomes hépatiques dus à la séquestration des œufs du parasite), ont montré que six semaines après l'infection un niveau d'expression des transcrits de MIF plus élevé que les singes non infectées uniquement dans l'hypophyse et les glandes surrénales. D'autres cytokines pro-inflammatoires (IL-1β, IL-6, TNFα) montraient des profils d'expression différents et les auteurs ont suggéré que l'expression de ces cytokines pourrait réguler la sécrétion hormonale pendant l'infection (Morales-Montor et al., 2003). Ces mêmes auteurs (Morales-Montor et al., 2004) ont étudié l'expression des transcrits de ces mêmes cytokines au niveau du foie montrant une expression élevée de MIF et les autres cytokines pro-inflammatoires dans le foie de singes infectés pendant six semaines. Après 12 semaines d'infection les niveaux des cytokines pro-inflammatoires avaient baissé considérablement ou avaient disparu, concomitamment avec une augmentation des niveaux d'expression des

cytokines d'une réponse Th2 (IL-4, IL-5 et IL-10). D'autres études sur *S. japonicum*, ont montré que des souris traitées avec des anticorps anti-MIF de 4,5-6,5 semaines après infection présentaient 1,7-3 fois plus de vers adultes que les souris témoins ainsi qu'une fécondité moins importante, ce phénotype est expliqué par les auteurs comme étant l'effet d'une diminution de la mortalité des parasites due à une activation moindre des macrophages car ils ne seraient plus activés par les TLRs (Abram et al., 2003). Plus récemment l'étude de l'infection de souris MIF-/- par *S. mansoni* (Magalhaes et al., 2009) a montré une diminution de la taille des granulomes du à une réduction dans le nombre d'éosinophiles. Ces résultats sont en faveur de la participation de MIF dans la maturation des éosinophiles et l'éosinophilie tissulaire associée à l'infection par *S. mansoni*.

b. Taenia

Il a été démontré que MIF a un rôle clé dans la protection contre une infection par le parasite *T. crassiceps*. En effet des souris MIF KO sont très sensibles à l'infection par ce parasite et elles montrent une charge parasitaire plus élevée que les souris témoins. Ce phénotype est accompagné d'une production moindre des cytokines pro-inflammatoire et d'une augmentation de la production des cytokines de réponse de type Th2 qui mènent à une infection chronique (Rodriguez-Sosa et al., 2003)

c. Nématodes

Le rôle de MIF dans les infections provoquées par des nématodes mérite une attention spéciale, car les études ne sont pas menées sur le MIF de l'hôte mais sur ses homologues parasitaires. En effet, plusieurs parasites nématodes sécrètent des homologues de MIF (Vermeire et al., 2008). Par exemple, les parasites nématodes non filaires du genre *Trichinella*, qui provoquent la trichinose, possèdent des homologues de MIF de mammifères (Pennock et al., 1998), (Tan et al., 2001), (Wu et al., 2003). Les homologues de *T. spiralis* et *T. muris* possèdent une activité D-dopachrome tautomerase et la protéine recombinante de *T. spiralis* inhibe la migration de cellules mononucléaires *in vitro*. Par contre elle n'a pas d'effet sur la prolifération des splénocytes murins ni dans la modulation des quantités de cytokines comme IL-2 ou IL-4 dans les surnageants cellulaires, indiquant que *Ts*MIF n'est pas capable de moduler une réponse cellules T dépendante *in vivo* (Tan et al., 2001). Par contre il a été observé que *Ts*MIF est capable de moduler la réponse des macrophages car, bien que des

analyses histologiques montrent la présence d'une grande quantité de cellules mononucléaires infiltrées dans les muscles atteints, parmi ces cellules très peu sont des macrophages. Ces études sont appuyées par des expériences dans lesquelles des billes de Sephadex imbibées de r*Ts*MIF sont injectées sous la peau des souris. Deux jours après l'injection, un nombre moins élevé de macrophages se trouve autour des billes en comparaison de billes non imbibées. Ces résultats appuient l'idée d'un rôle de *Ts*MIF dans l'immuno-évasion du parasite (Wu et al., 2003).

Les nématodes filaires, comme *Brugia malayi*, *Onchocerca vovulus* ou *Brugia pahangi* possèdent aussi des homologues de MIF de mammifères (Pennock et al., 1998), (Zang et al., 2002). *Bm*MIF a été isolé dans les produits de sécrétion du parasite et il a la propriété d'attirer les macrophages et les monocytes de l'hôte mammifère (Pastrana et al., 1998). En plus de cette propriété il a été démontré que *Bm*MIF peut activer les monocytes de l'hôte à produire des cytokines comme l'IL-8, TNF-α ou MIF (Zang et al., 2002). Chez les individus infectés par *B. malayi*, les infections asymptomatiques sont caractérisées par une réponse de type Th2 incluant une éosinophilie avec la production de grandes quantités d'IgE et d'IgG_4, tandis que les individus avec une infection chronique présentent une réponse de type Th1. Il a été montré que *Bm*MIF augmente la transcription d'ECF-L (Eosinophil Chemotactic Factor) ce qui permet de penser que *Bm*MIF est impliqué dans le recrutement des éosinophiles et qu'il module la réponse de l'hôte pour favoriser une réponse de Th2, provoquant ainsi une pathologie asymptomatique, ce qui représente un avantage pour le parasite (Pastrana et al., 1998), (Falcone et al., 2001).

III.7. Conclusion

MIF est, comme résumé par Calandra et Roger (2003), une molécule effectrice exerçant un contrôle sur le système immun inné chez les organismes. MIF est exprimé constitutivement par les cellules immunes et en général dans les tissus qui sont en contact direct avec l'environnement de l'individu. Cette caractéristique particulière de MIF lui donne la capacité de répondre de façon très rapide aux stimuli provenant de l'extérieur, qu'il s'agit d'infections ou du stress. MIF fait partie d'une grande famille de protéines avec en commun, la présence d'une activité enzymatique caractéristique qui la différencie des autres cytokines. L'importance de MIF est manifeste de par son existence chez les vertébrés, chez les invertébrés et aussi chez les plantes (Du et al., 2004). La fonction et l'activité de MIF chez les

invertébrés a été très peu ou pas étudiée jusqu'à présent, si l'on se réfère à son rôle sur l'immunité de ces organismes à l'infection. Cela peut être dû au fait que MIF n'est pas présent chez les organismes modèles insectes par excellence comme *D. melanogaster* ou *A. gambiae*. Par contre sa fonction a été bien étudiée chez les nématodes qui utilisent leur MIF pour moduler la réponse de l'hôte à leur avantage (cf Chapitre III.6.2.2. MIF et les infections par les parasites helminthes) soulignant l'importance de cette molécule. Ces arguments se voient actuellement confortés par la découverte récente et notre étude de l'activité et de la fonction de deux molécules MIF chez un autre invertébré, le mollusque gastéropode *B. glabrata* (cf Chapitre résultats).

En conclusion MIF est une molécule très importante dans les systèmes de protection contre les facteurs extérieurs soit au niveau immunitaire, de la réponse au stress et aussi (même si nous n'avons pas traité cet aspect) du point de vue de l'auto-immunité et du cancer. Tout cela justifie que MIF soit récemment nommé un « Most Interesting Factor » (Bucala, 2000) (Bucala, 2007).

IV. *B. glabrata* : UN MODELE POUR L'ETUDE DE L'IMMUNITE INNEE DES INVERTEBRES

Une des avancées les plus remarquables dans l'histoire récente de l'immunologie a été la découverte de similarités frappantes entre les processus de la réponse innée des vertébrés et ceux des invertébrés. Par exemple, nous pouvons citer la découverte des voies de signalisation Toll chez *D. melanogaster* qui a donné lieu à la caractérisation de son homologue TLR4 chez les vertébrés (Hoffmann and Reichhart, 2002). Les invertébrés chez lesquels l'immunité innée a été la plus étudiée jusqu'à présent sont des insectes (*D. melanogaster* et *A. gambiae*).

L'immunité des mollusques, l'un des plus grands embranchements du règne animal avec quelques 100 000 espèces, reste encore très peu étudiée malgré son rôle clé dans la transmission de parasites trématodes d'intérêt médical et vétérinaire comme *Fasciola* ou *Schistosoma*. De plus, l'étude de l'immunité des mollusques est d'autant plus justifiée qu'il semble exister des différences majeures avec ce qui est connu des insectes et nématodes.

Comme tous les invertébrés, les mollusques ne présentent pas de réponse immunitaire acquise, mais ils sont capables d'agir face à une infection par un pathogène en mettant en place une réponse innée, impliquant une réponse cellulaire ainsi qu'humorale.

L'immunobiologie des mollusques vecteurs de trématodes est principalement étudiée sur le gastéropode *B. glabrata*, hôte intermédiaire de *Schistosoma mansoni*, agent de la bilharziose intestinale, et d'*Echinostoma caproni*, un autre trématode parasite des oiseaux. Malgré son importance dans la transmission du parasite, les molécules régulatrices ou effectrices ainsi que les mécanismes moléculaires de la réponse immune chez *B. glabrata* et dans les relations avec les parasites, ne sont pas très bien connus.

Cependant, c'est chez le mollusque qu'a été faite la découverte d'un processus de diversification de molécules de reconnaissance, non soupçonné chez les invertébrés. Il s'agit des molécules de la superfamille des immunoglobulines, les gènes FREPS (Zhang et al., 2004) (*cf. Chapitre I.4. Existence des processus de diversification chez les invertébrés c. Les FREPs*). Un autre exemple est l'existence des molécules de type cytokine homologues de celles des vertébrés, jusqu'à présent inconnues ou peu étudiées chez les invertébrés (cf. Chapitre II. LES CYTOKINES CHEZ LES INVERTEBRES) et surtout de la conservation des signaux qui sont régulés par ces cytokines (cf. *Chapitre RESULTATS*). De plus ce mollusque pourrait devenir un organisme modèle, représentant des lophotrochozoaires, car le séquençage de son génome est à présent bien avancé (Raghavan and Knight, 2006). Ces données confirment l'originalité des modèles mollusques, par rapport aux insectes et aux nématodes, et illustrent la nécessité d'élargir nos connaissances, notamment moléculaires, à ce grand groupe phylogénique.

IV.1. Le système B. glabrata/S. mansoni

IV.1.1. Le mollusque B. glabrata

B. glabrata est un mollusque gastéropode pulmoné de la famille des Planorbidae et du genre *Biomphalaria*, qui compte 34 espèces différentes dont 22 en Amérique et 12 en Afrique. Il se trouve dans les régions tropicales ou sous-tropicales. *B. glabrata* est l'hôte intermédiaire du parasite helminthe *S. mansoni* qui provoque la schistosomiase (bilharziose) intestinale chez l'homme. La schistosomiase est une maladie chronique qui constitue un problème majeur de santé publique. Elle est présente dans 74 pays en développement et affecte plus de 200 millions de personnes. De plus, il est estimé qu'environ 600 millions de personnes sont exposées à l'infection par une ou plusieurs des trois espèces de *Schistosoma* qui infectent l'homme (*S. mansoni, S. haematobium* et *S. japonicum*), (Chitsulo et al., 2004).

IV.1.2. Cycle de vie de S. mansoni

Le parasite *S. mansoni* a un cycle de vie (**Figure 26**) complexe (Ross et al., 2002). Il utilise le mollusque *B. glabrata* comme hôte intermédiaire chez lequel il se multiplie intensément de manière asexuée. Cette association est spécifique de l'hôte et indispensable au développement du parasite. Les larves cercaires émises par le mollusque sont directement infestantes pour l'hôte définitif vertébré chez lequel elles se développent en vers adultes dans le système veineux porte mésentérique. Les vers adultes, qui présentent un grand dimorphisme sexuel s'accouplent et les femelles pondent des œufs. Ces œufs sont les principaux responsables des complications pathologiques car une partie des œufs est piégée dans les tissus de l'hôte. Les œufs non piégés sont évacués vers le milieu extérieur par les fèces, et les œufs atteignent le milieu aquatique et libèrent une larve libre et nageant, le miracidium. Cette larve infeste un mollusque hôte et se transforme en sporocyste à l'intérieur du mollusque. Pendant 15 jours le sporocyste primaire (ou mère) est présent au niveau des tissus du pied du mollusque. Après cette période, le sporocyste primaire va migrer vers la glande digestive et va produire des sporocystes secondaires qui sont capables de produire des cercaires et aussi des générations supplémentaires de sporocystes. De ce fait la pénétration et le développement d'un miracidium dans le mollusque conduit à la production de plusieurs milliers de cercaires (Bayne, 2009).

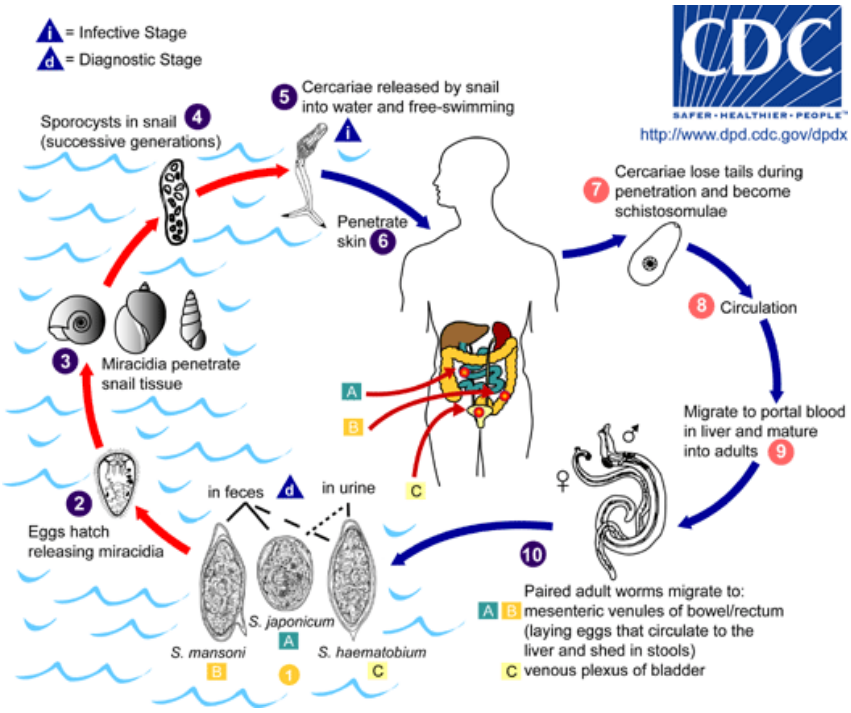


Figure 26. Cycle de vie des Schistosomes.

IV.1.3. Importance du système B. glabrata/S.mansoni

Etant donné la grande diversité génétique interindividuelle des mollusques et parasites, il se trouve que dans les populations du milieu naturel seulement quelques individus de schistosome sont compatibles avec quelques individus de mollusque (Sandland et al., 2007) (Bayne, 2009). Lorsqu'un miracidium de schistosome rencontre un mollusque compatible, il va pénétrer à travers l'épithélium du mollusque, il ne va pas être reconnu par le système cellulaire de l'hôte et se développera normalement. Par contre lorsqu'un miracidium rencontre un mollusque non compatible, il va pénétrer son épithélium de la même façon mais va être reconnu dans l'heure qui suit par les hémocytes du mollusque et encapsulé complètement entre 4-8 heures après infection. A ce moment là, le sporocyste est clairement dégradé et il sera complètement dégradé 24 heures après infection (Roger et al., 2008b) (**Figure 27**).

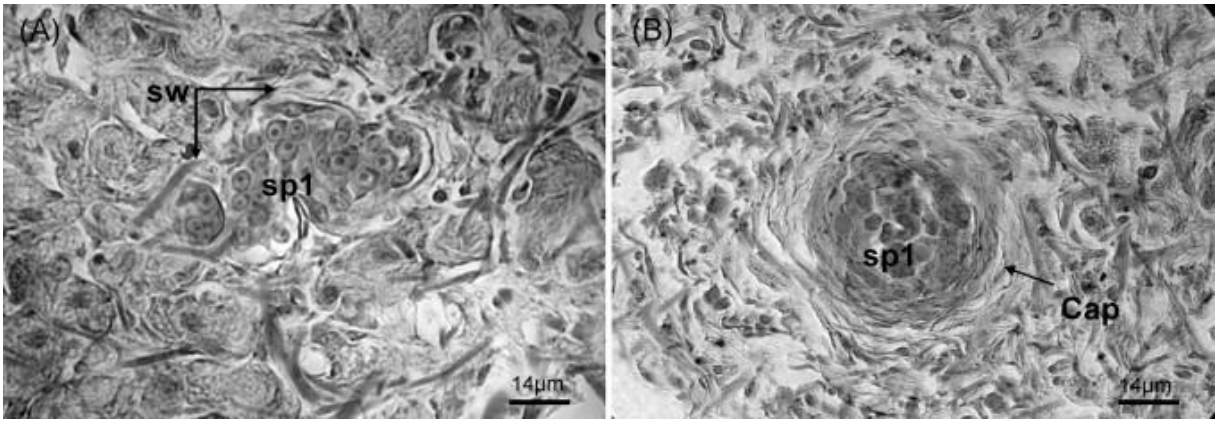


Figure 10 Coupes histologiques de sporocystes (Sp1) de *S. mansoni* dans un système hôte-parasite compatible (A) ou dans un système incompatible (B). Le Sp1 est localisé dans les tissus de la région du pie de mollusques *B. glabrata* (souche Brésil) 6 heures après infection. (A) Le Sp1 se développe normalement et la structure de la paroi du sporocyste (sw) est intacte. (B) Le sporocyste est encapsulé par les hémocytes du mollusque (cap=capsule), et le Sp1 est dégradé et la plus part des cellules du Sp1 sont détruites. D'après (Roger et al., 2008b).

Ce phénomène de compatibilité/incompatibilité a son importance dans un contexte de transmission de la maladie parasitaire à l'homme, par conséquent, ses bases génétiques et moléculaires ont été largement étudiées avec des systèmes compatibles et incompatibles dans les laboratoires (Webster and Davies, 2001) (Jones et al., 2001). Il paraît évident que le sort qu'encourt le parasite est déterminé par plusieurs facteurs comme le système de reconnaissance de l'hôte et l'efficacité de sa réponse et les capacités d'évasion du parasite entre autres. Certains de ces mécanismes durent seulement quelques heures, tandis que

d'autres sont maintenus d'une façon chronique pendant le temps que dure l'infection (Bayne, 2009), (Hanington et al.,2010). Mais quels sont les mécanismes utilisés par l'hôte mollusque pour se défendre de l'infection ?

IV.2. Les réponses immunitaires chez B. glabrata

Avant ce que nous pouvons appeler « l'ère moléculaire » beaucoup de travaux ont montré que les réponses immunitaires du mollusque reposent sur des facteurs de type cellulaire et humoral qui coopèrent entre eux pour reconnaître le soi du non-soi et pouvoir se défendre face aux agressions (Van der Knaap and Loker, 1990).

IV.2.1.Les réponses cellulaires.

Chez *B. glabrata* nous pouvons distinguer au moins 4 types cellulaires intervenant dans la réponse immune. Il y a trois types cellulaires ne circulant pas dans l'hémolymphe ; les cellules réticulaires, les cellules des pores et les cellules détectrices d'antigène. Les cellules réticulaires sont accrochées aux tissus et ont une grande capacité d'endocytose de particules étrangères. Les cellules des pores sont à côté des cellules réticulaires et endocytent des protéines. Les cellules détectrices d'antigènes sont situées dans les intersections du système circulatoire, empêchent la dissémination des microbes et pourraient présenter ceux-ci aux cellules phagocytaires. Le rôle concret de ces cellules fixes dans la défense contre les parasites trématodes n'est pas étudié (Van der Knaap and Loker, 1990).

Les hémocytes sont le quatrième type cellulaire ; ce sont des cellules circulant dans l'hémolymphe et étant donné que le système circulatoire est ouvert, elles peuvent migrer de l'hémolymphe vers les tissus. Ils sont capables de répondre à une stimulation chimiotactique, émettre des pseudopodes, adhérer à un corps étranger, le phagocyter ou lorsqu'il s'agit d'un organisme multicellulaire de l'encapsuler avec la formation des couches concentriques autour du pathogène (par exemple un trématode). Les hémocytes peuvent être différenciés en deux types principaux, les hyalinocytes et les granulocytes. Les hyalinocytes ou cellules rondes ont un ratio noyau/cytoplasme élevé, peu de lysosomes et une tendance moindre à s'attacher, à former des pseudopodes et à phagocyter. De leur côté les granulocytes ont un cytoplasme plus grand, plus de lysosomes et une grande capacité à émettre des pseudopodes et à phagocyter. Les granulocytes sont capables de tuer les pathogènes phagocytés à travers des ROS (O^{-}_{2} et H_2O_2 qui vont être transformés en $^{1}O_2$ entre autres (Hahn et al., 2009b) (Bayne, 2009))

contenus dans les lysosomes qui vont fusionner avec les phagosomes. L'existence des deux types d'hémocytes est controversée, car certains auteurs considèrent les hyalinocytes et granulocytes comme deux types cellulaires différents et d'autres qu'il s'agit de deux étapes différentes de développement d'un seul type cellulaire hémocytaire.

IV.2.2. Les facteurs humoraux

De nombreuses études ont également montré que des facteurs humoraux solubles dans l'hémolymphe contribuent à l'initiation ou à la modulation de la réponse cellulaire qui aboutit à la dégénérescence et à la mort du parasite (Coustau, 2009). La présence des facteurs humoraux dans l'hémolymphe du mollusque a été étudiée depuis longtemps. L'existence de facteurs humoraux comme des opsonines, agglutinines et lectines dans l'hémolymphe du mollusque qui déclenchent la reconnaissance, l'attachement et la mort du parasite a été mise en évidence dans des modèles *in vitro* d'interaction entre des sporocystes et des hémocytes.

Lorsqu'il est mis en contact avec le plasma (hémolymphe sans hémocytes) du mollusque le sporocyste peut survivre même s'il s'agit d'une hémolymphe issu d'un mollusque non compatible. Ce type d'observation suggérait que les facteurs humoraux de l'hémolymphe n'avaient pas la capacité de tuer le parasite. Cependant, des expériences de transfert d'hémolymphe de mollusques incompatibles dans des mollusques compatibles ont montré que ces derniers devenaient incompatibles et étaient capables de tuer le parasite. De plus, des expériences *in vitro* avec des hémocytes compatibles mis en contact avec le plasma de mollusques incompatibles, les rendaient capables de tuer les parasites (Granath Jr and Yoshino, 1984).

Une fois que les hémocytes ont reconnu le parasite, l'étape suivante est le recrutement et puis l'attachement à la surface du parasite. Des expériences avec des ESP (excretory secretory products) du parasite, ont montré que ces produits vont attirer vers le parasite, les hémocytes des mollusques non compatibles et vont inhiber la migration des hémocytes des mollusques compatibles et très souvent l'encapsulation. Ces observations suggèrent qu'il y a dans l'hémolymphe et à la surface des parasites et hémocytes des facteurs de type opsonines, agglutinines ou lectines qui vont permettre cette reconnaissance et l'attachement entre mollusque et parasite. La caractérisation de ces facteurs humoraux solubles ont rarement dépassé le stade de fraction protéique, de poids moléculaire ou d'activité (Loker et al., 1984) (Lodes and Yoshino, 1993) à l'exception des FREPs (*cf. Chapitre I.4. Existence des*

processus de diversification chez les invertébrés c. Les FREPs) qui ont été découverts dans les années 90 (Adema et al., 1997)

Jusqu'au début des années 2000, avant l'utilisation des techniques de transcriptomique et de protéomique, liées aux programmes de séquençage des génomes d'organismes modèles qui permettaient la comparaison des séquences obtenues, on considérait la réponse à l'infection chez le mollusque comme assez simple. Il s'agissait d'un système basé sur une reconnaissance non spécifique et rapide de molécules étrangères par des facteurs humoraux, sur l'activation de la réponse cellulaire menant à une encapsulation du parasite et puis à une activation cytotoxique entraînant la mort de celui-ci (Coustau, 2009) (**Figure 28**).

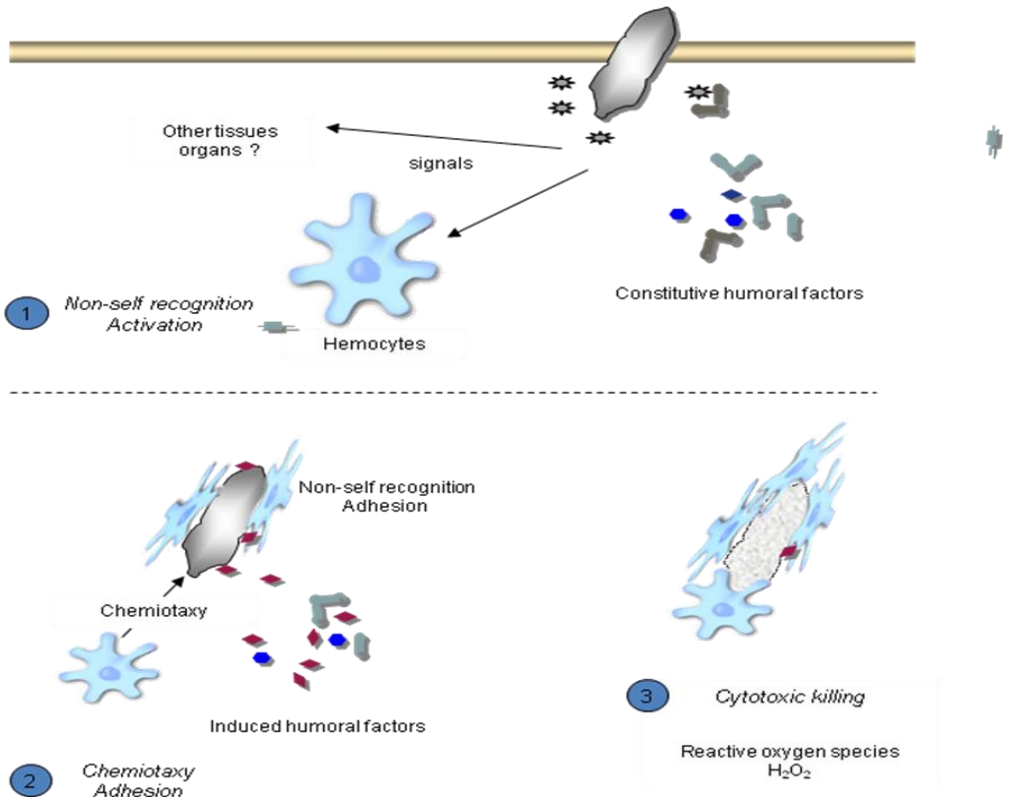


Figure 28. Principales étapes de la réponse immunitaire de *B. glabrata*. (1) Reconnaissance du non-soi et activation des hémocytes. **(2)** Chimiotactisme et adhésion. **(3)** Shock cytotoxique et mort du pathogène. Modifiée de (Coustau, 2009)**.**

IV.2.3. Caractérisation des gènes impliqués dans la réponse immune de B. glabrata

Un effort particulier a été fourni au cours de la dernière décennie pour identifier les gènes impliqués dans la réponse immunitaire humorale ou cellulaire de *B. glabrata*. Ces travaux ont caractérisé une grande quantité de gènes et protéines impliqués qui interviennent dans la réponse du mollusque aux infections par les parasites *S. mansoni* ou bien par *E.caproni* et par des infections bactériennes. Parmi ces travaux on peut citer ceux qui ont utilisé une stratégie de séquençage aléatoire de transcrits d'hémocytes issus de mollusques infectés par *E. caproni* (Mitta et al., 2005), l'analyse comparative d'EST (Expressed Sequence Tags) avant ou après infection (Raghavan et al., 2003), (Lockyer et al., 2004), (Guillou et al., 2007), (Lockyer et al., 2007a), (Ittiprasert et al., 2010), l'analyse comparée d'EST chez des individus résistants ou susceptibles (Bouchut et al., 2006), (Lockyer et al., 2007b). Des approches protéomiques ont identifié les protéines hémocytaires ou plasmatiques chez les individus résistants ou susceptibles (Vergote et al., 2005), (Bouchut et al., 2007). Finalement les gènes caractérisés dans ces études ont permis la fabrication des premiers micro-arrays et l'étude de l'expression de ces gènes au cours de l'infection parasitaire (Lockyer et al., 2008), (Hanington et al., 2010) et aussi par d'autres pathogènes comme les bactéries (Adema et al., 2010).

Tous ces travaux ont caractérisé des gènes de protéases et leurs inhibiteurs, des facteurs d'adhésion cellulaire, de coagulation, régulation et induction du stress, molécules des voies de signalisation cellulaire, des enzymes impliquées dans la biosynthèse et dégradation de glycanes, des lectines, des molécules de reconnaissance hypervariables ainsi que des régulateurs potentiels de l'immunité innée. Le tableau qui suit est un récapitulatif des gènes caractérisés pendant ces études.

Identity	References	Identity	References
Non-self recognition		**Antimicrobial proteins**	
FREPs x 8		LBP/BPIs x 3	(1, 8)
Peptidoglycan Recognition Proteins x 5	(1,2)	Theromacins x 2	(1)
Gram-negative bacteria binding protein	(2	Achacin	(8)
		Aplysianin	(1)
Cell-cell or cell-matrix adhesion			
Cadherin like x 2	(3	**Immune regulators**	
Dermatopontins x 4	(1,3)	Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF)	(1)
Focal adhesion kinase	(4		
F-spondin precursor	(1	Allograft inflammatory Factor (AIF)	(1)
Galectins x 3	(1		
Integrin a-related x 2	(5,1)	**Oxidative stress**	
Integrin a-2	(3	Dual oxidases x 2	(1,4)
Integrin a-3 precursor	(1,4)	Glutathione STransferase	(8)
Integrin a-5 precursor	(1	Peroxidas	(4)
Matrilins x 3	(1,3)	Peroxidasin	(4)
Selectin	(6	Peroxinectin	(4)
Thrombospondin	(3	Cu/Zn dismutases x 3	(8, 12,
von Willebrand domain-containing proteins x 8	(3	Mn SOD	(12)
Galectin IIa	(1	Thioredoxin	(8)
Galectin IIIa / tandem repeat galectin	(1, 7)	Thioredoxin peroxidase	
Matrilin 1	(1		
F-spondin precursor	(1	**Others**	
		4 EF-HAND x 2	
Proteases and protease inhibitors		Ca Binding Protein 1 EF-HAND	
Cystatins x	(1,8)	Cyclophilin domain-containing Protein	
Inter a-trypsin inhibitor	(1	Endo-1,4-?-mannanase x 2	
Kunitz protease inhibitor	(9	Ferritin	
a 2-macroglobulin	(4	Heat Sock Proteins x 2	
Metalloproteinase	(1	Serine/threonin proteine Kinase	
Serine protease	(10)		
Serine proteinase inhibitors x 3	(1		
Cysteine protease inhibitor	(11)		

Tableau 1. Récapitulatif des gènes potentiellement impliqués dans la réponse immunitaire de *B. glabrata* au cours d'une infection par un pathogène. Références : (1) (Mitta et al., 2005), (2) (Zhang et al., 2007), (3)(Bouchut et al., 2006), (4) (Lockyer et al., 2007a), (5) (Davids et al., 1999), (6) (Duclermortier et al., 1999), (7) (Yoshino et al., 2008), (8) (Guillou et al., 2007), (9) (Coustau et al., 2003), (10)(Lockyer et al., 2007b), (11) (Vergote et al., 2005), (12) (Jung et al., 2005), (13) (Bender et al., 2007), (14) (Lockyer et al., 2007b), (15)(Lockyer et al., 2004). Modifié de (Coustau, 2008).

Parmi les gènes, qui méritent une mention spéciale, on trouve ceux des FREPs (*cf. Chapitre I.4. Existence des processus de diversification chez les invertébrés c. Les FREPs*), des régulateurs potentiels de l'immunité du mollusque comme MIF (cf. Chapitre RESULTATS) ainsi que ceux de protéines impliquées dans la réponse cytotoxique des hémocytes pour tuer les pathogènes.

IV.3. Etat actuel des connaissances sur l'immunité de B. glabrata

Malgré les efforts fournis pour caractériser les mécanismes et molécules qui contrôlent les réponses immunes de *B. glabrata*, l'état actuel des connaissances est assez restreint. Il existe néanmoins quelques travaux fonctionnels.

Les FREPS sont des molécules de type lectine produites lors d'une infection parasitaire ou bactérienne, et qui sont capables de se lier aux ESP de parasites ou aux parois

des bactéries et constituer des complexes protéiques (Hertel et al., 1994) en formant un précipité. Des études biochimiques ont permis de révéler qu'il s'agissait de protéines avec un domaine Ig et un domaine de type fibrinogène (Adema et al., 1997). Comme nous l'avons déjà vu (cf. *Chapitre I.4. Existence des processus de diversification chez les invertébrés c. Les FREPs*) les FREPs forment une grande famille composée de 14 membres qui différent entre eux par leur structure exons-introns et qui sont soumis à des phénomènes de diversification comme l'épissage alternatif ou des SNP (Zhang et al., 2004). Le rôle des FREPs n'est pas encore connu mais des études faites sur des FREPs du moustique *A. gambiae* (Dong and Dimopoulos, 2009) et dernièrement sur le mollusque indiquent qu'ils pourraient intervenir dans la reconnaissance des pathogènes aussi bien chez les eucaryotes que chez les procaryotes (Zhang et al., 2008).

En ce qui concerne les mécanismes de stress oxydatif intervenant lors de la réponse hémocytaire au cours d'une infection parasitaire, ils ont été largement étudiés. Les hémocytes contiennent des lysosomes avec des enzymes protéolytiques qui vont pouvoir être sécrétées dans le milieu externe ou bien dans le phagosome formé lors de la phagocytose (Humphries and Yoshino, 2008). De plus les hémocytes sont dotés de toutes les enzymes nécessaires pour la production des ROS et RNS qui sont produits lors d'un stimulus immunitaire, par exemple avec des carbohydrates qui forment la membrane des parasites (Hahn et al., 2000), (Hahn et al., 2009a) (**Figure 29**).

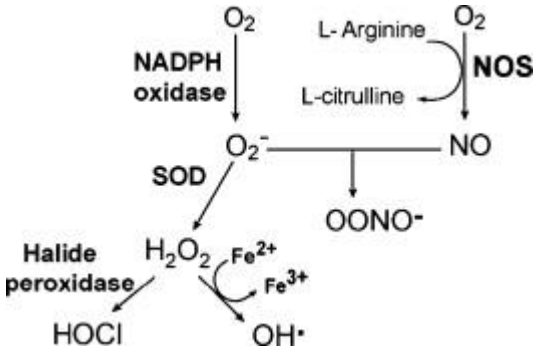


Figure 29. Schéma simplifié des voies qui génerent des ROS et RNS par les hémocytes phagocytaires. D'après (Bayne, 2009).

La production des ROS et RNS a été étudiée dans des modèles d'infection impliquant des mollusques compatibles et non compatibles, et il a été observé que lors d'une incompatibilité la production de H_2O_2 par exemple est plus forte que dans un système compatible (Bender et al., 2009). Les bases de cette production reposent sur le fait que l'enzyme Cu/Zn SOD (Superoxide Dismutase) est plus exprimée en fonction de la

susceptibilité ou non susceptibilité (Goodall et al., 2004). En plus il a été démontré que la Cu/Zn SOD est exprimée par trois allèles différents et qu'il y a un allèle associé à la non susceptibilité (Goodall et al., 2006) et cette association est liée à la différence d'expression (Bender et al., 2007). Malgré son importance cette association ne peut pas expliquer les différents phénotypes compatibles/non compatibles mais le rôle important du stress oxydatif pour tuer le parasite est clair.

Il faut citer aussi les travaux sur la caractérisation des voies de signalisation associées à la réponse immunitaire comme les voies MAPK ERK et p38 (Humphries et al., 2001), (Humphries and Yoshino, 2006), (Zahoor et al., 2008) ainsi que la caractérisation des PGRP et GNBP (Zhang et al., 2007) qui montrent l'implication de ces voies dans la réponse immune du mollusque. Des travaux sur la régulation de la réponse immune du mollusque par une cytokine ont été menés dans notre laboratoire (*cf. RESULTATS*) et d'autres sont en cours sur des molécules de type LBP/BPI (LPS Binding Protein/Bacterie Binding Protein) exprimées en fonction du pathogène.

IV.4. Conclusion

Malgré les connaissances restreintes des mécanismes moléculaires qui contrôlent l'immunité de *B. glabrata*, ce modèle est en train de nous révéler ses secrets. L'intérêt de ce modèle, mise à part sa condition d'hôte invertébré des parasites trématodes, est dû à la découverte chez celui-ci de mécanismes contrôlant les réponses immunes jusqu'à présent non soupçonnés chez les invertébrés. En effet, l'existence des molécules comme les FREPs ou comme la cytokine MIF donne de l'importance à ce modèle et pose des questions d'un intérêt capital sur l'origine évolutive de l'immunité des vertébrés. De plus, l'application récente des techniques d'invalidation de gènes comme le RNAi au mollusque *B. glabrata* ainsi que le séquençage de son génome permet d'envisager une meilleure compréhension de son immunité et des applications possibles de ces connaissances à la lutte contre les parasites dont il est le vecteur.

V. OBJECTIFS DE L'ETUDE SUR LES CYTOKINES MIF CHEZ LE MOLLUSQUE *B. glabrata.*

L'identification de l'orthologue de la cytokine MIF chez le mollusque *B. glabrata* (*Bg*MIF) nous a incités à déterminer son rôle dans l'immunité innée chez cet invertébré. Ce projet se divise en plusieurs objectifs :

- **Caractériser la structure et la fonction de *Bg*MIF** pour déterminer s'il possède les propriétés des membres de la famille MIF et notamment une activité enzymatique dopachrome tautomérase, la capacité de stimuler la prolifération cellulaire et d'inhiber l'apoptose. Pour ce faire, la validation de la lignée cellulaire *Bg*e du mollusque comme outil pour l'étude de *Bg*MIF est nécessaire.
- **Déterminer le rôle de *Bg*MIF dans la réponse immune du mollusque au parasite *S. mansoni***. Cet objectif implique notamment le développement de la RNAi pour permettre l'invalidation de l'expression de *Bg*MIF *in vitro* et *in vivo*.

Au cours de cette étude une deuxième isoforme de MIF, *Bg*MIF2 a été identifié chez le mollusque, soulevant la possibilité d'une spécialisation fonctionnelle entre les deux isoformes. Les objectifs à remplir pour étudier cette question sont :

- **Caractériser la structure et la fonction de *Bg*MIF2** pour vérifier qu'il se comporte également comme un membre de la famille MIF.
- **Déterminer le rôle éventuel de *Bg*MIF2 dans la réponse du mollusque aux sporocystes de *S. mansoni*** en comparaison avec *Bg*MIF.
- **Explorer un rôle éventuel des deux isoformes dans la réponse anti-bactérienne du mollusque**

Cette étude a donné lieu à une publication dans la revue PLoS Pathogens pour la partie sur *Bg*MIF (première partie des résultats) et à une deuxième publication en préparation sur la partie concernant la caractérisation de *Bg*MIF2 et sa comparaison fonctionnelle avec *Bg*MIF (deuxième partie des résultats).

RESULTATS

I. CARACTERISATION DE L'ACTIVITE ET DE LA FONCTION DE *Bg*MIF.

Les résultats présentés à continuation sous forme d'article (publié dans la revue PLoS Pathogens) font partie de la première étude fonctionnelle d'une cytokine chez le mollusque *B. glabrata*. Il s'agit de l'orthologue de la cytokine de mammifère *Bg*MIF.

Pour aborder l'étude de l'activité et de la fonction de *Bg*MIF nous avons produit en premier une protéine recombinante en système bactérien ce qui nous a permis d'une part démontré l'existence d'une activité enzymatique tautomerase pour *Bg*MIF et deuxièmement la présence des activités biologiques espérées pour une cytokine MIF (induction de la prolifération cellulaire et inhibition de l'apoptose dépendante de p53). Pour l'étude de l'activité biologique et de la fonction de *Bg*MIF in vitro, nous avons établie un modèle biologique utilisant la lignée cellulaire de *B.glabrata*, les cellules *Bg*e (pour *B. glabrata* embryonic cells).

L'étude de la fonction *in vitro*, avec l'utilisation de la technique de RNAi, nous a permis de démontrer que *Bg*MIF est impliqué dans la régulation de la réponse cellulaire face à un stimulus parasitaire. En effet les cellules *Bg*e changent de forme et comportement (phénotype d'agrégation cellulaire) en présence des ESP de *S. mansoni* ce qui est corrélé à une activation de *Bg*p38. Le phénotype d'agrégation cellulaire et l'activation de *Bg*p38 sont inhibés avec le traitement des cellules avec du dsRNA de *Bg*MIF (dsMIF) mais pas avec du dsLuc (dsRNA non relevant). De la même façon les cellules Bge traitées avec du dsMIF n'encapsulent pas les sporocystes de *S.mansoni* mis en co-culture 72heures après.

En ce qui concerne la fonction de *Bg*MIF *in vivo*, l'injection de dsMIF des mollusques et l'ultérieure infection avec de miracidiums de *S. mansoni* inhibe le changement dans la population hémocytaire, qui est observée en conditions normales d'infection et avec un traitement avec du dsLuc. Cette absence dans le changement dans la population hémocytaire, (dû à la migration des granulocytes vers les tissus infectés) se traduit en une plus grande quantité de sporocystes primaires implantés dans les mollusques dsMIF en comparaison avec les mollusques non traités ou traités avec du dsLuc.

L'ensemble de ces résultats démontrent l'existence d'un orthologue de MIF chez *B. glabrata,* qui possède les activités attendues pour une molécule MIF et qui régule la réponse immune de ce mollusque lors d'une infection parasitaire.

II. IMPLICATION DE LA CYTOKINE MIF2 DANS L'IMMUNITE INNEE DU MOLLUSQUE D'EAU DOUCE *B.GLABRATA*

Les travaux présentés dans cette deuxième partie des résultats se focalisent sur l'étude fonctionnelle d'une seconde molécule MIF chez *B. glabrata*, appelée *B*gMIF2. Ces travaux sont présentés ensuite sous forme d'article scientifique (en préparation), mais plusieurs expériences complémentaires doivent être réalisées. Ces résultats montrent que *Bg*MIF2 appartient à la famille de MIF et présente les principaux résidus d'acide aminé et une activité tautomerase qui caractérisent les MIF. Ensuite, ils montrent la localisation de *Bg*MIF2 dans les cellules hémocytaires du mollusque et dans les cellules *Bg*e, révélant une expression apparemment équivalente dans les deux principaux types cellulaires, les granulocytes et les hyalinocytes. Ceci constitue la première différence entre les deux MIF du mollusque.

Nous avons démontré aussi que la protéine *Bg*MIF2 n'est pas sécrétée par les cellules *Bg*e en contact avec des ESP de *S. mansoni* mais qu'elle est sécrétée lorsque les cellules sont mises en contact avec du LPS, suggérant une fonction dans la réponse antibactérienne, à différence de *Bg*MIF. Sur cette base nous avons utilisé le RNAi *in vitro* avec les cellules *Bg*e et nous avons démontré que *Bg*MIF2 n'est pas impliqué *a priori* dans la réponse antischistosome car les cellules traitées avec du dsMIF2 sont capables d'encapsuler les sporocystes en co-culture. De plus, le même traitement provoque une baisse significative du pourcentage de phagocytose dans les cellules *Bg*e par rapport aux cellules traitées avec du dsLuc ou du dsMIF. Les expériences d'infection *in vivo* montrent que le transcrit et la protéine de *Bg*MIF2 ne sont pas modifiés au cours de l'infection mais que ceux de *Bg*MIF expérimentent une baisse importante au bout des 24 premières heures de l'infection.

Les expériences de RNAi *in vivo* sont, quant à elles, contradictoires puisque les mollusques traités avec du dsMIF2 sont moins efficaces dans l'élimination des bactéries (dix fois plus de bactéries par mollusque) que les mollusques traités avec du dsMIF ou dsLuc. Par contre, les mollusques traités avec du dsMIF2 ont la même quantité de sporocystes primaires (Sp1) que les mollusques traités avec du dsMIF, ce qui montrerait aussi une implication de *Bg*MIF2 dans la réponse antischistosome *in vivo*.

Ces résultats montrent, même si des expériences complémentaires sont en cours, que *Bg*MIF2 est impliqué dans la régulation de la réponse antibactérienne du mollusque tandis

que *Bg*MIF est impliqué dans la réponse antiparasitaire, ce qui montrerait une spécialisation de la réponse immune du mollusque gouvernée par deux cytokines MIF.

Involvement of the cytokine MIF2 in the innate immunity of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*

Alvaro Baeza Garcia[*], Benjamin Gourbal[‡], Colette Dissous[*], Elisabeth Werkmeister[§] Christine Coustau[*†] and Raymond J Pierce[*¶].

[*] Institut Pasteur de Lille, CIIL, F-59019 Lille, France ; Inserm, U 1019, F-59019 Lille, France; Univ Lille Nord de France, F-59000 Lille, France; CNRS, UMR 8204, F-59021 Lille, France.

[‡] UMR 5244 CNRS-EPHE- UPDV, Université Perpignan Via Domicia, 66860 Perpignan, FR

[§]MICPaL Facility IFR 142-CNRS UMR 8161, Institut Pasteur de Lille - 59019 Lille, FR

[¥] UMR 6243 INRA-CNRS-UNSA, Centre Sophia Agrobiotech, 06903 Sophia Antipolis, FR

[†]Present address: UMR 6243 INRA-CNRS-UNSA, Centre Sophia Agrobiotech,

06903 Sophia Antipolis, FR

[¶]To whom correspondence should be addressed. E-mail: raymond.pierce@pasteur-lille.fr

ABSTRACT

We recently demonstrated that the mollusk *Biomphalaria glabrata* possesses an orthologue of the mammalian cytokine MIF (Macrophage Migration Inhibitory Factor), *Bg*MIF. We demonstrated that *Bg*MIF had the characteristics of a typical MIF (tautomerase activity, induction of cell proliferation, inhibition of apoptosis) and that it was involved in the snail immune response towards infection by the platyhelminth parasite *Schistosoma mansoni*. Further investigation of the available EST and genomic sequences of *B. glabrata* led to the identification of a second MIF ortholog, *Bg*MIF2. Here we report the functional characterization of this MIF that, like *Bg*MIF, possesses a tautomerase enzymatic activity and clearly belongs to MIF family. However, it has a different expression pattern in snail

hemocytes and in contrast to *Bg*MIF, *in vitro* and *in vivo* knock-down of *Bg*MIF2 suggest that it is involved in the response to bacterial infection.

INTRODUCTION

Protostomian invertebrates (about two million species) have evolved for more than six hundred million years, often surviving very hostile environments. They have developed a variety of active immune mechanisms to efficiently recognize and respond to non self antigens [1]. These mechanisms have for a long time been considered primitive and distant from the vertebrate immune systems [2]. Nevertheless, recent work showing for example, the similarities between the Toll/IL-1 and TLR (Toll like receptors) receptors and their signaling pathways [3] [4], have demonstrated that immune systems of invertebrates and vertebrates share striking similarities [5] [6]. The studies of the immune system mechanisms of invertebrates have principally used the insect *Drosophila melanogaster,*a member of the Ecdysozoan clade, that has allowed the discovery of Toll and Imd pathways for example [7].

Another major invertebrate group, within the Lophotrochozoan clade, with about 40,000 species is the Mollusk phylum. Mollusks support the development of approximately 18,000 nominal species of digenetic trematodes. Some of these trematodes are human parasites, for example *Schistosoma mansoni* causes intestinal schistosomiasis (two hundred million infected people in 74 countries) and uses the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* as its intermediary host [8]. In spite of its importance in parasite transmission to humans and the possible insights this model could give into the evolution of innate immunity, the immune mechanisms of this snail are poorly known [9]. Nevertheless, significant advances in this field have been made over the last ten years, due in large part to proteomic [10-13] and

functional genomic studies [14-19]. In addition the sequencing of the *B. glabrata* genome has been initiated at Washington University [20].

In this context, we have recently characterized the activity and function of *Bg*MIF [21], a snail homologue of vertebrate cytokine MIF (Macrophage Migration Inhibitory Factor) a regulator of innate immunity in mammals [22]. We have studied the expression of *Bg*MIF in the whole snail and in hemocytes and the *B. glabrata* embryonic (*Bg*e) cell line. Using *Bg*e cells as an *in vitro* model we have demonstrated that *Bg*MIF possesses the principal activities of MIF family; tautomerase activity, cell proliferation induction and p53-mediated apoptosis inhibition. Using *in vitro* and *in vivo* RNAi approaches, we have demonstrated the involvement of *Bg*MIF in the regulation of the snail immune response to an infection by *S. mansoni* [21].

In the course of further screening of *B. glabrata* sequence databases we identified another MIF ortholog. Here we report the functional characterization of this second snail MIF, *Bg*MIF2, which also possesses a tautomerase enzymatic activity but has a different expression pattern in snail hemocytes compared to *Bg*MIF. Furthermore, in contrast to *Bg*MIF, *in vit*ro and *in vivo* knockdown of *Bg*MIF2 using RNAi shows that it is involved in the response to bacterial infection.

MATERIALS AND METHODS

Ethics statement All animal experimentation was conducted following the Nord-Pas de Calais Region and the Pasteur Institute of Lille guidelines for housing and care of laboratory animals and performed in accordance Institutional regulations after review and approval by the Nord-Pas de Calais Region (Authorization No.A59-35009) and Pasteur Institute (Authorization No. AF/2009) Animal Care and Use Committees.

Animals and cells. *B. glabrata* snails (albino strain) and a Puerto-Rican strain of *S. mansoni* were maintained as described [21]. Miracidia were isolated from infected hamster livers and maintained in complete Chernin's balanced salt solution [23] (CBSS supplemented with 1mg/ml glucose and 1mg/ml trehalose) for 48h to achieve *in vitro* transformation into mother sporocysts as described in [24]. Mother sporocysts and/or excretory-secretory products (ESP)-containing CBSS were then collected and used. The *B. glabrata* embryonic (*Bge*) cell line (ATCC CRL 1494; Rockville, MD), was maintained at 26 °C under normal atmospheric conditions in complete *Bge* medium [25], supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Sigma), and antibiotics (100 U/ml penicillin G; 0.05 g/ml streptomycin sulphate, 25 µg/ml amphotericin B, Sigma).

RNA, cDNA and protein extraction. Total RNA and protein from individual snails or Bge cells was extracted using the TRIZOL® reagent (Invitrogen) as previously described [21]. For hemocytes the collected hemolymph [26] was divided in two tubes for extraction of protein and for extraction of RNA. cDNA synthesis was as previously described [21].

Molecular cloning of *Bg*MIF2 and vectors. A partial cDNA sequence (EST GenBank™ accession number: ES487700.1) was used to design specific primers and perform 5′ and 3′ RACE amplification (SMART RACE cDNA Amplification kit, Clontech) according to the manufacturer's instructions. The complete *Bg*MIF2 coding sequence was then amplified using primers containing XhoI and XbaI restriction sites respectively (see Supplementary data Table 1 for primer sequences). The PCR products were digested and cloned into the bacterial expression vector pET303 Ct-His (Invitrogen) (*Bg*MIF2 construct). Sequence alignments and analysis were carried out using the DNAStar Lasergene programme package and the BioEdit v7.0.1 package (http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html).

For phylogenetic analysis, multiple amino acid sequence alignments were performed using 3DCoffee [27]. The maximum likelihood tree was obtained with PhyML [28] at LIRMM (http://www.phylogeny.fr/) using the WAG model of substitution with four substitution rate categories and estimated gamma shape parameter and proportion of invariant sites. Branch support values were based on 100 replicates for PhyML.

Protein expression and production of recombinant proteins. Recombinant C-terminally His-tagged full-length r*Bg*MIF2 fusion protein was expressed using the pET303 Ct-His vector in *E. coli* BL21 (DE3) pLys strain exactly as for BgMIF [21].

Enzymatic assay. Tautomerase activity was measured using a D-dopachrome tautomerase assay as described previously [29], [30]. Briefly, a fresh solution of D-dopachrome methyl ester was prepared by mixing 4 mM L-3,4-dihydroxyphenylalanine methyl ester with 8mM sodium periodate for 5 min at room temperature and then placed on ice 20 min before use. Activity was determined at room temperature by adding D-dopachrome methyl ester to a cuvette containing 50mM r*Bg*MIF2, *Bg*MIF [21] or a commercial mammalian MIF (mouse MIF), rMmMIF (R&D systems), in 25mM potassium phosphate buffer pH 6.0 and, 0.5mM EDTA. For the inhibition assays the MIF inhibitor, (*S,R*)-3-(4-hydroxyphenyl)-4,5-dihydro-5-isoxazole acetic acid methyl ester (ISO-1, Merck) was dissolved in Me_2SO at various concentrations and added to the cuvette with r*Bg*MIF2 prior to the addition of the dopachrome. The decrease in absorbance at 475nm was monitored for 5 min using a UV/visible Spectrophotmeter Ultraspec 2100 (Amersham).

Antibodies and Western-blots. Antibodies used in this study were as follows: anti-Actin (Abcam). An anti *Bg*MIF2 antiserum was produced in a rabbit using the Ac-CYLYTNKKESELKDG-amide, Ac-ELDLPAERCVIVYTDLD-amide peptides and the

polyclonal sera were purified using a peptide linked resin column (Proteogenix). Western blots were carried out as previously [21].

Expression studies. For real-time PCR analyses total RNA (1µg of RNA from a 5 snail pool and one tenth of the RNA obtained from $2x10^5$ *Bge* cells was reverse transcribed using SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen). For Q-PCR analyses, cDNAs used as templates were amplified using the SYBR Green Master Mix (Invitrogen) and the ABI PRISM 7000 sequence detection system (Applied Biosystems). Primers (Sup. Table 1) specific for *B. glabrata* ribosomal protein S19 (Genbank accession number: CK988928 [31]), and *Bg*MIF2 (Genbank accession number: GQ118971), were designed by the Primer Express Program (Applied Biosystems) and used for amplification in triplicate assays.

For the protein expression the whole snail were homogenized at 4°C with Tris-buffered saline. The cellular debris was pelleted and the supernatants were adjusted for protein concentration, diluted with reducing SDS-PAGE sample buffer and 15µg of total protein was analyzed by SDS-PAGE and western blotting as described above.

Immunolocalisation of *BgMIF2* in cells. For immunolocalisation assays, circulating haemocytes or *Bge* cells were extracted or cultured as described above and allowed to adhere to glass slides, washed with PBS, fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min and permeabilised by a 4 min treatment with Triton X-100 at 0.1%. Slides were saturated for 90 min with PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA) and normal goat serum (1/50) at room temperature (RT). This blocking step was followed by an overnight incubation with rabbit anti-*Bg*MIF polyclonal serum (diluted at 1/100 in PBS-BSA 1%). After three washes the slides were incubated with goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 IgG (1/500 in PBS-BSA 1%, Molecular Probes) for 2 h at room temperature (RT). Slides were then stained with Hoechst

33342 and rhodamine-labeled phalloidin (1/1000 in PBS, Sigma) for 10 min at RT, washed and mounted with Fluoromont G (Interchim). For control slides, anti-*Bg*MIF2 polyclonal serum was incubated with the peptides used as immunogens for 1h at RT and the slides were then treated as described above. Samples were analysed by confocal microscopy using a LSM 710 inverted microscope (Zeiss).

Confocal microscopy. All the confocal imaging was performed with a LSM710 microscope (Zeiss) and a Plan Apochromat objective (63x 1.4 NA oil immersion). The associated software (Zen 2008) enabled the adjustment of acquisition parameters. The rhodamine (red) signal was excited at 561 nm and emission was collected from 570 to 700 nm. The Alexa488 (green) signal, in contrast, was excited at 488 nm and emission was collected from 490 to 530 nm. The nuclear Hoechst dye signal was excited at 405 nm and emission was collected from 410 to 470 nm. Fluorescent signals were collected sequentially, with a 4 lines average, and resulting images are 2048x2048 (or 1024x1024) pixels in size. By setting the photomultiplier tubes and the pinhole size (1 AU) correctly, there was no signal bleed-through. The images were treated with ImageJ (NIH) and Photoshop CS3 (Adobe).

RNA interference assays in *Bge* cells. The methods used for RNA interference in *Bge* cells, treatment with ESP and interaction with sporocysts have been described extensively [21].

For phagocytosis experiments, after dsRNA treatment, the medium was replaced by fresh medium and about 10^7 Alexa 488 conjugates of heat killed *E. coli* (Molecular Probes) were added to 10^6 *Bge* cells on cover slips and incubated at room temperature for 15 min and 1 hour at 26°C. Immuno-fluorescence microscopy assays were done as described above but only Hoechst 33342 and rhodamine-labeled phalloidin treatment was done. Sequential

optical sections of 1 µm each were collected and analysed . The phagocytic index was calculated as the ratio of the number of immune competent cells containing fluorescent bacteria against the total number of cells in each field. For each assay at least 10 fields were analysed.

RNA interference assays in whole snails. The treatment of whole *B. glabrata* snails with dsRNA and subsequent infection with *S. mansoni* miracidia were as described [21]. In order to determine the number of mother sporocysts (Sp1) present in the head–foot region of infected snails, mollusks were fixed 15 days post-exposure as described[32, 33].

Infection of whole snails with *S. marcescens*. The *S. marcescens* strain Db10 was isolated originally from a moribund fly (Db is for *Drosophila* bacterium) [34]. Db10 strains expressing DsRed were obtained by transformation with the plasmids pEP931-DsRed-Gn^r (gentamicin resistance), kindly provided by Dr. E. Pradel (Institut de Biologie de Lille). For infections overnight cultures of DsRed labeled *S. marcescens* cultures were grown exponentially at 30°C in LB (Luria Bertani broth, Sigma) complemented with gentamicin at 10µg/ml (Euromedex). The culture was diluted in complete CBSS at appropriate dilution and snails were injected with 1,3x10^3 colony-forming units (CFU) of *S. marcescens* Db10-dsRed into the cardiac sinus, using a 50µl Hamilton syringe with a 26s needle (Hamilton). The snail shell was removed and the body was crushed in 0.5 ml of LB medium at various times after infection using a micropestle, and the homogenate was serially diluted in LB medium. The number of (CFU) per snail was determined through growth overnight at 30 °C on LB agar with gentamicin.

Statistical analyses. All data were expressed as mean plus or minus SE. The statistical significance of differences was assessed using the Mann–Whitney *U* test for nonparametric data or Student's *t*-test using the program StatView (Abacus Concepts). *P* values of less than .05, 0.01 or .001 were used to indicate statistical significance.

RESULTS AND DISCUSSION

***Bg*MIF2, a second member of MIF family with tautomerase activity in *B. glabrata*.** Alignment of MIF sequences shows that, like *Bg*MIF, *Bg*MIF2 contains an N-terminal catalytic proline (Pro2 that becomes Pro1 after cleavage of the N-terminal methionine) that is essential for tautomerase activity [29] (Figure 1A). With 28% peptide sequence identity to human MIF, *Bg*MIF2 is more conserved than *Bg*MIF [21] but less so than MIFs from the bivalve mollusks *Haliotis diversicolor sextus* (39%) and *Haliotis discus discus* (35%). Several invariant active site residues are conserved, such as Lys32 and Val106 (a Cys in *Bg*MIF and Leu in *Ixodes scapularis* MIF). The other invariant residues across the MIF family (Asp9, Pro56 and Leu88) are also conserved in *Bg*MIF2. In addition, analysis of its secondary structure shows that the *Bg*MIF2 protein is composed of four α-helices and four β-sheets as for other MIF family members including *Bg*MIF. In order to investigate the relationship between *Bg*MIF2 and the other MIFs we performed phylogenetic analyses on selected vertebrate and invertebrate proteins (Figure 1B). The phylogeny of MIFs indicates that *Bg*MIF2 is clearly grouped in the phylogenetic tree with *I. scapularis* MIF sequences and close to *Bg*MIF but is not closely related to other mollusk MIF (Figure 1B).

We next tested whether *Bg*MIF2 possesses tautomerase activity as described for *Bg*MIF and the other MIF family members [21]. We expressed *Bg*MIF2 as a recombinant protein (r*Bg*MIF2) in *E. coli*, and we used this to perform a tautomerase assay with a

recombinant mouse MIF (rMmMIF) and r*Bg*MIF as positive controls. The results showed that r*Bg*MIF2 possesses a tautomerase activity comparable to that of the mouse MIF protein and r*Bg*MIF (Figure 2). One major difference was that, in contrast to *Bg*MIF the r*Bg*MIF2 protein treated with 100µM of ISO-1 was not inhibited, ([21] and data not shown). ISO-1 has been shown to bind to the same position in the active site as one of the MIF substrates, p-hydroxyphenylpyruvic acid [30]. Five amino acid residues are particularly important in this interaction, the N-terminal proline, Lys32, Ile64, Tyr95 and Asn97 (in human MIF) [30]. Of these residues Pro1 and Lys32 are conserved in both *Bg*MIF and *Bg*MIF2, Ile64 is conserved in *Bg*MIF and substituted by another hydrophobic amino acid, Val, in *Bg*MIF2 and Tyr95 is substituted by Val in both *Bg*MIF and *Bg*MIF2. However, Asn97 is substituted by another basic amino acid, Lys, in *Bg*MIF but by Val in *Bg*MIF2. Disruption of the interaction between ISO-1 and Asn97 by methylation of the former abolishes the inhibition [30]. Therefore, it could be hypothesized that the substitution of Asn97 by an uncharged, hydrophobic residue may also abolish the inhibition, but that it is maintained when the substitution is by another basic residue, as in the case of *Bg*MIF. This hypothesis predicts that the MIFs of *I. scapularis* and *P. marinus* (Asn97 substituted by Ala, Figure 1A) should not be inhibited by ISO-1 and that the substitution of Val97 in *Bg*MIF2 by Asn or Lys should restore the inhibition by ISO-1.

As we previously pointed out, the role of the tautomerase activity in the biological function of MIF is far from clear. However, this is highly conserved and exhibited by both the snail isoforms, so it could be assumed to be important, perhaps in binding to CD74, the MIF receptor [43] although the *B. glabrata* MIF receptor remains to be characterized. The suggestion that the enzyme activity is a vestige of a function in invertebrate melanotic encapsulation [44] is contradicted by its conservation in vertebrates and by the absence of melanization in *B. glabrata*.

10

***Bg*MIF2 is expressed by snail immune defense cells.** Rather than being produced "on demand" like most cytokines, MIF is constitutively expressed in mammalian cells and its secretion induced by inflammatory stimuli like endotoxin, TNF-α or hormones [22]. The types of cell that stock MIF include those involved in the first line of defense such as macrophages [35], neutrophils and monocytes [22]. BgMIF was found to be present in both hemocytes and in the *B. glabrata* Bge cell line [21]. We examined the expression of *Bg*MIF2 in *B. glabrata* circulate hemocytes and in *Bg*e cells using an antiserum raised against two peptides derived from the *Bg*MIF2 sequence. Immunolocalisation analyses showed that *Bg*MIF2 is expressed in cytoplasm of hemocytes and *Bg*e cells. *Bg*MIF2 was found to be abundant in well spread hemocytes, termed granulocytes, and, unlike BgMIF, in unspread hemocytes or hyalinocytes [36], [37] (Figure 3 A-C).

The hemocyte-like properties of *Bg*e cells [38] include the capacity to recognize and phagocyte or encapsulate foreign materials that include larval trematodes [39] and we recently showed that *Bg*MIF expression was necessary for the *in vitro* encapsulation of *S. mansoni* sporocysts [21]. Moreover, the secretion of BgMIF by Bge cells was stimulated by *S. mansoni* ESP. Here we showed that *Bg*MIF2 is localized in these cells in the cytoplasm (Figure 3 D-F). However, in contrast to *Bg*MIF, *Bg*e cells do not release *Bg*MIF2 when they are cultured in the presence of *S.mansoni* ESP but *Bg*MIF2 secretion is induced by LPS (Figure 3G-H).

The differences in cellular distribution and secretion patterns of the snail MIF isoforms suggest a difference in their functions. Notably, the secretion of *Bg*MIF2 may indicate a role in response to infection by bacteria. To test this we decided to determine the function of *Bg*MIF2 by knocking down its expression and testing the response of *Bg*e cells and snails toward the parasite *S. mansoni* and toward bacterial infections.

***Bg*MIF2 is not implicated in the response to *S. mansoni* sporocysts *in vitro*.** In order to determine whether *Bg*MIF2 might have a role in the response of *Bg*e cells to *S. mansoni* sporocysts, we next treated *Bg*e cells with dsRNA against *Bg*MIF2 (dsMIF2) or against *Bg*MIF2 and *Bg*MIF at the same time (dsMIF2/dsMIF) or against luciferase (dsLuc) as an unrelated control and determined the effect of *Bg*MIF2 KD on the capacity of *Bg*e cells to encapsulate *S. mansoni* sporocysts [38], [39]. The efficiency of *Bg*MIF2 knock-down (KD) was confirmed by the marked decrease of *Bg*MIF2 (85%) transcripts observed after a 3 day incubation with dsMIF2 or with dsMIF2/dsMIF (70%) as compared to incubation with dsLuc (Figure 4 A). To *Bg*e cells treated with dsMIF2 or dsLuc for 72h we added 48h *in vitro*-transformed sporocysts and followed interaction of *Bg*e cells with sporocysts for a further 72h. In contrast to dsMIF [21] and dsMIF/dsMIF2, which showed a markedly reduced ability to encapsulate the sporocysts, dsMIF2 treated *Bg*e cells, (as well as dsLuc treated and control *Bg*e cells) readily migrated towards and encapsulated the sporocysts (Figure 5A). The proportion of encapsulated sporocysts was indeed significantly reduced ($p<0.05$) in dsMIF/dsMIF2 treated *Bg*e cells compared to dsLuc and dsMIF2 treated cells or untreated control cells (Figure 5B).

As the *in vitro* conditions are not necessarily representative of the response *in vivo* we performed experimental infections of dsMIF2 treated and control snails with *S. mansoni* miracidia and 15 days after infection we estimated the levels of infection. We observed that, surprisingly, dsMIF2 treated snails allowed the establishment of significantly more parasites than dsLuc treated and untreated control snail (data not shown). This result is similar to that obtained after the *in vivo* knockdown of *Bg*MIF and suggests that the *in vitro* encapsulation reaction may not be relevant to the response of snails to infection by sporocysts. Although the *in vivo* encapsulation reaction is characteristic of the response of the snail to incompatible

parasite strains [13] the "encapsulation" of primary sporocysts by *Bg*e cells *in vitro* is not necessarily deleterious to the parasite, and is even necessary to its development [24]. Therefore, the secretion of MIF by *Bg*e cells in response to *S. mansoni* ESP may be a signal of activation, but not necessarily of an immune effector phenotype.

Bg*MIF2 but not *Bg*MIF is implicated in the response to bacterial infection *in vitro. Our demonstration that *Bg*MIF2 is secreted by *Bg*e cells incubated with LPS led us to determine the implication of *Bg*MIF2 in the response to bacteria *in vitro* using RNAi to decrease the transcript expression in *Bg*e cells. dsMIF2, dsMIF and dsLuc treated cells were co-incubated with heat-inactivated fluorescently labeled *E.coli* for 15min and 1h to determine their phagocytic index (Figure 6A). RNAi mediated KD of *Bg*MIF2 decreased the phagocytic capacity of the *Bg*e cells by about 30%, compared to cells treated with dsLuc or dsMIF and control cells (Figure 6B). *Bg*MIF2 is therefore likely to be implicated in the response to bacteria *in vitro*, unlike *Bg*MIF. In contrast to the *in vitro* encapsulation response, in which MIF secretion may not be correlated with an effector phenotype, the secretion of *Bg*MIF2 in response to LPS correlates with the stimulation of phagocytosis by *Bg*e cells. Therefore, this *in vitro* activity should correlate with the *in vivo* role of *Bg*MIF2.

Bg*MIF2 but not *Bg*MIF is implicated in the response to bacterial infection *in vivo. In order to assess the role of *Bg*MIF2 and *Bg*MIF in the immune response of *B. glabrata* to bacterial infection *in vivo*, we measured the expression *Bg*MIF2 and *Bg*MIF after bacterial infection using the opportunist bacteria *S.marcescens*, known to infect other invertebrates such as *C. elegans* [40] and *D.melanogaster* [41]. After injection with a suspension of *S.marcescens*, the levels of transcripts and protein of *Bg*MIF2 and *Bg*MIF in whole snails at were measured at different times. The levels of *Bg*MIF2 transcripts and protein were constant

after bacterial infection (Figure 7A). In contrast, the levels of *Bg*MIF transcripts and protein decreased dramatically 6h and 24h post-infection (Figure 7B).

We next determined the capacity of dsRNA treated snails to combat *S.marcescens* infection. We performed RNAi KD in whole snails by microinjecting 15µg dsMIF2, dsMIF or dsLuc into the cardiac sinus. *Bg*MIF2 and *Bg*MIF expressions were monitored three days after dsRNA injection. We observed a decrease in *Bg*MIF2 and *Bg*MIF transcripts and protein in both whole snails treated with dsMIF2 and dsMIF respectively, compared to dsLuc treated animals (Figure 4B). We then tested the effect of KD on the level of infection by *S.marcescens* at different times after infection. We observed that dsMIF2 treated snails had significantly more CFU per snail than dsMIF and dsLuc treated and untreated snails (Figure 8). These results further suggest that *Bg*MIF2 is implicated in the snail immune response against bacterial infection but that *Bg*MIF is not.

Therefore, although the *in vivo* KD of BgMIF2 suggests that this cytokine may contribute to the immunity towards parasites, it seems clearly that there is a functional difference between the two snail MIFs. In vertebrates this dichotomy is not observed and they possess only one copy of a MIF-related gene [22]. In contrast the invertebrates express distinct MIF related genes, for example, the parasitic nematodes express at least two MIF molecules [42], the free-living nematode *C. elegans* has 4 MIF genes [43] and genomic analyses reveal that the sea urchin possesses 7 MIF genes [44]. However, in none of these cases do we have any information about functional differences between these MIFs. Our data suggests a functional specialization that may well be replicated in other invertebrates. Most studies of invertebrate MIFs to date have concerned those of parasites and their effect on the host immune system. The methodology we have established will allow further detailed investigation of the respective roles of the two snail MIFs. Since *B. glabrata* also expresses members of the immunoglobulin superfamily (FREPs,[45]) that may indicate an adaptive

immunity in the snail, this model may allow the exploration of the link between innate and adaptive immunity, which may involve MIF as proposed by Du et al. [46] and pave the way towards a better understanding of the immunity of this snail, its relationships with its pathogens and the evolution of immune systems.

REFERENCES

[1] Beschin A, Bilej M, Torreele E, De Baetselier P. On the existence of cytokines in invertebrates. Cell Mol Life Sci. 2001;58(5):801-14.

[2] Medzhitov R, Janeway CA. An ancient system of host defense. Current Opinion in Immunology. 1998;10(1):12-5.

[3] Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart J-M, Hoffmann JA. The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette spätzle/Toll/cactus Controls the Potent Antifungal Response in Drosophila Adults. Cell. 1996;86(6):973-83.

[4] Medzhitov R, Janeway CA. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. Current Opinion in Immunology. 1997;9(1):4-9.

[5] Bulet P, Hetru C, Dimarcq J-L, Hoffmann D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. Dev Comp Immunol. 1999;23(4-5):329-44.

[6] Eric SL, Coen MA, Si-Ming Z, Thomas BK. Invertebrate immune systems-not homogeneous, not simple, not well understood. Immunol Rev. 2004;198(1):10-24.

[7] Gobert V, Gottar M, Matskevich AA, Rutschmann S, Royet J, Belvin M, et al. Dual Activation of the Drosophila Toll Pathway by Two Pattern Recognition Receptors. Science. 2003;302(5653):2126-30.

[8] Steinmann P, Keiser J, Bos R, Tanner M, Utzinger J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. The Lancet Infectious Diseases. 2006;6(7):411-25.

[9] Bayne CJ. Successful parasitism of vector snail *Biomphalaria glabrata* by the human blood fluke (trematode) *Schistosoma mansoni*: A 2009 assessment. Mol Biochem Parasitol. 2009;165(1):8-18.

[10] Guillou F, Roger E, Moné Y, Rognon A, Grunau C, Théron A, et al. Excretory-secretory proteome of larval *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma caproni*, two parasites of *Biomphalaria glabrata*. Mol Bioch Parasitol. 2007;155(1):45-56.

[11] Bouchut A, Coustau C, Gourbal B, Mitta G. Compatibility in the Biomphalaria glabrata/Echinostoma caproni model: new candidate genes evidenced by a suppressive subtractive hybridization approach. Parasitology. 2007;134(04):575-88.

[12] Vergote D, Bouchut A, Sautière PE, Roger E, Galinier R, Rognon A, et al. Characterisation of proteins differentially present in the plasma of *Biomphalaria glabrata* susceptible or resistant to *Echinostoma caproni*. Int J Parasitol. 2005;35(2):215-24.

[13] Roger E, Mitta G, Moné Y, Bouchut A, Rognon A, Grunau C, et al. Molecular determinants of compatibility polymorphism in the *Biomphalaria glabrata*/*Schistosoma mansoni* model: New candidates identified by a global comparative proteomics approach. Mol Biochem Parasitol. 2008;157(2):205-16.

[14] Raghavan N, Miller AN, Gardner M, FitzGerald PC, Kerlavage AR, Johnston DA, et al. Comparative gene analysis of Biomphalaria glabrata hemocytes pre- and post-exposure to miracidia of Schistosoma mansoni. Mol Biochem Parasitol. 2003;126(2):181-91.

[15] Mitta G, Galinier R, Tisseyre P, Allienne JF, Girerd-Chambaz Y, Guillou F, et al. Gene discovery and expression analysis of immune-relevant genes from *Biomphalaria glabrata* hemocytes. Dev Comp Immunol. 2005;29(5):393-407.

[16] Guillou F, Mitta G, Galinier R, Coustau C. Identification and expression of gene transcripts generated during an anti-parasitic response in Biomphalaria glabrata. Dev Comp Immunol. 2007;31(7):657-71.

[17] Lockyer AE, Spinks JN, Walker AJ, Kane RA, Noble LR, Rollinson D, et al. Biomphalaria glabrata transcriptome: Identification of cell-signalling, transcriptional control and immune-related genes from open reading frame expressed sequence tags (ORESTES). Dev Comp Immunol. 2007;31(8):763-82.

[18] Lockyer A, Spinks J, Kane R, Hoffmann K, Fitzpatrick J, Rollinson D, et al. Biomphalaria glabrata transcriptome: cDNA microarray profiling identifies resistant- and susceptible-specific gene expression in haemocytes from snail strains exposed to Schistosoma mansoni. BMC Genomics. 2008;9(1):634.

[19] Adema CM, Hanington PC, Lun C-M, Rosenberg GH, Aragon AD, Stout BA, et al. Differential transcriptomic responses of Biomphalaria glabrata (Gastropoda, Mollusca) to bacteria and metazoan parasites, Schistosoma mansoni and Echinostoma paraensei (Digenea, Platyhelminthes). Mol Immunol. 2010;47(4):849-60.

[20] Raghavan N, Knight M. The snail (Biomphalaria glabrata) genome project. Trends Parasitol. 2006;22(4):148-51.

[21] Baeza-Garcia A, Pierce RJ, Gourbal B, Werkmeister E, Colinet D, Reichhart J-M, et al. Involvement of the cytokine MIF in the snail host immune response to the parasite *Schistosoma mansoni*. PLoS Pathog. 2010.

[22] Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. Nat Rev Immunol. 2003;3(10):791-800.

[23] Chernin E. Observations on hearts explanted in vitro from snail *Austrolabius glabratus*. J Parasitol. 1976;49353-64.

[24] Yoshino T, Laursen J. Production of *Schistosoma mansoni* daughter sporocysts from mother sporocysts maintained in synxenic culture with *Biomphalaria glabrata* embryonic (Bge) cells. J Parasitol. 1995;81(5):714-22.

[25] Hansen EL. Application of tissue culture of a pulmonate snail to culture of larval of *Schistosoma mansoni*. New York: Academic Press, 1976.

[26] Taede S, Lucie B. A comparative morphological and enzyme histochemical study on blood cells of the freshwater snails: *Lymnaea stagnalis*, *Biomphalaria glabrata*, and *Bulinus truncatus* J Morphol. 1980;165(1):31-9.

[27] O'Sullivan O, Suhre K, Abergel C, Higgins DG, Notredame C. 3DCoffee: Combining Protein Sequences and Structures within Multiple Sequence Alignments. J Mol Biol. 2004;340(2):385-95.

[28] Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, et al. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. Nucl Acids Res. 2008;36 (suppl_2):W465-9.

[29] Swope M, Sun H-W, Blake PR, Lolis E. Direct link between cytokine activity and a catalytic site for macrophage migration inhibitory factor. EMBO J. 1998;17(13):3534-41.

[30] Lubetsky JB, Dios A, Han J, Aljabari B, Ruzsicska B, Mitchell R, et al. The Tautomerase Active Site of Macrophage Migration Inhibitory Factor Is a Potential Target for Discovery of Novel Anti-inflammatory Agents. J Biol Chem. 2002;277(28):24976-82.

[31] Bouchut A, Roger E, Coustau C, Gourbal B, Mitta G. Compatibility in the Biomphalaria glabrata/Echinostoma caproni model: Potential involvement of adhesion genes. Int J Parasitol. 2006;36(2):175-84.

[32] Theron A, Coustau C, Rognon A, Gourbiere S, Blouin MS. Effects of laboratory culture on compatibility between snails and schistosomes. Parasitology. 2008;135(10):1179-88.

[33] Moné Y, Mitta G, Duval D, Gourbal BEF. Effect of amphotericin B on the infection success of Schistosoma mansoni in Biomphalaria glabrata. Exp Parasitol. 2010;125(2):70-5.

[34] Flyg C, Kenne K, Boman HG. Insect Pathogenic Properties of Serratia marcescens: Phage-resistant Mutants with a Decreased Resistance to Cecropia Immunity and a Decreased Virulence to Drosophila. J Gen Microbiol. 1980;120(1):173-81.

[35] Calandra T, Bernhagen J, Mitchell RA, Bucala R. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. J Exp Med. 1994;179(6):1895-902.

[36] Johnston LA, Yoshino TP. Larval *Schistosoma mansoni* excretory-secretory glycoproteins (ESPs) bind to hemocytes of *Biomphalaria Glabrata* (GASTROPODA) via surface carbohydrate binding Receptors. J Parasitol. 2001;87(4):786-93.

[37] Coustau C, Yoshino TP. Surface membrane polypeptides associated with hemocytes from *Schistosoma mansoni*-susceptible and -resistant strains of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda). J Invertebr Pathol. 1994;63(1):82-9.

[38] Coustau C, Yoshino TP. Flukes without snails: advances in the *in vitro* cultivation of intramolluscan stages of trematodes. Exp Parasitol. 2000;94(1):62-6.

[39] Ivanchenko MG, Lerner JP, McCormick RS, Toumadje A, Allen B, Fischer K, et al. Continuous *in vitro* propagation and differentiation of cultures of the intramolluscan stages of the human parasite *Schistosoma mansoni*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96(9):4965-70.

[40] Pujol N, Link EM, Liu LX, Kurz CL, Alloing G, Tan M-W, et al. A reverse genetic analysis of components of the Toll signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. Curr Biol. 2001;11(11):809-21.

[41] Kocks C, Cho JH, Nehme N, Ulvila J, Pearson AM, Meister M, et al. Eater, a Transmembrane Protein Mediating Phagocytosis of Bacterial Pathogens in *Drosophila*. Cell. 2005;123(2):335-46.

[42] Vermeire JJ, Cho Y, Lolis E, Bucala R, Cappello M. Orthologs of macrophage migration inhibitory factor from parasitic nematodes. Trends Parasitol. 2008;24(8):355-63.

[43] Marson AL, Tarr DEK, Scott AL. Macrophage migration inhibitory factor (mif) transcription is significantly elevated in Caenorhabditis elegans dauer larvae. Gene. 2001;278(1-2):53-62.

[44] Hibino T, Loza-Coll M, Messier C, Majeske AJ, Cohen AH, Terwilliger DP, et al. The immune gene repertoire encoded in the purple sea urchin genome. Devl Biol. 2006;300(1):349-65.

[45] Zhang S-M, Loker ES. Representation of an immune responsive gene family encoding fibrinogen-related proteins in the freshwater mollusc Biomphalaria glabrata, an intermediate host for Schistosoma mansoni. Gene. 2004;341255-66.

[46] Du J, Xie X, Chen H, Yang W, Dong M, Su J, et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) in chinese amphioxus as a molecular marker of immune evolution during the transition of invertebrate/vertebrate. Dev Comp Immunol. 2004;28(10):961-71.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. *Bg*MIF2 is a variant member of the MIF family. **(A)** Alignment of the *Bg*MIF2 (*Bg*MIF2; accession number: ACR81565.1) peptide sequence to MIFs from *Haliotis discus discus* (HddMIF; accession number: FJ435176), *Haliotis diversicolor sextus* (HdsMIF; EU284114), *Ixodes scapularis* (IsMIF; EEC11419), *Petromyzon marinus* (PmMIF; accession number: AA833793) and *Homo sapiens* (HsMIF; accession number: NM_002415). **(B)** Maximum-likelihood tree of *Bg*MIF2 and MIF proteins from selected species (Genbank accession numbers and name of species are shown on the tree). The tree obtained using MrBayes is shown (see methods). Numbers above branches are Bayesian Posterior Probability values (100000 replicates). Horizontal distances are proportional to percents of divergence between tip species and nodes (scale given), vertical distances are arbitrary. Only BPP values >0.5 are shown. M, Mollusks; N, Nematodes; V, Vertebrates

Figure 2: D-dopachrome tautomerase activity. Analysis of the D-dopachrome tautomerase enzymatic activity measured by loss in absorbance at 475nm and plotted against the concentration of 2-carboxymethylester-2,3-dihydroindole-5,6-quinone for 50nM r*Bg*MIF2 . MmMIF and *Bg*MIF at the same concentration were used as positive controls. Results shown are the means +/- S.D. of three independent experiments.

Figure 3: Expression of *Bg*MIF2. Immunolocalization of *Bg*MIF2 in hemocytes. Hemocytes were labeled with phalloidin (actin label) and Hoechst (A), with anti-*Bg*MIF2 and Hoechst (B) or all three labels (C). Scale bar represents 12 µm. (D-F) Immunolocalization of

*Bg*MIF2 in *Bg*e cells. Cells were labeled with phalloidin (actin label) and Hoechst (D), with anti-*Bg*MIF2 and Hoechst (E) or all three labels (F). Scale bar represents 12 µm. (G) Immunoblotting of *Bg*e cell culture supernatants with anti-*Bg*MIF antibody. Cells were exposed to increasing concentrations of *S. mansoni* ESP (30-480 µg/mL) (G) or bacterial LPS (0,1-100ng/ml) (H).

Figure 4. RNAi efficacy in *Bg*e cells and whole snails. (A) Relative expression ratios of *Bg*MIF2 transcripts in *Bg*e cells exposed for 3 days to Luc (dsLuc), *Bg*MIF2 (dsMIF2) or *Bg*MIF2 and *Bg*MIF (dsMIF2/dsMIF) dsRNA. Transcript levels were determined using real-time quantitative PCR (Methods). (B) Relative expression ratios of *Bg*MIF2 and *Bg*MIF transcripts and proteins in whole snails exposed for 3 days to Luc (dsLuc), *Bg*MIF2 (dsMIF2) or *Bg*MIF (dsMIF) dsRNA. Transcript levels were determined using real-time quantitative PCR (Methods) and protein levels of *Bg*MIF and actin were determined by western blotting.

Figure 5. ***Bg*MIF2 is not essential to promote *in vitro* encapsulation of *S. mansoni* sporocysts**. (A) Encapsulation response of *Bg*e cells in the presence of *in vitro* transformed *S. mansoni* sporocysts. Cells were exposed to Luc (dsLuc), *Bg*MIF2 (dsMIF2) or *Bg*MIF2 and *Bg*MIF (dsMIF2/dsMIF) dsRNA. Sporocysts are indicated with an arrow. Note that, in the dsMIF2/dsMIF culture, the sporocyst tegument remained easily visible and free of cells whereas in the control cultures, sporocysts became uniformly covered with *Bg*e cells. (B) Quantification of sporocysts encapsulated by dsRNA-treated or untreated *Bg*e cells. Sporocysts were deemed not to be encapsulated if *Bg*e cells were found adhering to less than 10% of their surface. Scale bar represents 10 µm. The results are expressed as the percentage of sporocysts that were encapsulated and are the mean ± SD of three independent experiments.

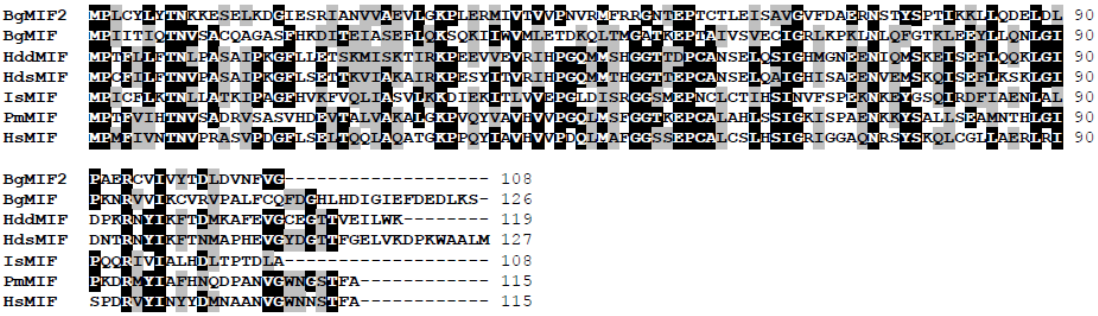
Figure 6. ***In vitro*** **phagocytosis of heat killed bacteria by dsRNA treated *Bg*e cells. (A)** Fluorescence microscopy of *Bg*e cells labeled with Hoechst (blue) and phalloidin (red) and incubated with Alexa488 labeled heat killed *E.coli* bacteria. Engulfed bacteria are co-localized with the red label (white arrows). **(B)** Effect of RNAi KD on phagocytosis of *E. coli* by *Bg*e cells at 15 min or 1hour of incubation. The phagocytic index was calculated as the ratio of the number of immune competent cells containing fluorescent bacteria against the total number of cells in each field. For each assay at least 10 fields were included.

Figure 7. *Bg*MIF2 and *Bg*MIF expression in snails infected with *S.marcenscens*. *Bg*MIF2 **(A)** and *Bg*MIF **(B)** transcripts and proteins content in whole snails after injection with *S.marcenscens*.

Figure 8. *Bg*MIF2 but not *Bg*MIF is implicated in the response to bacterial infection *in vivo*. Effect of *Bg*MIF2 or *Bg*MIF knockdown on *S.marcenscens* proliferation. Snails were injected with dsLuc, dsMIF2 or dsMIF dsRNA and 72 h later, were injected with $1{,}3x10^3$ CFU of *S.marcenscens*. After bacterial infection the quantity of CFU per snail was monitored at different times.

Figure 1

A.


BgMIF2
BgMIF
HddMIF
HdsMIF
IsMIF
PmMIF
HsMIF

B.

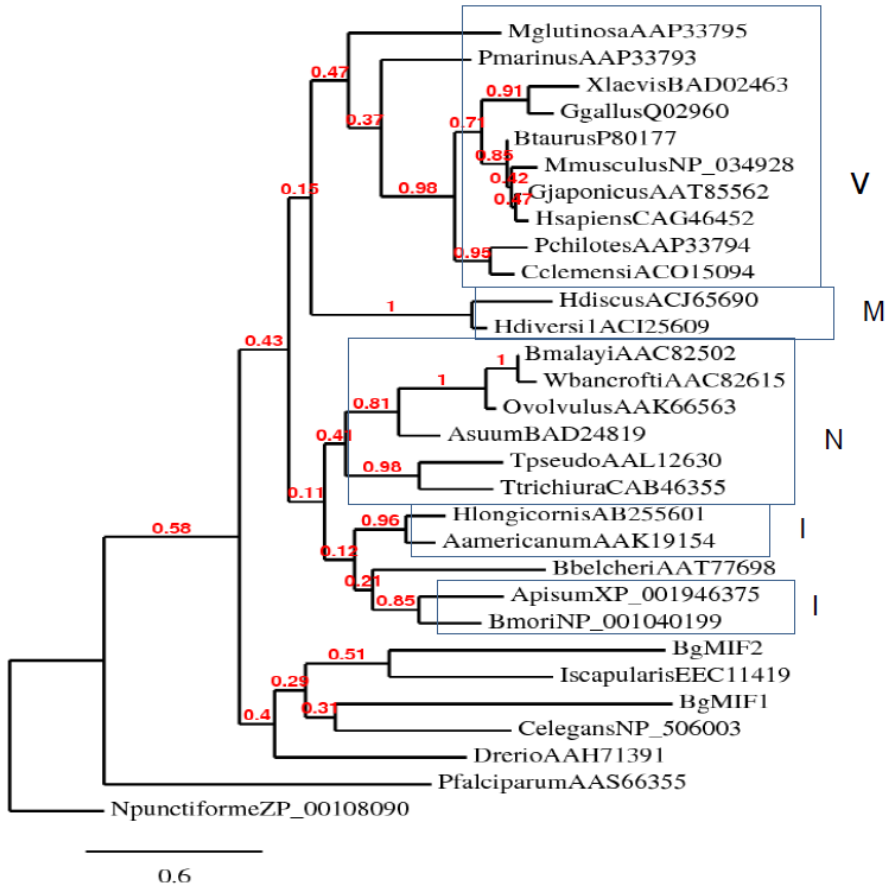

MglutinosaAAP33795
PmarinusAAP33793
XlaevisBAD02463
GgallusQ02960
BtaurusP80177
MmusculusNP_034928
GjaponicusAAT85562
HsapiensCAG46452
PchilotesAAP33794
CclemensiACO15094
HdiscusACJ65690
Hdiversi1ACI25609
BmalayiAAC82502
WbancroftiAAC82615
OvolvulusAAK66563
AsuumBAD24819
TpseudoAAL12630
TtrichiuraCAB46355
HlongicornisAB255601
AamericanumAAK19154
BbelcheriAAT77698
ApisumXP_001946375
BmoriNP_001040199
BgMIF2
IscapularisEEC11419
BgMIF1
CelegansNP_506003
DrerioAAH71391
PfalciparumAAS66355
NpunctiformeZP_00108090
V
M
N
I
I
0.6

Figure 2

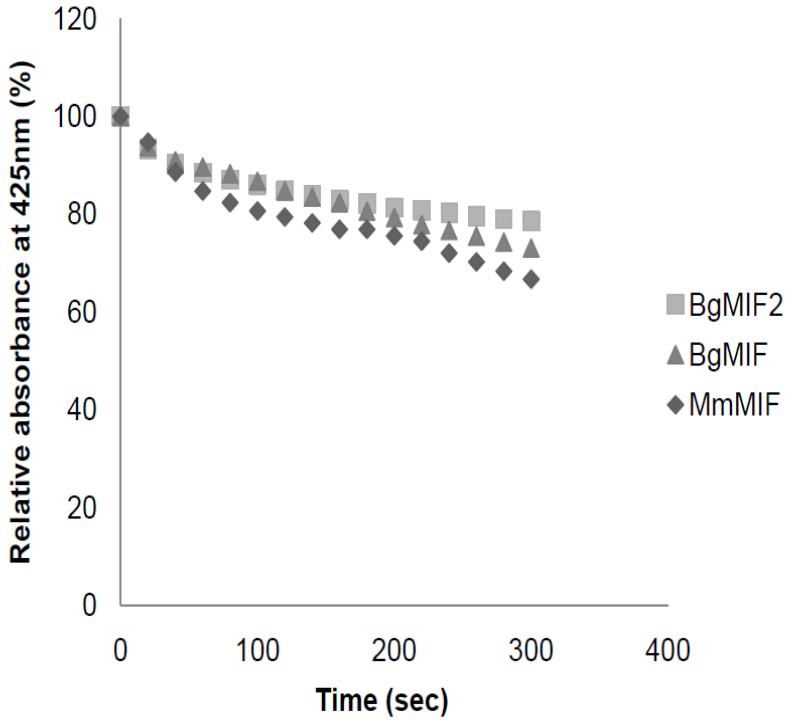
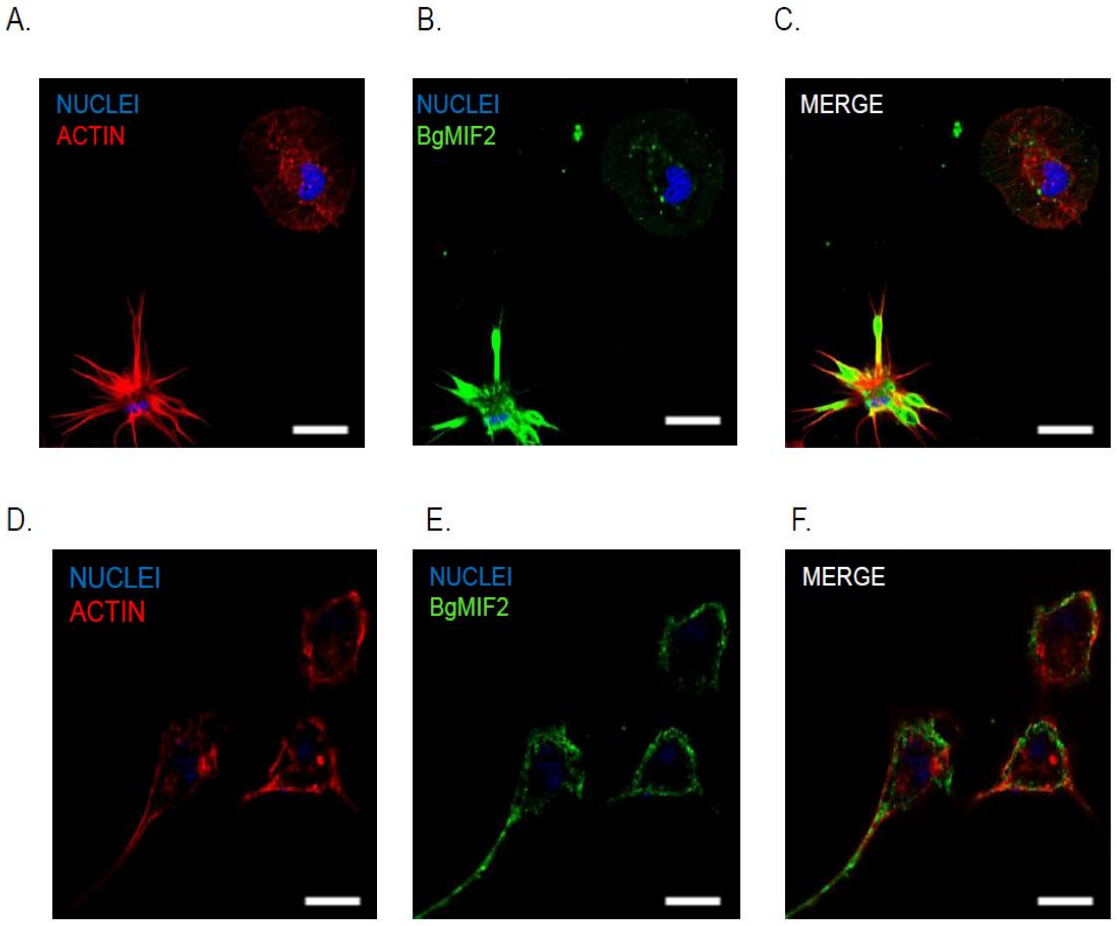
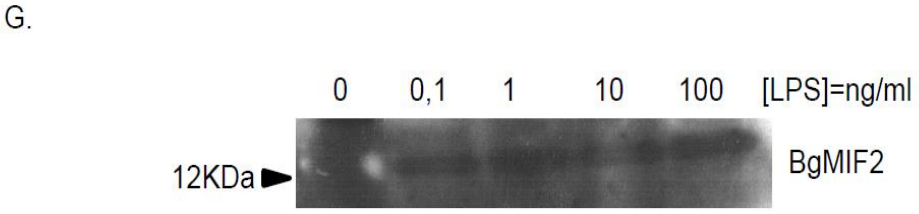

120
100
80
60
40
20
0
Relative absorbance at 425nm (%)
0
100
200
300
400
Time (sec)
BgMIF2
BgMIF
MmMIF

Figure 3


A.
B.
C.
NUCLEI
ACTIN
NUCLEI
BgMIF2
MERGE
D.
E.
F.
NUCLEI
ACTIN
NUCLEI
BgMIF2
MERGE


G.
0
0,1
1
10
100
[LPS]=ng/ml
12KDa
BgMIF2

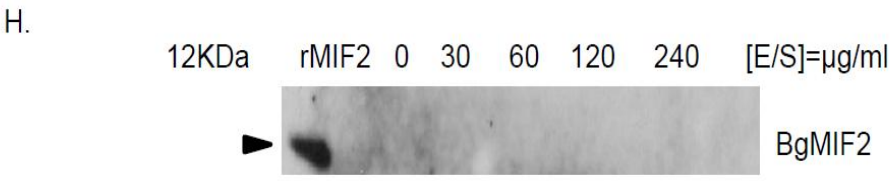

H.
12KDa
rMIF2
0
30
60
120
240
[E/S]=µg/ml
BgMIF2

Figure 4

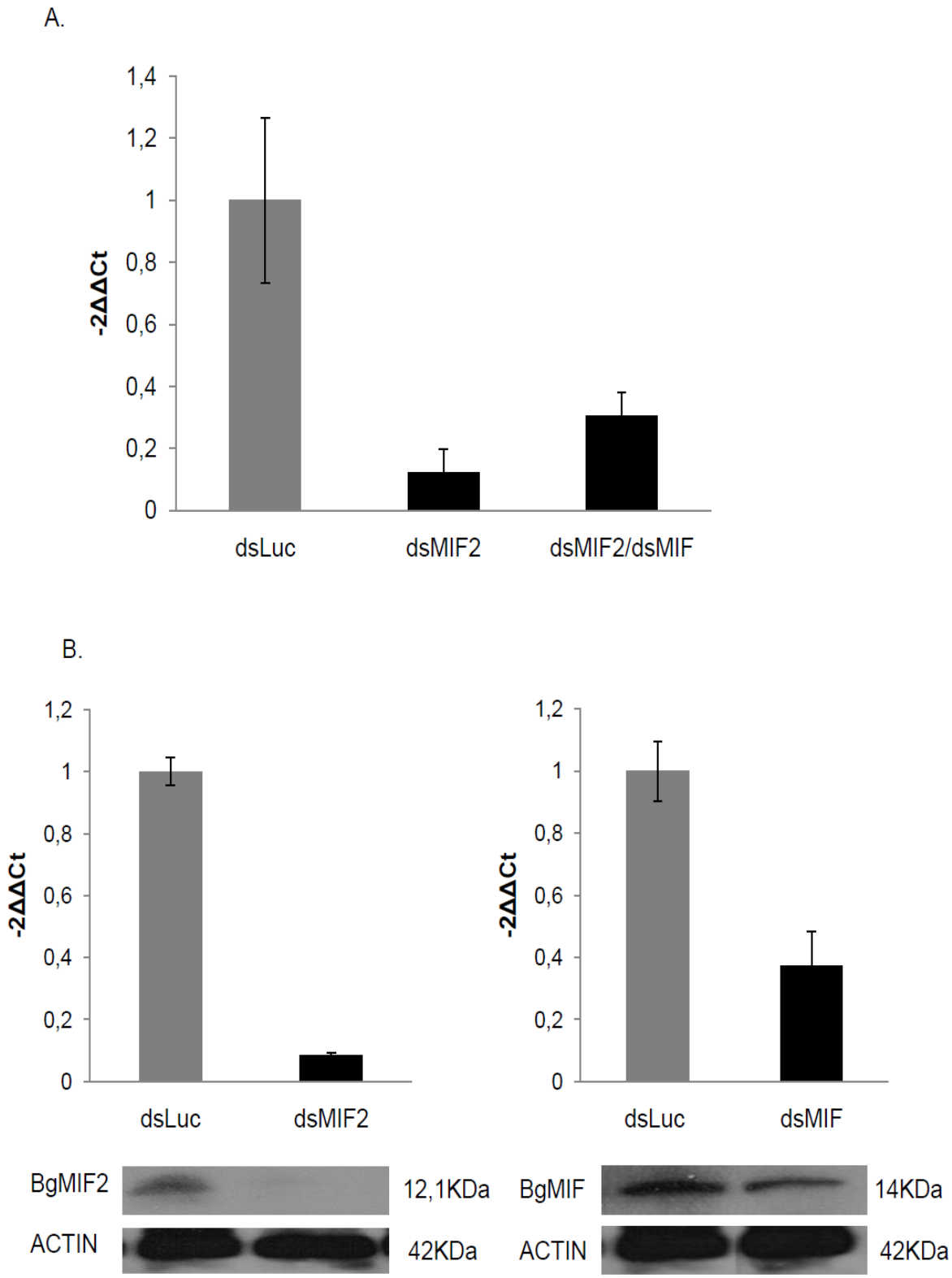
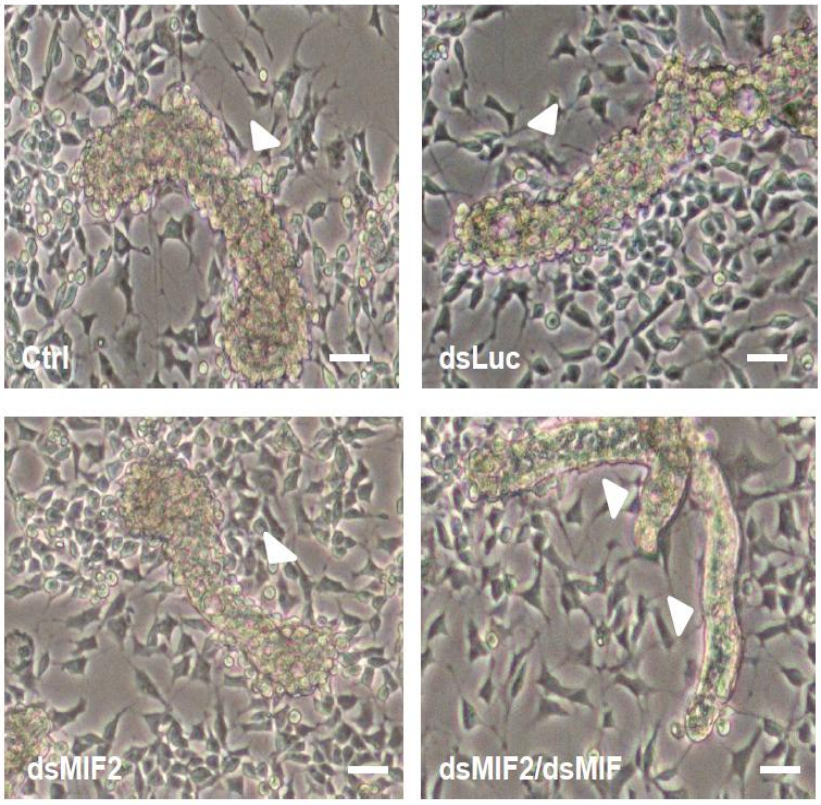

A.
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
-2ΔΔCt
dsLuc
dsMIF2
dsMIF2/dsMIF
B.
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
-2ΔΔCt
dsLuc
dsMIF2
BgMIF2
12,1KDa
ACTIN
42KDa
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
-2ΔΔCt
dsLuc
dsMIF
BgMIF
14KDa
ACTIN
42KDa

Figure 5

A.


Ctrl
dsLuc
dsMIF2
dsMIF2/dsMIF

B.

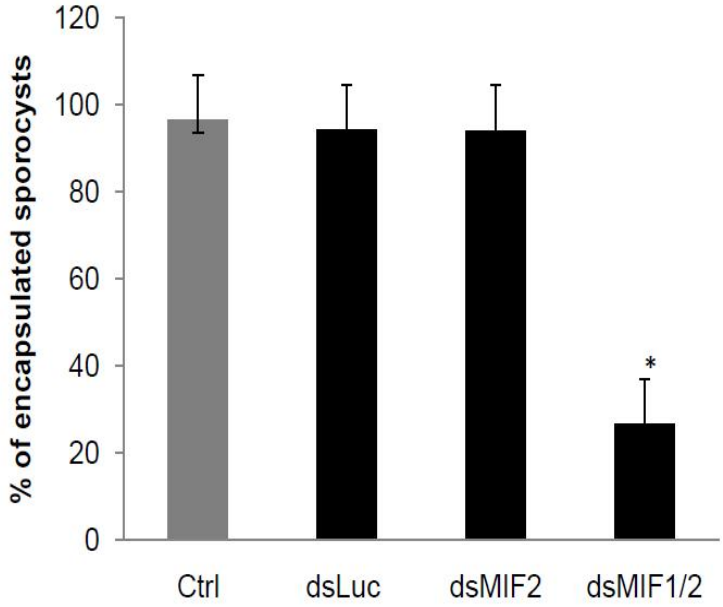
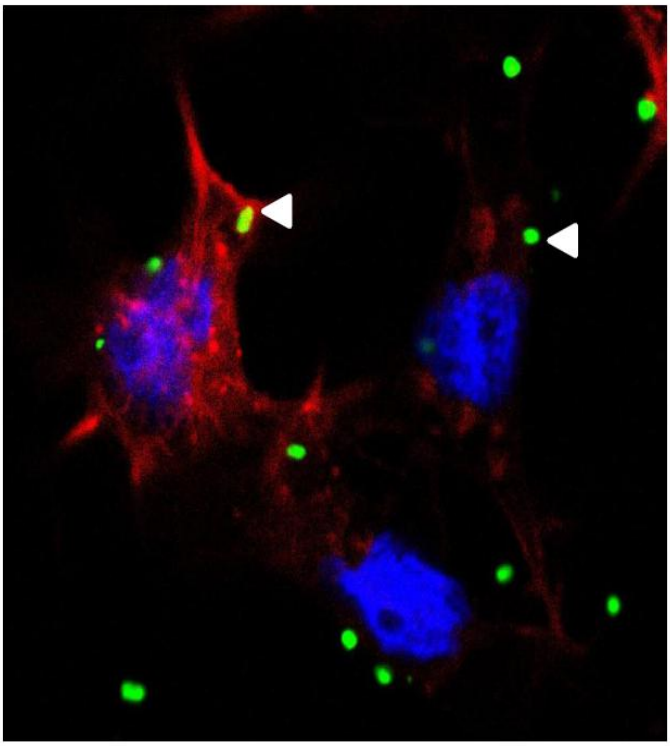

% of encapsulated sporocysts
120
100
80
60
40
20
0
*
Ctrl
dsLuc
dsMIF2
dsMIF1/2

Figure 6

A.



B.

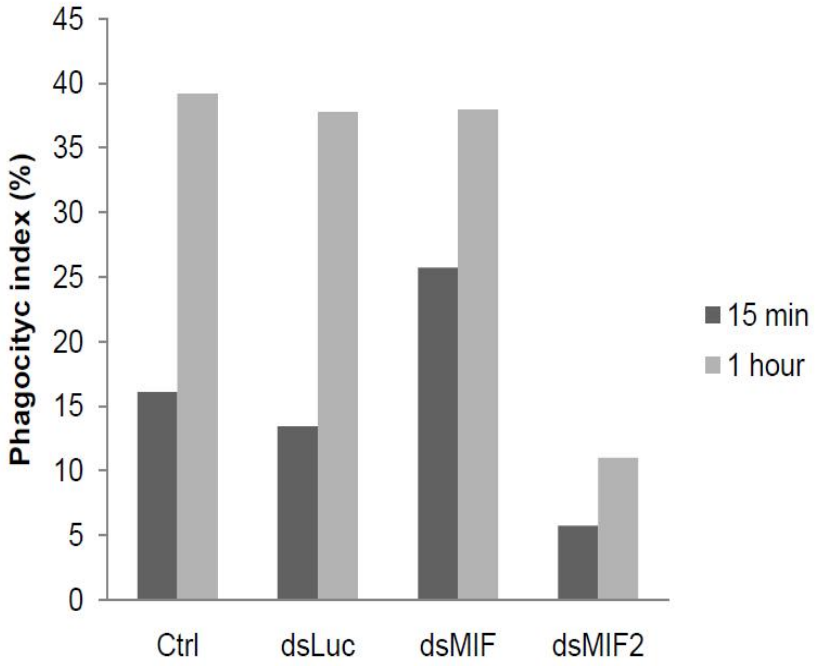

Phagocityc index (%)
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
Ctrl
dsLuc
dsMIF
dsMIF2
15 min
1 hour

Figure 7

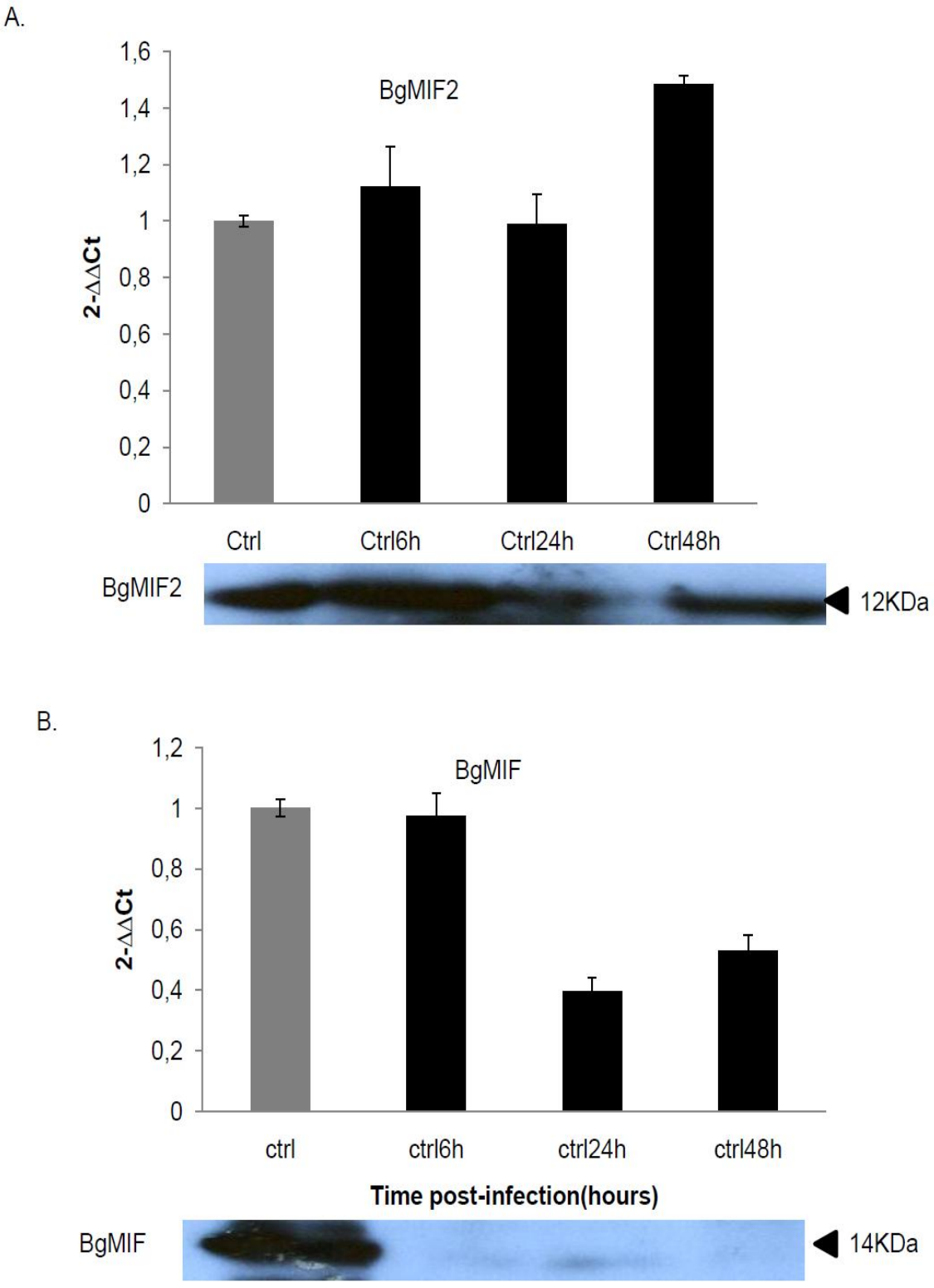
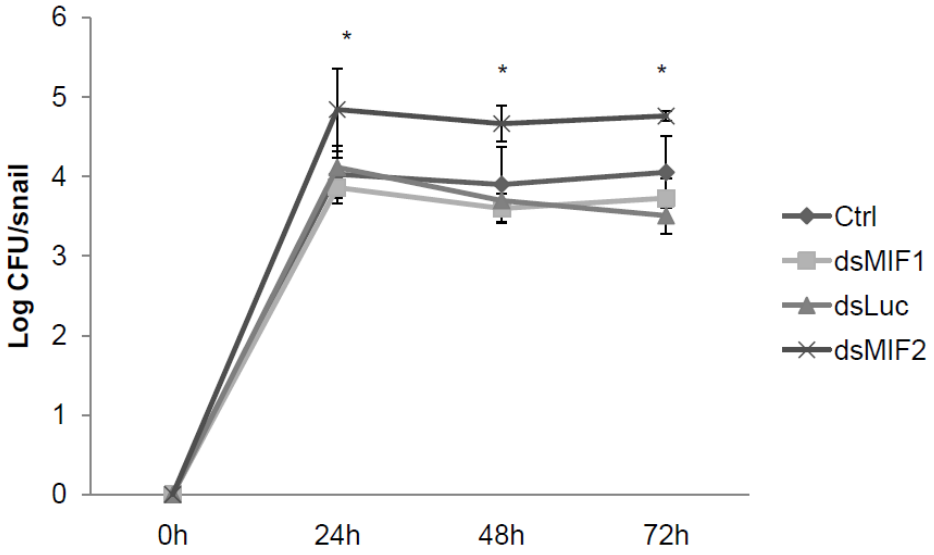

A.
BgMIF2
2-ΔΔCt
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
Ctrl
Ctrl6h
Ctrl24h
Ctrl48h
BgMIF2
12KDa
B.
BgMIF
2-ΔΔCt
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
ctrl
ctrl6h
ctrl24h
ctrl48h
Time post-infection(hours)
BgMIF
14KDa

Figure 8


Log CFU/snail
6
5
4
3
2
1
0
0h
24h
48h
72h
*
*
*
Ctrl
dsMIF1
dsLuc
dsMIF2

Supplementary Table 1: **Oligonucleotide primers used in the study**

Gene	Primer Use	Sequence (5'-3')
*Bg*MIF2	Cloning in expression vector forward primer	CGCCTTT**TCTAGA**ATGCCACTCTG
	Cloning in expression vector reverse primer	CTACCAGAGGTT**CTCGAG**ACCAAC
	3'RACE PCR primer	AAAAAGAGTCGGAGCTGAAGGATGGC
	3'RACE PCR nested primer	CGCCTTTATGCCACTCTGTTACCTTTACACC
	5'RACE PCR primer	TCTGCTGGAAGGTCCAGTTCATCTTG
	5'RACE PCR nested primer	GCTGAAGAACTTGCAGCTACCAGAGGT
	Quantitative Rt-PCR forward	GATGAACTGGACCTTCCAGCA
	Quantitative Rt-PCR reverse	TGCTGAAGAACTTGCAGCTACC
	RNAi forward primer	GCCTTTATGCCACTCTG
	RNAi forward primer +T7 sequence	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGCCTTTATG CCACTCTG
	RNAi reverse primer	CTACCAGAGGTTTTAACC
	RNAi reverse primer +T7 sequence	TAATACGACTCACTATAGGGAGACTACCAGAG GTTTTAACC
*Bg*MIF	Quantitavie Rt-PCR forward	TGCCAGCCCTGTTCTGTCA
	Quantitative Rt-PCR reverse	TCCCTTGAGGTCTTAATCAC
*Bg*S19	Quantitative Rt-PCR forward	TGCTCGCCACTTGTACATTC
	Quantitative Rt-PCR reverse	GCCCTTGTGGTGTTAGTCGT
Luciferase	RNAi forward primer	CTGGAGACATAGCTTACTG
	RNAi forward primer +T7 sequence	TAATACGACTCACTATAGGGAGACTGGAGACA TAGCTTACTG
	RNAi reverse primer	GGATCTCTCTGATTTTTCTTGCG
	RNAi reverse primer +T7 sequence	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGGATCTCTC TGATTTTTCTTGCG

[a] Restriction enzyme sites are in bold, start or stop codons are underlined.

Perspectives dans l'étude de BgMIF2

Bien que présenté sous forme d'un article prêt à être soumis pour publication, il reste quelques expériences et contrôles à effectuer avant d'arriver à ce stade :

- Nous n'avons pas étudié la capacité de *Bg*MIF2 de stimuler la prolifération cellulaire ou d'inhiber l'apoptose des cellules *Bg*e. La détermination de ces deux propriétés, typiques de la famille MIF, permettra de compléter la comparaison entre les propriétés typiques de la famille MIF des deux isoformes présentes chez le mollusque.
- Nous avons démontré une différence de la sécrétion de *Bg*MIF2 par les cellules *Bg*e stimulées soit par le LPS, soit par les ESP de sporocystes. Toutefois, nous pensons qu'il est nécessaire de quantifier cette différence et de comparer la sécrétion de *Bg*MIF2 avec celle de *Bg*MIF utilisant un dosage par ELISA.
- A la différence de *Bg*MIF, qui n'est exprimée que chez l'une des sous-populations d'hémocytes, les granulocytes, la protéine *Bg*MIF2 est fortement exprimée également par les hyalinocytes. Une étude de la localisation de *Bg*MIF2 par western blot des différents tissus de *B. glabrata* et par immunofluorescence sur des coupes du mollusque nous renseignera sur les différences éventuelles par rapport à la distribution de la protéine *Bg*MIF.
- Dans le cadre de l'activation des cellules *Bg*e par les ESP de sporocystes nous avons montré que le traitement des cellules par dsMIF abolissait l'activation de p38 observée dans les cellules contrôles traitées par dsLuc. Il est nécessaire d'effectuer un contrôle et de déterminer l'effet du traitement par dsMIF2 sur l'activation de p38 chez les cellules traitées avec les ESP ou par le LPS. Le résultat attendu serait une absence d'activation uniquement dans le cas de cellules traitées avec du LPS.
- En ce qui concerne la fonction de *Bg*MIF et *Bg*MIF2 in vivo, il serait intéressant de voir quel est le changement des populations hémocytaires au cours de l'infection bactérienne. La réalisation d'une injection simultanée des mollusques avec les dsRNA de *Bg*MIF et *Bg*MIF2, l'étude des populations hémocytaires ainsi que la quantification du nombre de Sp1 chez ces mollusques nous permettrait d'éclaircir l'implication ou non de *Bg*MIF2 dans la réponse du mollusque à une infection parasitaire.

Ces différents éléments nous permettront une meilleure comparaison entre les rôles biologiques de *Bg*MIF et *Bg*MIF2.

DISCUSSION

La découverte d'une séquence d'ADN codant une protéine similaire à la cytokine de mammifère MIF (Mitta et al., 2005), a suscité de nouvelles questions sur l'immunité des mollusques. D'une part, la mise en évidence chez le mollusque *B. glabrata*, vecteur d'une maladie parasitaire atteignant plus de 200 millions de personnes dans le monde, d'une cytokine décrite comme un régulateur de l'immunité innée des vertébrés (Calandra and Roger, 2003), ouvrait de nouvelles perspectives dans l'analyse des mécanismes immuns de ce mollusque. D'autre part, ces études pourraient être facilitées et complétées par la connaissance des données génomiques obtenues grâce au séquençage du génome de *B. glabrata* (Raghavan and Knight, 2006).

Le problème principal qui se posait dans l'étude de l'activité et de la fonction d'une telle protéine était avant tout méthodologique. En effet, le modèle *Biomphalaria* ne permet pas à nos jours l'utilisation des techniques d'invalidation des gènes comme le knock-out et au début de nos travaux, les études *in vitro* restaient limitées à la culture très transitoire des hémocytes. Certes il existait une lignée cellulaire d'origine embryonnaire qui partage avec les hémocytes de fonctions de défense (Yoshino et al., 1999), les cellules Bge. Toutefois, ces cellules avaient été utilisées surtout pour le maintien de l'état larvaire sporocyste de *S. mansoni* (Ivanchenko et al., 1999), (Coustau and Yoshino, 2000). Au cours du projet, nous avons donc dû développer des outils, comme le RNAi *in vitro* (sur les cellules *Bg*e) et *in vivo* sur les mollusques pour aborder la fonction de MIF. L'utilisation du RNAi nous a permis d'une part de confirmer le caractère « hémocyte-like » des cellules *Bg*e, et d'autre part d'augmenter l'intérêt du « modèle » *B. glabrata* pour l'étude de l'immunité des invertébrés.

Au cours de cette thèse nous avons démontré que l'orthologue de la cytokine de mammifère, MIF, du gastéropode *Biomphalaria glabrata* (*Bg*MIF), est impliqué dans sa réponse immunitaire innée vis-à-vis du parasite *Schistosoma mansoni*. Notamment, son invalidation par RNAi chez la lignée cellulaire Bge issue du mollusque, inhibe la capacité de ces cellules à adhérer (encapsuler) aux larves parasitaires, les sporocystes, la forme qui se développe chez *B. glabrata*. De plus, l'invalidation de *Bg*MIF chez le mollusque modifie la migration des cellules de défense et permet une surinfection par le parasite. Un second orthologue de MIF, *Bg*MIF2, découvert pendant nos travaux, est lui impliqué dans la réponse des mollusques contre une infection bactérienne, tandis que *Bg*MIF ne l'est pas. Cette

dichotomie fonctionnelle entre les deux isoformes de MIF connues à ce jour chez *B. glabrata* suggère une régulation fine de la réponse immunitaire innée chez le mollusque.

I. CARACTERISATION DE L'ACTIVITE ET DE LA FONCTION DE *BG*MIF.

I.1. BgMIF possède les caractéristiques d'un membre de la famille MIF

Afin d'aborder l'étude de l'activité et de la fonction de *Bg*MIF nous avons utilisé des approches complémentaires *in vitro* et *in vivo*. L'arbre phylogénétique que nous avons produit (voir Article 1) montre que *Bg*MIF fait partie de la famille MIF, toutefois sa position dans l'arbre, éloignée notamment des MIFs d'autres mollusques, peut indiquer une évolution structurale et fonctionnelle spécifique.

Les membres de la famille MIF possèdent tous une activité enzymatique dopachrome tautomérase. Pour déterminer si *Bg*MIF possède également cette activité nous avons produit une protéine recombinante *Bg*MIF (r*Bg*MIF) et sa version mutée (r*Bg*MIFP2G) qui porte en position 2 N-terminale un résidu Gly à la place du résidu Pro nécessaire à l'activité enzymatique tautomérase (Swope et al., 1998). La présence d'une activité tautomérase chez r*Bg*MIF, absente pour la forme mutée, ainsi que son inhibition par ISO-1, une molécule qui interagit avec des résidus du site catalytique des MIF (Lubetsky et al., 2002), confortent l'appartenance de *Bg*MIF à la famille des MIF.

Le rôle biologique de cette activité tautomérase est toujours le sujet de controverses et son utilité dans les activités connues de cette cytokine n'est pas démontrée. Comme nous l'avons déjà vu (voir la discussion de l'article 1), la substitution chez la souris d'une MIF tautomérase-null pour la cytokine native a indiqué que l'activité enzymatique n'avait aucun rôle dans l'activité de régulation de la croissance par MIF (Fingerle-Rowson et al., 2009a). Par contre, il semblerait que le site catalytique est impliqué dans son activité pro-inflammatoire, peut-être via sa liaison avec son récepteur CD74 et son activation (Leng et al., 2003). La suggestion que cette activité tautomérase serait un vestige du rôle de MIF dans la réponse d'encapsulation mélanotique contre l'invasion microbienne (Bucala, 2007) est contredite à la fois par l'absence de la mélanisation chez le mollusque, et par la conservation de l'activité enzymatique à travers l'évolution. Si cette activité était réellement un vestige au

cours de l'évolution, il serait difficile d'expliquer pourquoi elle n'a été perdue chez aucun MIF, quelque soit l'espèce concernée.

L'activité enzymatique de r*Bg*MIF démontre la fonctionnalité de la protéine recombinante produite et nous a permis de tester ses activités biologiques *in vitro* sur la lignée cellulaire *Bg*e. Nous avons assimilé les cellules Bge aux cellules circulantes du mollusque, car toutes expriment le transcrit et la protéine de *Bg*MIF. De plus lorsque les cellules Bge sont mises en contact avec les ESP des sporocystes de *S. mansoni* elles sécrètent la protéine native dans le milieu. Ces propriétés font de la lignée *Bg*e un bon modèle pour les études *in vitro* de l'activité biologique de *Bg*MIF. Deux des activités conservées des MIF sont l'induction de la prolifération cellulaire et l'inhibition de l'apoptose induite par p53. En effet, la protéine MIF de mammifères provoque une prolifération de fibroblastes dépendante de l'activation soutenue la MAP kinase ERK (Mitchell et al., 1999). Nous avons montré que r*Bg*MIF stimule la prolifération des cellules Bge et que, comme dans le cas des fibroblastes activés par MIF, cette prolifération était accompagnée par une activation (phosphorylation) d'ERK pendant au moins 24h. Enfin, cette prolifération est bien dépendante de l'activation d'ERK car un inhibiteur de sa phosphorylation la bloque.

r*Bg*MIF inhibe également l'apoptose induite chez les cellules *Bg*e par un donneur de NO. MIF inhibe l'accumulation NO-dépendante de la p53 et ainsi, l'apoptose p53 dépendante chez les macrophages (Mitchell et al., 2002). Avant nos travaux, l'orthologue de la p53 n'avait pas été décrit chez le mollusque. Nous avons d'abord identifié cet orthologue dans les séquences d'EST et génomiques disponibles et ensuite nous avons démontré que le site de phosphorylation (Ser15) était conservé. De cette manière nous avons pu démontrer l'inhibition de la phosphorylation (activation) de *Bg*p53 par r*Bg*MIF chez les cellules *Bg*e. Il semblerait donc, que le mécanisme par lequel *Bg*MIF inhibe l'apoptose chez le mollusque soit le même que celui de MIF chez les mammifères.

*Bg*MIF possède donc, non seulement les caractéristiques structurales des MIF d'autres espèces, mais également certaines de leurs propriétés biologiques.

I.2. BgMIF est impliqué dans la réponse immunitaire innée du mollusque contre S. mansoni

Pour pouvoir déterminer le rôle de *Bg*MIF dans l'immunité innée du mollusque, nous avons décidé d'étudier la relation entre *B. glabrata* et le parasite *S. mansoni*. Nous avons utilisé la technique de RNAi, dont l'utilisation dans le modèle *B. glabrata* a été publiée pour

la première fois en 2006 au cours de l'étude des FREPs (Jiang et al., 2006). Lors de cette étude le traitement avec du dsRNA (double strand RNA) des mollusques et des cellules Bge provoquait une réduction de 70-80% de l'expression du transcrit du gène FREP2 et cela sans effet hors cible sur d'autres gènes FREPs ou d'autres gènes du mollusque. Cette réduction était maintenue lors d'une infection parasitaire des mollusques par *E. pareaensi* qui induit en conditions normales une surexpression du gène FREP2. Cette étude montre que l'application du RNAi est possible chez le mollusque et nous avons donc utilisé cette technique pour aborder la fonction de *Bg*MIF *in vitro* et *in vivo*.

Pour les expériences *in vitro* nous nous sommes servis du modèle d'interaction cellules *Bg*e-sporocystes de *S. mansoni*. Lors de la mise en culture des cellules Bge avec des ESP de *S. mansoni* nous avons observé une activation des cellules et une modification de leur comportement et de leur forme, avec l'apparition d'amas cellulaires à partir d'un tapis initial uniforme. De plus, les cellules traitées par les ESP sécrètent *Bg*MIF. A cet égard, le comportement des cellules *Bg*e resemble à celui de macrophages traités avec des cytokines proinflammatoires, des bactéries gram négatives ou positives, des exotoxines ou endotoxines bactériennes comme le LPS (Calandra, 2003), mais nous avons pu exclure la possibilité d'une contamination des ESP par de l'endotoxine. Chez les cellules *Bg*e traitées avec du dsRNA de *Bg*MIF (dsMIF), le phénotype d'activation n'est plus observé, et au contraire on remarque une grande quantité de cellules rondes et non attachées. Le phénotype d'activation par les ESP de *S. mansoni* est lié à une activation de la protéine MAPK *Bg*p38 (Humphries and Yoshino, 2006) et nous avons pu démontrer que l'activation de *Bg*p38 était absente dans les cellules *Bg*e traitées avec du dsMIF. Une telle activation des cellules dépendante de MIF et impliquant la phosphorylation de la p38 suggère la conservation chez le mollusque de la voie de signalisation activée par des stimuli de stress ou de danger (Rincón and Davis, 2009). Chez les mammifères l'activité de MIF peut être dépendante de l'activation des voies ERK, JNK et p38 à la fois (Stojanović et al., 2009) ce qui est cohérent avec nos résultats montrant l'implication de deux de ces voies dans l'activation des cellules *Bg*e par *Bg*MIF. Toutefois, la nature très incomplète des séquences génomiques de *B. glabrata* nous empêche de déterminer le degré de conservation de ces voies et de leurs partenaires chez le mollusque.

Ces résultats suggèrent un rôle pour *Bg*MIF dans la réponse immune de *B. glabrata* lors d'une infection parasitaire. Afin de conforter cette hypothèse nous avons exploré le rôle de MIF dans la réaction des cellules *Bg*e dans leur interaction avec les larves du parasite. La mise en culture des sporocystes avec des cellules *Bg*e traitées ou non par du dsMIF montre

clairement l'importance de *Bg*MIF dans cette interaction. En effet, les cellules interférées, qui n'expriment qu'une quantité très réduite de la protéine *Bg*MIF, montrent une réduction très significative (80%) du nombre de sporocystes encapsulés. Ces résultats montrent un rôle important de *Bg*MIF comme régulateur de la réponse cellulaire lors de l'interaction des Bge avec des sporocystes du parasite. Toutefois, le système de co-culture de sporocystes avec les cellules *Bg*e (Coustau and Yoshino, 2000) permet leur développement et leur différenciation (Ivanchenko et al., 1999) et n'implique nullement la destruction des parasites. Pour permettre cette différenciation les cellules mêmes peuvent être substituées par du milieu conditionné, suggérant qu'un facteur soluble sécrété par les cellules *Bg*e serait nécessaire à ce processus (Ivanchenko et al., 1999). L'encapsulation *in vitro* ne correspond donc pas nécessairement à une réaction de défense contre le parasite. A cet égard les cellules Bge n'agissent pas de la même façon que les hémocytes *in vivo*. L'encapsulation des sporocystes par ces derniers chez le mollusque infecté aboutit à la mort du parasite (Roger et al., 2008b). Par contre, la sécrétion de *Bg*MIF par les cellules traitées avec les ESP de sporocystes, ainsi que l'abrogation de l'interaction sporocyste-cellules *Bg*e par la RNAi de *Bg*MIF, montre clairement l'implication de ce dernier dans ce processus.

En ce qui concerne le RNAi *in vivo*, son application nous a permis de voir le rôle de *Bg*MIF comme régulateur de la réponse cellulaire du mollusque face à une infection parasitaire. Dans des conditions normales la population hémocytaire circulant dans l'hémolymphe du mollusque est composée par des granulocytes et par des hyalinocytes. Lorsque le mollusque est infecté par le miracidium, une réponse apparaît dans les 24 heures qui suivent l'infection qui se traduit par une absence de granulocytes circulants consécutive à la migration de ce type cellulaire vers l'endroit où s'est produit l'infection. La diminution de l'expression de *Bg*MIF par injection de dsRNA dans l'hémolymphe du mollusque inhibe la migration des granulocytes vers les tissus atteints par l'infection. En effet, la population hémocytaire dans l'hémolymphe est la même que dans des mollusques non infectés. Pour voir si cette absence d'activation hémocytaire avait une répercussion sur la charge parasitaire, nous avons compté le nombre de Sp1 (sporocystes primaires) présents dans les mollusques 15 jours après infection et nous avons vu que les mollusques dépourvus de BgMIF ont deux fois plus de Sp1 implantés que les mollusques témoins.

Les macrophages déficients pour l'expression de MIF montrent un déficit de sensibilité au LPS ou à l'infection par des bactéries gram négatives (Roger et al., 2001b). Cela est dû à une diminution de l'expression du récepteur TLR4, qui fait partie du complexe de

reconnaissance du LPS, et par conséquent à une absence d'activation de la voie NF-κB et des gènes activés par celle-ci. Le premier récepteur Toll a été découvert chez *Drosophila melanogaster* via son rôle dans le développement embryonnaire (Anderson et al., 1985)et les arthropodes expriment entre 5 et 12 membres de la famille, tandis qu'un seul serait présent chez le nématode *Caenorhabditis elegans* ou chez le cnidaire *Nematostella vectensis* (Leulier and Lemaitre, 2008). Nous avons trouvé une séquence d'ADN partielle qui pourrait correspondre à un récepteur Toll (Accession number : EV818511.1) chez *B. glabrata*, et nous avons constaté que l'expression de son transcrit diminue, aussi bien chez les hémocytes que dans le mollusque entier lorsque l'expression de *Bg*MIF est inhibée par RNAi. La diminution de l'expression de *Bg*Toll pourrait être corrélée à l'absence de migration des hémocytes mais ces résultats restent à confirmer.

En résumé, ces résultats montrent l'implication de *Bg*MIF dans la régulation des réponses cellulaires du mollusque face à une infection par *S. mansoni* et constituent la première étude fonctionnelle d'un gène et de sa protéine dans l'immunité innée de *B. glabrata*. Cependant les voies activées ou inhibées par BgMIF ne sont pas encore élucidées et méritent d'être étudiées afin de mieux comprendre la réponse immune de ce mollusque face à une infection parasitaire.

II. CARACTERISATION FONCTIONNELLE DE *Bg*MIF2

Les travaux menés par différentes équipes qui étudient l'immunité de *B. glabrata* et les interactions hôte-parasite ont permis la caractérisation de plusieurs milliers de gènes exprimées par le mollusque lors d'une infection parasitaire ou bactérienne (Bayne, 2009) et Chapitre IV.2.3 de l'INTRODUCTION). Dans ce contexte, nous avons pu caractériser une deuxième séquence partielle d'ADN qui code une protéine de type MIF que nous avons caractérisée complètement et appelée *Bg*MIF2. L'existence d'une deuxième molécule MIF chez *B. glabrata*, n'est pas unique chez les invertébrés car, comme nous avons pu voir précédemment (cf. Chapitre 3 de l'INTRODUCTION), à la différence des vertébrés comme l'homme ou la souris qui n'ont qu'une molécule MIF, les invertébrés chez lesquels des molécules MIF ont été caractérisées en possèdent plusieurs (Vermeire et al., 2008), (Du et al., 2004). La plupart des nématodes parasitaires possèdent deux orthologues de MIF classés en deux clades, tandis que *C. elegans* en a quatre, dont trois membres du clade 1 (Vermeire et al., 2008). Cependant, même si la présence de plusieurs molécules de type MIF chez les invertébrés est connue, très peu d'études abordent la fonction et l'activité des différentes

molécules au sein d'un même organisme. Par exemple, l'étude des MIF-1 et 2 du nématode *Brugia malayi* a permis de montrer seulement qu'ils possèdent des propriétés similaires envers des monocytes humaines (Zang et al., 2002). Dans le cas de *C. elegans*, l'expression de CeMIF-2 et CeMIF-3 est augmentée de plus de cent fois quand les vers entrent en phase de repos (dauer), suggérant un rôle pour MIF dans le maintien cellulaire dans des conditions de pénurie qui mènent à l'arrêt du développement chez ce nématode (Marson et al., 2001). Par ailleurs, une étude transcriptomique récente chez ce même organisme après l'infection par deux pathogènes bactériens (*Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*) n'a détecté aucune modification significative de l'expression des transcrits de CeMIF2, mais les éventuelles modifications de l'expression des trois autres gènes MIF de *C. elegans* (CeMIF1, CeMIF3 et CeMIF4), n'ont pas été détérminés (Irazoqui et al.) (communication personnelle du Dr. J.E. Irazoqui, Université de Harvard). D'une manière générale, rien n'est connu sur les rôles éventuels de ces différentes isoformes de MIF d'invertébrés dans leurs réponses immunitaires propres.

La présence d'une deuxième molécule MIF chez *B. glabrata* nous a permis de nous interroger sur sa fonction : a-t-elle un rôle dans l'immunité innée du mollusque? Quel est son rôle face à une infection parasitaire ou bactérienne ? Et a-t-elle des rôles différents de ceux de *Bg*MIF? Pour répondre à ces questions nous avons utilisé la même approche que pour *Bg*MIF, mais nous n'avons pas effectué les analyses d'activité biologique (activation de la prolifération cellulaire et inhibition de l'apoptose). Par contre, nous avons testé l'existence de l'activité enzymatique tautomérase et analysé le rôle de *Bg*MIF2 *in vitro* et *in vivo* face à un stimulus parasitaire ou bactérien (bactéries à Gram négatif). Ces résultats sont préliminaires, mais ils montrent que *Bg*MIF et *Bg*MIF2 ont des rôles différents (cf. Tableau comparatif).

	***Bg*MIF**	***Bg*MIF2**
Activité tautomérase	**oui**	**oui**
Prolifération cellulaire	**oui**	**n.d.**
Inhibition de l'apoptose	**oui**	**n.d.**
Localisation granulocytes	**oui**	**oui**
Localisation hyalinocytes	**non**	**oui**
Sécrétion par cellules traitées avec ESP	**oui**	**non**
Encapsulation *in vitro*	**oui**	**non**
Phagocytose de bactéries	**non**	**oui**
Infection de mollusques par sporocystes	**oui**	**oui**
Infection de mollusques par *S. marcescens*	**non**	**oui**

Tableau 2 : comparaison des propriétés de *Bg*MIF et *Bg*MIF2. Les différences connues entre *Bg*MIF et *Bg*MIF2 sont surlignées en jaune. n.d. : non-déterminé

Nous avons vu que les deux molécules appartiennent bien à la famille de MIF et que *Bg*MIF2 possède aussi une activité tautomérase mais qu'à la différence de *Bg*MIF, *Bg*MIF2 n'est pas inhibé par l'inhibiteur de MIF ISO-1 (cf. Chapitre RESULTATS) ce qui peut être du à l'absence d'interaction du site actif de la protéine avec l'inhibiteur. L'étude de la liaison d'ISO-1 avec le site catalytique de MIF montre qu'il se lie à la même position que l'un des substrats de MIF, l'acide p-hydroxyphénylpyruvique (Lubetsky et al., 2002) et que le résidu Asn97 est important pour cette interaction. L'absence d'inhibition de *Bg*MIF2 par ISO-1 peut s'expliquer par la présence d'un résidu Val (hydrophobe) qui ne permettrait pas l'interaction avec ISO-1, alors que le résidu Lys (basique comme l'Asn) de *Bg*MIF pourrait le permettre.. Cette hypothèse pourra être testée par la mutation dirigée de la Val97 en Asn chez *Bg*MIF2, ce qui devrait restaurer l'inhibition par ISO-1. De même, les activités tautomérases des MIF de *Ixodes scapularis* et *Petromyzon marinus*, qui possèdent tous les deux une Ala à la place de l'Asn 97, ne devraient pas être inhibées par ISO-1.

Bien que nous n'ayons pas encore déterminé sa présence dans les différents tissus du mollusque, nous avons vu que les deux types hémocytaires (granulocytes et hyalinocytes), expriment dans le cytoplasme *Bg*MIF2 d'une façon équivalente, tandis que *Bg*MIF1 est exprimé plus abondamment dans les granulocytes. Cette différence d'expression pourrait être un premier indice d'une fonction différente pour les deux molécules. De plus, lorsque les cellules *Bg*e sont mises en contact avec les ESP de *S. mansoni*, *Bg*MIF2 n'est pas retrouvé dans les surnageants de culture, contrairement à ce qui est observé lorsque les cellules sont

stimulées avec du LPS. Ces résultats sont à confirmer par des tests ELISA qui permettront de quantifier la protéine secrétée lors des inductions différentes, mais ils signifient déjà une différence de comportement notable par rapport à *Bg*MIF. Ces données sont confortées *in vitro* avec les expériences de RNAi des cellules *Bg*e suivies d'une co-culture avec des sporocystes de *S. mansoni*. En effet, les cellules pour lesquelles l'expression de *Bg*MIF2 a été diminuée sont néanmoins capables d'encapsuler les sporocystes d'une façon comparable aux cellules non traitées ou traitées avec dsLuc. Cependant les cellules traitées simultanément par dsMIF et dsMIF2 ont le même phénotype que les cellules traitées avec dsMIF, montrant que *Bg*MIF1 est impliqué dans la réponse des cellules *Bg*e vis-à-vis du parasite et non *Bg*MIF2.

Dans ce même contexte, les expériences de RNAi *in vivo* montrent des résultats contradictoires car les mollusques traités avec dsMIF2 ou dsMIF et infectés ensuite par le parasite, ont significativement plus de sporocystes implantés dans ces deux cas que les mollusques traités avec dsLuc ou non traités. Ces résultats montrent que *Bg*MIF2 aurait aussi un rôle dans la régulation de la réponse immune face à une infection parasitaire, ce qui pourrait être confirmé par le traitement simultané des mollusques avec les dsRNA de *Bg*MIF1 et *Bg*MIF2 et l'analyse du nombre de sporocystes implantés dans ces mollusques. Ce résultat souligne également un décalage entre les résultats obtenus *in vitro* avec les cellules *Bg*e et ceux obtenus *in vivo* et suggère encore une fois que l'encapsulation des sporocystes par ces cellules n'a pas de fonction effectrice contre le parasite.

Les résultats obtenus avec les bactéries, par contre, montrent clairement l'implication directe de *Bg*MIF2 dans la réponse immune du mollusque. Les expériences de RNAi *in vitro* montrent que *Bg*MIF2 joue un rôle dans l'activation des cellules Bge qui aboutit à la phagocytose des bactéries, tandis que le traitement des cellules avec dsMIF n'a pas d'effet significatif sur le phénotype de phagocytose. Pour aborder la fonction de *Bg*MIF2 *in vivo*, nous avons utilisé la bactérie à Gram négatif opportuniste *Serratia marcescens*, utilisée comme modèle d'infection chez *D. melanogaster* ou *C. elegans* (Kurz et al., 2003), qui est capable de se développer chez le mollusque, à la différence des souches d'*E. coli* de laboratoire. Les résultats obtenus *in vivo* démontrent également le rôle de *Bg*MIF2 comme régulateur de la réponse antibactérienne de *B. glabrata*. En effet les niveaux de transcrit et protéine de *Bg*MIF2 ne sont pas altérés au cours de l'infection tandis que la protéine et les transcrits de *Bg*MIF disparaissent dans les 24 heures après l'infection. De plus, la capacité des mollusques traités avec dsMIF2 à contrôler la prolifération des bactéries qui ont été injectées, est moindre que celle des mollusques traités avec dsMIF, dsLuc ou non traités.

En résumé, les résultats obtenus lors de l'étude fonctionnelle de *Bg*MIF2 indiquent que *Bg*MIF2 régule la réponse immune du mollusque face à une infection bactérienne et pourrait avoir un rôle dans la réponse immune face à une infection par *S. mansoni*. Ces résultats méritent d'être confirmés et approfondis surtout avec l'exploration de la cinétique de la population hémocytaire au cours de l'infection bactérienne chez les mollusques infectés ou non. Il serait intéressant de suivre l'expression de certains gènes codant pour des peptides antimicrobiens dont les séquences ont été trouvées récemment dans les bases de données génomiques de *B. glabrata*.

III. LE SYSTEME IMMUNITAIRE DE *B. glabrata* : UN MODELE D'ETUDE DE L'IMMUNITE DES INVERTEBRES

Les travaux menés pendant cette thèse ont permis de mettre en évidence la régulation du système immunitaire d'un invertébré, *B. glabrata*. L'intérêt de cette étude réside surtout dans la démonstration d'une régulation des réponses immunes innées chez les invertébrés, par l'intermédiaire de molécules communes aux vertébrés comme les cytokines. De plus ces résultats sont encore plus importants car ils établissent les bases méthodologiques pour l'étude de l'immunité de *B. glabrata* et des relations hôte-parasite dans la schistosomiase. Tout semble montrer qu'il existerait une dichotomie de fonction pour deux isoformes de MIF, une cytokine impliquée dans la réponse immune contre les parasites et l'autre régulant la réponse immune lors d'une infection bactérienne, ce processus n'existant pas par ailleurs chez les vertébrés puisqu'ils ne possèdent qu'une molécule de type MIF.

Un autre aspect qui fait de *B. glabrata* un modèle intéressant pour l'étude de l'immunité, est l'existence des molécules FREPs. Comme nous avons pu le voir, les FREPs sont des molécules appartenant à la famille des immunoglobulines qui sont soumises à des phénomènes de diversification comme l'épissage alternatif ou des SNP (Zhang et al., 2004), un phénomène insoupçonné auparavant chez les invertébrés. De plus, différents types de FREPs peuvent être produits en fonction du pathogène infectant le mollusque (Zhang et al., 2008) ce qui confère une spécificité à la réponse immune. Dans ce même contexte l'existence des mécanismes de « mémoire » ont été décrits chez *B. glabrata*. En effet plusieurs études chez le mollusque indiquent un phénomène de « priming » ou sensibilisation immunitaire. Il a été montré que des mollusques infectés par *S. mansoni*, ne pouvaient être infectés une seconde fois, car lors de cette infection le parasite n'est pas encapsulé par les hémocytes mais il dégénère rapidement (Sire et al., 1998). De plus, cette résistance à une seconde infection est

efficace au bout de deux semaines après la première infection, ce qui rappelle le temps nécessaire chez les vertébrés pour que la réponse immune basée sur les anticorps soit efficace. Des travaux récents suggèrent que cette réponse est de type humoral et spécifique de la souche de parasite utilisée car lorsqu'il s'agit des infestations homologues (mêmes souches entre la primo-infection et la deuxième infection) la réponse est meilleure que lorsqu'il s'agit d'une infection hetérologue (souches différentes), (communication personnelle du Dr Benjamin Gourbal, Université de Perpignan). Cette spécificité pourrait être due à une production des isoformes des FREPs au cours de l'infection et qui reconnaîtraient de façon spécifique et plus rapide les mêmes antigènes présents à la surface des sporocystes lors d'une deuxième infection puisqu'ils se trouvent déjà présents. Dans le cas d'une souche incompatible on pourrait imaginer qu'il y ait des antigènes du parasite non reconnus par les FREPs, ce qui aurait comme conséquence une réponse moins forte et efficace. Des travaux récents (Moné et al., 2010) montrent que les protéines FREP2 (le gène *FREP2* est surexprimé lors d'une infection par *S. mansoni* (Adema et al., 2010)) forme des complexes avec des antigènes de surface hypervariables du parasite appelés *Sm*PoMucs (*S. mansoni* Polymorphic Mucins) (Roger et al., 2008a). Ce phénomène de reconnaissance des antigènes parasitaires par des molécules soumis à des mutations somatiques comme les FREPs (Zhang et al., 2004) conforte l'hypothèse de l'existence chez les invertébrés d'une immunité basée sur des molécules de type anticorps ce qui pourrait être l'ancêtre de l'immunité adaptative.

Le séquençage complet du génome du mollusque et les travaux à venir pourront donner plus d'informations pour comprendre mieux les mécanismes de l'immunité innée de ce mollusque qui a un double intérêt : au niveau de l'évolution des systèmes immuns et au niveau de la compréhension des relations hôte-pathogène.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les travaux, menés dans le cadre de cette thèse, ont permis de mettre en évidence, pour la première fois, des molécules de type cytokine (*Bg*MIF et *Bg*MIF2) chez le mollusque gastéropode d'eau douce *B.glabrata*. Ces travaux apportent un élément nouveau à la compréhension de la régulation des réponses immunes de ce mollusque. Les connaissances sur les mécanismes de l'immunité de *B. glabrata* sont encore limitées, mais des éléments comme la présence des cytokines MIF, de molécules soumises à des processus de diversification comme les FREPs, ainsi que l'existence d'une mémoire immunitaire, font de *B. glabrata* un modèle d'étude pour mieux comprendre les relations hôte-parasite et d'une façon plus générale l'évolution des systèmes immunitaires. Avec l'apport grandissant des données de séquençage du génome et les nouvelles méthodologies maintenant disponibles, différentes perspectives peuvent être proposées qui viseront à mieux comprendre l'immunité des invertébrés :

- L'étude du rôle éventuel de BgMIF2 dans la prolifération cellulaire et l'inhibition de l'apoptose permettra de mieux définir ses similarités et ses différences par rapport à *Bg*MIF.
- La recherche d'autres orthologues de MIF devra être entreprise chez le mollusque. En effet, il est possible que *B. glabrata* possède plus de deux isoformes de MIF puisque *C. elegans* et l'oursin *S. purpuratus* en renferment respectivement quatre et sept (Hibino et al., 2006), (Marson et al., 2001). Toutefois, les résultats obtenus par RNAi semblent indiquer que, si d'autres isoformes sont présentes, elles ne remplissent pas les mêmes fonctions que *Bg*MIF et *Bg*MIF2 car l'invalidation de l'un ou l'autre est suffisante pour provoquer des phénotypes tranchés chez les cellules *Bg*e ou chez le mollusque.
- L'identification *in silico* des composants des voies de signalisation MIF-dependantes doit aussi être réalisée. Nous avons pu déterminer la présence d'un orthologue d'ERK 1/2 (mais uniquement par l'utilisation d'anticorps, la séquence n'est pas caractérisée à ce jour) et un orthologue de p38 avait déjà été identifié. Toutefois, les autres composants de ces voies sont inconnus.
- Il serait aussi intéressant de caractériser le gène Toll-like de *B. glabrata* et rechercher d'autres membres éventuels de la famille afin de déterminer s'il existe un représentant

de cette famille chez le mollusque, comme chez *C. elegans*, ou plusieurs, comme chez les arthropodes?

- Comparer les effets de l'invalidation de *Bg*MIF et *Bg*MIF2 sur l'activation des voies de signalisation permettrait de définir si ces deux isoformes agissent ou non via les mêmes processus de signalisation?
- Des études transcriptomiques et protéomiques de l'effet de MIF, des ESP de sporocystes et de l'endotoxine bactérienne sur les cellules *Bg*e et les mollusques permettront aussi d'identifier d'autres acteurs ou d'autres voies de signalisation impliqués dans la réponse immune du mollusque.

D'une manière plus générale, l'exploration d'un lien entre MIF et l'immunité adaptive chez le mollusque est encore prématurée. Toutefois, l'étude de la relation entre BgMIF et BgMIF2 et FREPs serait fascinante. Est-ce que les MIF sont impliqués dans l'induction des FREPs?, et si oui, est-ce que les deux isoformes sont liées à différentes formes de FREPs en fonction de l'agent infectieux ?

BIBLIOGRAPHIE

A

Abram, B.S., Christine, M., Shifan, L., Jia, X., and Richard, B. (2003). Blockade of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in *Schistosoma japonicum*-infected mice results in an increased adult worm burden and reduced fecundity. Parasite Immunol *25*, 369-374.

Adema, C.M., Hanington, P.C., Lun, C.-M., Rosenberg, G.H., Aragon, A.D., Stout, B.A., Lennard Richard, M.L., Gross, P.S., and Loker, E.S. (2010). Differential transcriptomic responses of Biomphalaria glabrata (Gastropoda, Mollusca) to bacteria and metazoan parasites, Schistosoma mansoni and Echinostoma paraensei (Digenea, Platyhelminthes). Mol Immunol *47*, 849-860.

Adema, C.M., Hertel, L.A., Miller, R.D., and Loker, E.S. (1997). A family of fibrinogen-related proteins that precipitates parasite-derived molecules is produced by an invertebrate after infection. Proc Natl Acad Sci U S A *94*, 8691-8696.

Aderem, A., and Underhill, D.M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. Annu Rev Immunol *17*, 593-623.

Agaisse, H., Petersen, U.-M., Boutros, M., Mathey-Prevot, B., and Perrimon, N. (2003). Signaling Role of Hemocytes in Drosophila JAK/STAT-Dependent Response to Septic Injury. Dev Cell *5*, 441-450.

Akira, S., and Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. Nat Rev Immunol *4*, 499-511.

Al-Abed, Y., Dabideen, D., Aljabari, B., Valster, A., Messmer, D., Ochani, M., Tanovic, M., Ochani, K., Bacher, M., Nicoletti, F., *et al.* (2005). ISO-1 Binding to the Tautomerase Active Site of MIF Inhibits Its Pro-inflammatory Activity and Increases Survival in Severe Sepsis. J Biol Chem *280*, 36541-36544.

Al-Sharif, W.Z., Sunyer, J.O., Lambris, J.D., and Smith, L.C. (1998). Sea Urchin Coelomocytes Specifically Express a Homologue of the Complement Component C3. J Immunol *160*, 2983-2997.

Amoli, M.M., Donn, R.P., Thomson, W., Hajeer, A.H., Garcia-Porrua, C., Lueiro, M., Ollier, W.E.R., and Gonzalez-Gay, M.A. (2002). Macrophage migration inhibitory factor gene polymorphism is associated with sarcoidosis in biopsy proven erythema nodosum. J Rheumatol *29*, 1671-1673.

Anderson, K.V., Bokla, L., and Nüsslein-Volhard, C. (1985). Establishment of dorsal-ventral polarity in the drosophila embryo: The induction of polarity by the Toll gene product. Cell *42*, 791-798.

Arbouzova, N.I., and Zeidler, M.P. (2006). JAK/STAT signalling in Drosophila: insights into conserved regulatory and cellular functions. Development *133*, 2605-2616.

Awandare, G.A., Kremsner, P.G., Hittner, J.B., Keller, C.C., Clark, I.A., Weinberg, J.B., and Perkins, D.J. (2007). Higher production of peripheral blood macrophage migration inhibitory factor in healthy children with a history of mild malaria relative to children with a history of severe malaria. Am J Trop Med Hyg *76*, 1033-1036.

Awandare, Gordon A., Martinson, Jeremy J., Were, T., Ouma, C., Davenport, Gregory C., Ong'echa, John M., Wang, W., Leng, L., Ferrell, Robert E., Bucala, R., *et al.* (2009). MIF (macrophage migration inhibitory factor) promoter polymorphisms and susceptibility to severe malarial anemia. J Infect Dis *200*, 629-637.

Azumi, K., Santis, R., Tomaso, A., Rigoutsos, I., Yoshizaki, F., Pinto, M., Marino, R., Shida, K., Ikeda, M., Ikeda, M., *et al.* (2003). Genomic analysis of immunity in a Urochordate and the emergence of the vertebrate immune system: "waiting for Godot". Immunogenetics *55*, 570-581.

B

Barillas-Mury, C., Han, Y.-S., Seeley, D., and Kafatos, F.C. (1999). Anopheles gambiae Ag-STAT, a new insect member of the STAT family, is activated in response to bacterial infection. EMBO J *18*, 959-967.

Baugh, J.A., Gantier, M., Li, L., Byrne, A., Buckley, A., and Donnelly, S.C. (2006). Dual regulation of macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression in hypoxia by CREB and HIF-1. Biochem Biophys Res Commun *347*, 895-903.

Bayne, C.J. (2009). Successful parasitism of vector snail *Biomphalaria glabrata* by the human blood fluke (trematode) *Schistosoma mansoni*: A 2009 assessment. Mol Biochem Parasitol *165*, 8-18.

Belvin, M.P., and Anderson, K.V. (1996). A CONSERVED SIGNALING PATHWAY: The Drosophila Toll-Dorsal Pathway. Annu Rev Cell Dev Biol *12*, 393-416.

Bender, R.C., Broderick, E.J., Goodall, C.P., and Bayne, C.J. (2009). Respiratory burst of *Biomphalaria glabrata* hemocytes: *Schistosoma mansoni* resistant snails produce more extracellular H2O2 than susceptible snails,. J Parasitol *91*, 275-279.

Bender, R.C., Goodall, C.P., Blouin, M.S., and Bayne, C.J. (2007). Variation in expression of *Biomphalaria glabrata* SOD1: A potential controlling factor in susceptibility/resistance to *Schistosoma mansoni*. Dev Comp Immunol *31*, 874-878.

Bernhagen, J., Calandra, T., Mitchell, R.A., Martin, S.B., Tracey, K.J., Voelter, W., Manogue, K.R., Cerami, A., and Bucala, R. (1993). MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. Nature *365*, 756-759.

Bernhagen, J., Krohn, R., Lue, H., Gregory, J.L., Zernecke, A., Koenen, R.R., Dewor, M., Georgiev, I., Schober, A., Leng, L., *et al.* (2007). MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. Nat Med *13*, 587-596.

Beschin, A., Bilej, M., Torreele, E., and De Baetselier, P. (2001). On the existence of cytokines in invertebrates. Cell Mol Life Sci *58*, 801-814.

Beutler, B., and Rietschel, E.T. (2003). Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. Nat Rev Immunol *3*, 169-176.

Blandin, S., Shiao, S.-H., Moita, L.F., Janse, C.J., Waters, A.P., Kafatos, F.C., and Levashina, E.A. (2004). Complement-Like Protein TEP1 Is a Determinant of Vectorial Capacity in the Malaria Vector Anopheles gambiae. Cell *116*, 661-670.

Blandin, S.A., Marois, E., and Levashina, E.A. (2008). Antimalarial Responses in Anopheles gambiae: From a Complement-like Protein to a Complement-like Pathway. Cell Host & Microbe *3*, 364-374.

Bloom, B.R., and Bennett, B. (1966). Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. Science *153*, 80-82.

Bottazzi, B., Doni, A., Garlanda, C., and Mantovani, A. (2010). An Integrated View of Humoral Innate Immunity: Pentraxins as a Paradigm. Annual Review of Immunology *28*, 157-183.

Bouchut, A., Coustau, C., Gourbal, B., and Mitta, G. (2007). Compatibility in the *Biomphalaria glabrata/Echinostoma caproni* model: new candidate genes evidenced by a suppressive subtractive hybridization approach. Parasitology *134*, 575-588.

Bouchut, A., Roger, E., Coustau, C., Gourbal, B., and Mitta, G. (2006). Compatibility in the *Biomphalaria glabrata/Echinostoma caproni* model: Potential involvement of adhesion genes. Int J Parasitol *36*, 175-184.

Boutros, M., Agaisse, H., and Perrimon, N. (2002). Sequential Activation of Signaling Pathways during Innate Immune Responses in *Drosophila*. Dev Cell *3*, 711-722.

Bozza, M., Satoskar, A.R., Lin, G., Lu, B., Humbles, A.A., Gerard, C., and David, J.R. (1999). Targeted Disruption of Migration Inhibitory Factor Gene Reveals Its Critical Role in Sepsis. J Exp Med *189*, 341-346.

Brown, S., Hu, N., and HombrIa, J.C.-G. (2001). Identification of the first invertebrate interleukin JAK/STAT receptor, the *Drosophila* gene *domeless*. Curr Biol *11*, 1700-1705.

Bucala, R. (2000). Signal transduction: A most interesting factor. Nature *408*, 146-147.

Bucala, R. (2007). MIF: most interesting factor (London, World Scientific).

Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J.-L., and Hoffmann, D. (1999). Antimicrobial peptides in insects; structure and function. Dev Comp Immunol *23*, 329-344.

C

Calandra, T. (2003). Macrophage Migration Inhibitory Factor and Host Innate Immune Responses to Microbes. Scandinavian Journal of Infectious Diseases *35*, 573-576.

Calandra, T., Bernhagen, J., Mitchell, R.A., and Bucala, R. (1994). The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. J Exp Med *179*, 1895-1902.

Calandra, T., Echtenacher, B., Roy, D.L., Pugin, J., Metz, C.N., Hultner, L., Heumann, D., Mannel, D., Bucala, R., and Glauser, M.P. (2000). Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. Nat Med *6*, 164-170.

Calandra, T., and Roger, T. (2003). Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. Nat Rev Immunol *3*, 791-800.

Calandra, T., Spiegel, L.A., Metz, C.N., and Bucala, R. (1998). Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of the activation of immune cells by exotoxins of Gram-positive bacteria. Proc Natl Acad Sci U S A *95*, 11383-11388.

Cannon, J.P., Haire, R.N., and Litman, G.W. (2002). Identification of diversified genes that contain immunoglobulin-like variable regions in a protochordate. Nat Immunol *3*, 1200-1207.

Cannon, J.P., Haire, R.N., Schnitker, N., Mueller, M.G., and Litman, G.W. (2004). Individual protochordates possess unique immune-type receptor repertoires. Curr Biol *14*, R465 - R466.

Cao, W.G., Morin, M., Sengers, V., Metz, C., Roger, T., Maheux, R., and Akoum, A. (2006). Tumour necrosis factor-α up-regulates macrophage migration inhibitory factor expression in endometrial stromal cells via the nuclear transcription factor NF-κB. Hum Reprod *21*, 421-428.

Cerenius, L., Lee, B.L., and Söderhäll, K. (2008). The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. Trends in Immunology *29*, 263-271.

Cha, G.-H., Cho, K.S., Lee, J.H., Kim, M., Kim, E., Park, J., Lee, S.B., and Chung, J. (2003). Discrete Functions of TRAF1 and TRAF2 in *Drosophila melanogaster* Mediated by c-Jun N-Terminal Kinase and NF-{kappa}B-Dependent Signaling Pathways. Mol Cell Biol *23*, 7982-7991.

Chaiyaroj, S.C., Rutta, A.S.M., Muenthaisong, K., Watkins, P., Na Ubol, M., and Looareesuwan, S. (2004). Reduced levels of transforming growth factor-β1, interleukin-12 and increased migration inhibitory factor are associated with severe malaria. Acta Tropica *89*, 319-327.

Chamy, L.E., Leclerc, V., Caldelari, I., and Reichhart, J.-M. (2008). Sensing of 'danger signals' and pathogen-associated molecular patterns defines binary signaling pathways 'upstream' of Toll. Nat Immunol *9*, 1165-1170.

Chitsulo, L., Loverde, P., and Engels, D. (2004). Focus: Schistosomiasis. Nat Rev Micro *2*, 12-13.

Christophides, G.K., Zdobnov, E., Barillas-Mury, C., Birney, E., Blandin, S., Blass, C., Brey, P.T., Collins, F.H., Danielli, A., Dimopoulos, G., *et al.* (2002). Immunity-Related Genes and Gene Families in *Anopheles gambiae*. Science *298*, 159-165.

Cláudia , N.P., Rosa , H.A., Luiz , P.L., Daniel, G., Letícia, A., Christine , N.M., Ricardo, G., Alexandre , S.P., Joseli, L.-V., and Marcelo , T.B. (2007). Unraveling the lethal synergism between *Trypanosoma cruzi* infection and LPS: A role for increased macrophage reactivity. Eur J Immunol *37*, 1355-1364.

Coustau, C. (2008). Immunity in parasite-vector snails In Noah’s Ark and the immune system (Collège de France).

Coustau, C. (2009). Immunity in parasite-vector snails. Med Sci (Paris) *25*
399-403.

Coustau, C., Mitta, G., Dissous, C., Guillou, F., Galinier, R., Allienne, J.F., and Modat, S. (2003). *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma caproni* excretory-secretory products differentially affect gene expression in *Biomphalaria glabrata* embryonic cells. Parasitology *127*, 533-542.

Coustau, C., and Yoshino, T.P. (2000). Flukes without snails: advances in the *in vitro* cultivation of intramolluscan stages of trematodes. Exp Parasitol *94*, 62-66.

Cristin, D.B., Nathan, B., and Paula, I.W. (2009). Genetic analysis of *Drosophila melanogaster* susceptibility to intestinal *Vibrio cholerae* infection. Cell Microbiol *11*, 461-474.

D

David, J.R. (1966). Delayed hypersensitivity *in vitro*: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. Proc Natl Acad Sci U S A *56*, 72-77.

Davids, B.J., Wu, X.-J., and Yoshino, T.P. (1999). Cloning of a b integrin subunit cDNA from an embryonic cell line derived from the freshwater mollusc, *Biomphalaria glabrata*. Gene *228*, 213-223.

De Gregorio, E., Spellman, P.T., Rubin, G.M., and Lemaitre, B. (2001). Genome-wide analysis of the Drosophila immune response by using oligonucleotide microarrays. Proc Natl Acad Sci U S A *98*, 12590-12595.

De Gregorio, E., Spellman, P.T., Tzou, P., Rubin, G.M., and Lemaitre, B. (2002). The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in Drosophila. EMBO J *21*, 2568-2579.

De Zoysa, M., Nikapitiya, C., Oh, C., Whang, I., Lee, J.-S., Jung, S.-J., Choi, C.Y., and Lee, J. (2010). Molecular evidence for the existence of lipopolysaccharide-induced TNF-a factor (LITAF) and Rel/NF-kB pathways in disk abalone (*Haliotis discus discus*). Fish Shellfish Immunology *28*, 754-763.

Dishaw, L., Smith, S., and Bigger, C. (2005). Characterization of a C3-like cDNA in a coral: phylogenetic implications. Immunogenetics *57*, 535-548.

Dodds M, W., and Law S, K. (1998). The phylogeny and evolution of the thioester bond-containing proteins C3, C4 and alpha 2-macroglobulin. Immunol Rev *166*, 15-26.

Dong, Y., and Dimopoulos, G. (2009). Anopheles Fibrinogen-related Proteins Provide Expanded Pattern Recognition Capacity against Bacteria and Malaria Parasites. J Biol Chem *284*, 9835-9844.

Dong, Y., Taylor, H.E., and Dimopoulos, G. (2006). AgDscam, a Hypervariable Immunoglobulin Domain-Containing Receptor of the *Anopheles gambiae* Innate Immune System. PLoS Biol *4*, e229.

Donn, R.P., Plant, D., Jury, F., Richards, H.L., Worthington, J., Ray, D.W., and Griffiths, C.E.M. (2004). Macrophage migration inhibitory factor gene polymorphism is associated with psoriasis. J Investig Dermatol *123*, 484-487.

Dostert, C., Jouanguy, E., Irving, P., Troxler, L., Galiana-Arnoux, D., Hetru, C., Hoffmann, J.A., and Imler, J.-L. (2005). The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of drosophila. Nat Immunol *6*, 946-953.

Du, J., Xie, X., Chen, H., Yang, W., Dong, M., Su, J., Wang, Y., Yu, C., Zhang, S., and Xu, A. (2004). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) in chinese amphioxus as a molecular marker of immune evolution during the transition of invertebrate/vertebrate. Dev Comp Immunol *28*, 961-971.

Duclermortier, P., Lardans, V., Serra, E., Trottein, F., and Dissous, C. (1999). *Biomphalaria glabrata* embryonic cells express a protein with a domain homologous to the lectin domain of mammalian selectins. Parasitol Res *85*, 481-486.

Dupuis, S., Jouanguy, E., Al-Hajjar, S., Fieschi, C., Al-Mohsen, I.Z., Al-Jumaah, S., Yang, K., Chapgier, A., Eidenschenk, C., Eid, P., *et al.* (2003). Impaired response to interferon-[alpha]/[beta] and lethal viral disease in human STAT1 deficiency. Nat Genet *33*, 388-391.

Dziarski, R. (2003). Recognition of bacterial peptidoglycan by the innate immune system. Cell Mol Life Sci *60*, 1793-1804.

Dziarski, R., and Gupta, D. (2006). The peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). Genome Biol *7*, 232.

E

Ekengren, S., Tryselius, Y., Dushay, M.S., Liu, G., Steiner, H., and Hultmark, D. (2001). A humoral stress response in *Drosophila*. Curr Biol *11*, 714-718.

Eliceiri, B.P., Klemke, R., Strömblad, S., and Cheresh, D.A. (1998). Integrin αvβ3 Requirement for Sustained Mitogen-activated Protein Kinase Activity during Angiogenesis. J Cell Biol *140*, 1255-1263.

Engelmann, P., Molnár, L., Pálinkás, L., Cooper, E.L., and Németh, P. (2004). Earthworm leukocyte populations specifically harbor lysosomal enzymes that may respond to bacterial challenge. Cell and Tissue Research *316*, 391-401.

Esumi, N., Budarf, M., Ciccarelli, L., Sellinger, B., Kozak, C.A., and Wistow, G. (1998). Conserved gene structure and genomic linkage for D-dopachrome tautomerase (DDT) and MIF. Mamm Genome *9*, 753-757.

Evelyne, B., Yannick, G., Marcelo, G., Julien de, L., Julien, G., and Bernard, R. (2004). Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. Immunol Rev *198*, 149-168.

F

Falcone, F.H., Loke, P.n., Zang, X., MacDonald, A.S., Maizels, R.M., and Allen, J.E. (2001). A *Brugia malayi* Homolog of Macrophage Migration Inhibitory Factor Reveals an Important

Link Between Macrophages and Eosinophil Recruitment During Nematode Infection. J Immunol *167*, 5348-5354.

Ferrandon, D., Imler, J.-L., Hetru, C., and Hoffmann, J.A. (2007). The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. Nat Rev Immunol *7*, 862-874.

Fingerle-Rowson, G., Kaleswarapu, D.R., Schlander, C., Kabgani, N., Brocks, T., Reinart, N., Busch, R., Schutz, A., Lue, H., Du, X., *et al.* (2009a). A tautomerase-null Macrophage Migration-Inhibitory Factor (MIF) gene Knock-In mouse model reveals that protein interactions and not enzymatic activity mediate MIF-dependent growth regulation. Mol Cell Biol *29*, 1922-1932.

Fingerle-Rowson, G., Kaleswarapu, D.R., Schlander, C., Kabgani, N., Brocks, T., Reinart, N., Busch, R., Schutz, A., Lue, H., Du, X., *et al.* (2009b). A tautomerase-null macrophage migration-inhibitory factor (MIF) gene knock-in mouse model reveals that protein interactions and not enzymatic activity mediate MIF-dependent growth regulation. Mol Cell Biol *29*, 1922-1932.

Flajnik, M.F., and Kasahara, M. (2010). Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. Nat Rev Genet *11*, 47-59.

Flieger, O., Engling, A., Bucala, R., Lue, H., Nickel, W., and Bernhagen, J. (2003). Regulated secretion of macrophage migration inhibitory factor is mediated by a non-classical pathway involving an ABC transporter. FEBS Lett *551*, 78-86.

Foukas, L.C., Katsoulas, H.L., Paraskevopoulou, N., Metheniti, A., Lambropoulou, M., and Marmaras, V.J. (1998). Phagocytosis of *Escherichia coli* by Insect Hemocytes Requires Both Activation of the Ras/Mitogen-activated Protein Kinase Signal Transduction Pathway for Attachment and Î²3 Integrin for Internalization. Journal of Biological Chemistry *273*, 14813-14818.

G

Georgel, P., Naitza, S., Kappler, C., Ferrandon, D., Zachary, D., Swimmer, C., Kopczynski, C., Duyk, G., Reichhart, J.-M., and Hoffmann, J.A. (2001). *Drosophila* Immune Deficiency (IMD) Is a Death Domain Protein that Activates Antibacterial Defense and Can Promote Apoptosis. Dev Cell *1*, 503-514.

Gobert, V., Gottar, M., Matskevich, A.A., Rutschmann, S., Royet, J., Belvin, M., Hoffmann, J.A., and Ferrandon, D. (2003). Dual Activation of the *Drosophila* Toll Pathway by Two Pattern Recognition Receptors. Science *302*, 2126-2130.

Goedken, M., and De Guise, S. (2004). Flow cytometry as a tool to quantify oyster defence mechanisms. Fish Shellfish Immunol *16*, 539-552.

Goodall, C.P., Bender, R.C., Broderick, E.J., and Bayne, C.J. (2004). Constitutive differences in Cu/Zn superoxide dismutase mRNA levels and activity in hemocytes of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) that are either susceptible or resistant to *Schistosoma mansoni* (Trematoda). Molecular and Biochemical Parasitology *137*, 321-328.

Goodall, C.P., Bender, R.C., Brooks, J.K., and Bayne, C.J. (2006). *Biomphalaria glabrata* cytosolic copper/zinc superoxide dismutase (SOD1) gene: Association of SOD1 alleles with resistance/susceptibility to *Schistosoma mansoni*. Mol Biochem Parasitol *147*, 207-210.

Gottar, M., Gobert, V., Matskevich, A.A., Reichhart, J.-M., Wang, C., Butt, T.M., Belvin, M., Hoffmann, J.A., and Ferrandon, D. (2006). Dual Detection of Fungal Infections in *Drosophila* via Recognition of Glucans and Sensing of Virulence Factors. Cell *127*, 1425-1437.

Granath Jr, W.O., and Yoshino, T.P. (1984). *Schistosoma mansoni*: Passive transfer of resistance by serum in the vector snail, *Biomphalaria glabrata*. Exp Parasitol *58*, 188-193.

Guillou, F., Mitta, G., Galinier, R., and Coustau, C. (2007). Identification and expression of gene transcripts generated during an anti-parasitic response in *Biomphalaria glabrata*. Dev Comp Immunol *31*, 657-671.

Gupta, L., Molina-Cruz, A., Kumar, S., Rodrigues, J., Dixit, R., Zamora, R.E., and Barillas-Mury, C. (2009). The STAT Pathway Mediates Late-Phase Immunity against *Plasmodium* in the Mosquito *Anopheles gambiae*. Cell Host & Microbe *5*, 498-507.

H

Hahn, U.K., Bender, R.C., and Bayne, C.J. (2000). Production of reactive oxygen species by hemocytes of *Biomphalaria glabrata*: carbohydrate-specific stimulation. Dev Comp Immunol *24*, 531-541.

Hahn, U.K., Bender, R.C., and Bayne, C.J. (2009a). Involvement of Nitric Oxide in Killing of *Schistosoma Mansoni* Sporocysts by Hemocytes From Resistant *Biomphalaria Glabrata*. J Parasitol *87*, 778-785.

Hahn, U.K., Bender, R.C., and Bayne, C.J. (2009b). Killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant Biomphalaria glabrata: role of reactive oxygen species. J Parasitol *87*, 292-299.

Håkan, S. (2004). Peptidoglycan recognition proteins: on and off switches for innate immunity. Immunol Rev *198*, 83-96.

Hanington, P.C., Lun, C.-M., Adema, C.M., and Loker, E.S. (2010). Time series analysis of the transcriptional responses of *Biomphalaria glabrata* throughout the course of intramolluscan development of *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma paraensei*. Int J Parasitol *40*, 819-831.

Hertel, L.A., Adema, C.M., and Loker, E.S. (2005). Differential expression of FREP genes in two strains of *Biomphalaria glabrata* following exposure to the digenetic trematodes *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma paraensei*. Dev Comp Immunol *29*, 295-303.

Hertel, L.A., Stricker, S.A., Monroy, F.P., Wilson, W.D., and Loker, E.S. (1994). *Biomphalaria glabrata* Hemolymph Lectins: Binding to Bacteria, Mammalian Erythrocytes, and to Sporocysts and Rediae of *Echinostoma paraensei*. J Invertebr Pathol *64*, 52-61.

Hibino, T., Loza-Coll, M., Messier, C., Majeske, A.J., Cohen, A.H., Terwilliger, D.P., Buckley, K.M., Brockton, V., Nair, S.V., Berney, K., *et al.* (2006). The immune gene repertoire encoded in the purple sea urchin genome. Devl Biol *300*, 349-365.

Hino, K., Satou, Y., Yagi, K., and Satoh, N. (2003). A genomewide survey of developmentally relevant genes in *Ciona intestinalis*. Dev Genes Evol *213*, 264-272.

Hoffmann, J.A. (2003). The immune response of *Drosophila*. Nature *426*, 33-38.

Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, C.A., Jr., Ezekowitz, R.A., nbsp, and B (1999). Phylogenetic Perspectives in Innate Immunity. Science *284*, 1313-1318.

Hoffmann, J.A., and Reichhart, J.-M. (2002). *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. Nat Immunol *3*, 121-126.

Hudson, J.D., Shoaibi, M.A., Maestro, R., Carnero, A., Hannon, G.J., and Beach, D.H. (1999). A Proinflammatory Cytokine Inhibits P53 Tumor Suppressor Activity. J Exp Med *190*, 1375-1382.

Humphries, J.E., Elizondo, L., and Yoshino, T.P. (2001). Protein kinase C regulation of cell spreading in the molluscan *Biomphalaria glabrata* embryonic (Bge) cell line. Biochim Biophys Acta *1540*, 243-252.

Humphries, J.E., and Yoshino, T.P. (2006). *Schistosoma mansoni* excretory-secretory products stimulate a p38 signalling pathway in *Biomphalaria glabrata* embryonic cells. Int J Parasitol *36*, 37-46.

Humphries, J.E., and Yoshino, T.P. (2008). Regulation of hydrogen peroxide release in circulating hemocytes of the planorbid snail *Biomphalaria glabrata*. Dev Comp Immunol *32*, 554-562.

I

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*, 3009-3018.

Irazoqui, J.E., Troemel, E.R., Feinbaum, R.L., Luhachack, L.G., Cezairliyan, B.O., and Ausubel, F.M. (2010). Distinct Pathogenesis and Host Responses during Infection of *C. elegans* by *P. aeruginosa* and *S. aureus*. PLoS Pathog *6*, e1000982.

Irving, P., Troxler, L., Heuer, T.S., Belvin, M., Kopczynski, C., Reichhart, J.-M., Hoffmann, J.A., and Hetru, C. (2001). A genome-wide analysis of immune responses in Drosophila. Proc Natl Acad Sci U S A *98*, 15119-15124.

Ittiprasert, W., Miller, A., Myers, J., Nene, V., El-Sayed, N.M., and Knight, M. (2010). Identification of immediate response genes dominantly expressed in juvenile resistant and susceptible *Biomphalaria glabrata* snails upon exposure to *Schistosoma mansoni*. Mol Bioch Parasitol *169*, 27-39.

Ivanchenko, M.G., Lerner, J.P., McCormick, R.S., Toumadje, A., Allen, B., Fischer, K., Hedstrom, O., Helmrich, A., Barnes, D.W., and Bayne, C.J. (1999). Continuous *in vitro* propagation and differentiation of cultures of the intramolluscan stages of the human parasite *Schistosoma mansoni*. Proc Natl Acad Sci U S A *96*, 4965-4970.

Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. Nat Immunol *5*, 987-995.

Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2010). Regulation of Adaptive Immunity by the Innate Immune System. Science *327*, 291-295.

J

Jang, I.-H., Chosa, N., Kim, S.-H., Nam, H.-J., Lemaitre, B., Ochiai, M., Kambris, Z., Brun, S., Hashimoto, C., Ashida, M., *et al.* (2006). A Spätzle-Processing Enzyme Required for Toll Signaling Activation in *Drosophila* Innate Immunity. Dev Cell *10*, 45-55.

Jaworski, D.C., Jasinskas, A., Metz, C.N., Bucala, R., and Barbour, A.G. (2001). Identification and characterization of a homologue of the pro-inflammatory cytokine Macrophage Migration Inhibitory Factor in the tick, *Amblyomma americanum*. Insect Mol Biol *10*, 323-331.

Jiang, Y., Loker, E.S., and Zhang, S.-M. (2006). *In vivo* and *in vitro* knockdown of FREP2 gene expression in the snail *Biomphalaria glabrata* using RNA interference. Dev Comp Immunol *30*, 855-866.

Jin, M.S., and Lee, J.-O. (2008). Structures of the Toll-like Receptor Family and Its Ligand Complexes. Immunity *29*, 182-191.

John, D.F., and Thomas, P. (2008). The bacterial superantigen and superantigen-like proteins. Immunol Rev *225*, 226-243.

Jones, C.S., Lockyer, A.E., Rollinson, D., and Noble, L.R. (2001). Molecular approaches in the study of *Biomphalaria glabrata* - *Schistosoma mansoni* interactions: linkage analysis and gene expression profiling. Parasitology *123*, 181-196.

Jung, Y., Nowak, T.S., Zhang, S.-M., Hertel, L.A., Loker, E.S., and Adema, C.M. (2005). Manganese superoxide dismutase from *Biomphalaria glabrata*. J Invertebr Pathol *90*, 59-63.

Juttner, S., Bernhagen, J., Metz, C.N., Rollinghoff, M., Bucala, R., and Gessner, A. (1998). Migration Inhibitory Factor Induces Killing of Leishmania major by Macrophages: Dependence on Reactive Nitrogen Intermediates and Endogenous TNF-α. J Immunol *161*, 2383-2390.

K

Kanda, H., Igaki, T., Kanuka, H., Yagi, T., and Miura, M. (2002). Wengen, a Member of the Drosophila Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Is Required for Eiger Signaling. J Biol Chem *277*, 28372-28375.

Kato, Y., Muto, T., Tomura, T., Tsumura, H., Watarai, H., Mikayama, T., Ishizaka, K., and Kuroki, R. (1996). The crystal structure of human glycosylation-inhibiting factor is a trimeric barrel with three 6-stranded beta-sheets. Proc Natl Acad Sci U S A *93*, 3007-3010.

Kauppila, S., Maaty, W.S.A., Chen, P., Tomar, R.S., Eby, M.T., Chapo, J., Chew, S., Rathore, N., Zachariah, S., Sinha, S.K., *et al.* (2003). Eiger and its receptor, Wengen, comprise a TNF-like system in Drosophila. Oncogene *22*, 4860-4867.

Kim, Y.-S., Ryu, J.-H., Han, S.-J., Choi, K.-H., Nam, K.-B., Jang, I.-H., Lemaitre, B., Brey, P.T., and Lee, W.-J. (2000). Gram-negative Bacteria-binding Protein, a Pattern Recognition Receptor for Lipopolysaccharide and β-1,3-Glucan That Mediates the Signaling for the Induction of Innate Immune Genes in Drosophila melanogaster Cells. J Biol Chem *275*, 32721-32727.

Kimbrell, D.A., and Beutler, B. (2001). The evolution and genetics of innate immunity. Nat Rev Genet *2*, 256-267.

Kleemann, R., Hausser, A., Geiger, G., Mischke, R., Burger-Kentischer, A., Flieger, O., Johannes, F.-J., Roger, T., Calandra, T., Kapurniotu, A., *et al.* (2000). Intracellular action of

the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through Jab1. Nature *408*, 211-216.

Koebernick, H., Grode, L., David, J.R., Rohde, W., Rolph, M.S., MittrÃ¼cker, H.-W., and Kaufmann, S.H.E. (2002a). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) plays a pivotal role in immunity against Salmonella typhimurium. Proc Natl Acad Sci U S A *99*, 13681-13686.

Koebernick, H., Grode, L., David, J.R., Rohde, W., Rolph, M.S., Mittrücker, H.-W., and Kaufmann, S.H.E. (2002b). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) plays a pivotal role in immunity against Salmonella typhimurium. Proc Natl Acad Sci U S A *99*, 13681-13686.

Koizumi, N., Imamura, M., Kadotani, T., Yaoi, K., Iwahana, H., and Sato, R. (1999). The lipopolysaccharide-binding protein participating in hemocyte nodule formation in the silkworm Bombyx mori is a novel member of the C-type lectin superfamily with two different tandem carbohydrate-recognition domains. FEBS Letters *443*, 139-143.

Kozak, C.A., Adamson, M.C., Buckler, C.E., Segovia, L., Paralkar, V., and Wistow, G. (1995). Genomic Cloning of Mouse MIF (Macrophage Inhibitory Factor) and Genetic Mapping of the Human and Mouse Expressed Gene and Nine Mouse Pseudogenes. Genomics *27*, 405-411.

Kumar, H., Kawai, T., and Akira, S. (2009). Pathogen recognition in the innate immune response. Biochem J *420*, 1-16.

Kurtz, J., and Franz, K. (2003). Innate defence: Evidence for memory in invertebrate immunity. Nature *425*, 37-38.

Kurz, C.L., Chauvet, S., Andres, E., Aurouze, M., Vallet, I., Michel, G.P.F., Uh, M., Celli, J., Filloux, A., de Bentzmann, S., *et al.* (2003). Virulence factors of the human opportunistic pathogen Serratia marcescens identified by in vivo screening. EMBO J *22*, 1451-1460.

L

Lagueux, M., Perrodou, E., Levashina, E.A., Capovilla, M., and Hoffmann, J.A. (2000). Constitutive expression of a complement-like protein in Toll and JAK gain-of-function mutants of *Drosophila*. Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 11427-11432.

Lavine, M.D., and Strand, M.R. (2002). Insect hemocytes and their role in immunity. Insect Biochem Mol Biol *32*, 1295-1309.

Leclerc, V., Pelte, N., El Chamy, L., Martinelli, C., Ligoxygakis, P., Hoffmann, J., and Reichhart, J. (2006). Prophenoloxidase activation is not required for survival to microbial infections in Drosophila. EMBO Rep *2*, 231-235.

Lee, W.J., Lee, J.D., Kravchenko, V.V., Ulevitch, R.J., and Brey, P.T. (1996). Purification and molecular cloning of an inducible gram-negative bacteria-binding protein from the silkworm, *Bombyx mori*. Proc Natl Acad Sci U S A *93*, 7888-7893.

Lehmann, L., Book, M., Hartmann, W., Weber, S., Schewe, J.-C., Klaschik, S., Hoeft, A., and Stuber, F. (2009). A MIF haplotype is associated with the outcome of patients with severe sepsis: a case control study. J Transl Med *7*, 100.

Lemaitre, B., and Hoffmann, J. (2007). The Host Defense of *Drosophila melanogaster*. Annu Rev Immunol *25*, 697-743.

Lemaitre, B., Kromer-Metzger, E., Michaut, L., Nicolas, E., Meister, M., Georgel, P., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1995). A recessive mutation, immune deficiency (imd), defines two distinct control pathways in the *Drosophila* host defense. Proc Natl Acad Sci U S A *92*, 9465-9469.

Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.-M., and Hoffmann, J.A. (1996). The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette spätzle/Toll/cactus Controls the Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults. Cell *86*, 973-983.

Leng, L., and Bucala, R. (2006). Insight into the biology of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) revealed by the cloning of its cell surface receptor. Cell Res *16*, 162-168.

Leng, L., Metz, C.N., Fang, Y., Xu, J., Donnelly, S., Baugh, J., Delohery, T., Chen, Y., Mitchell, R.A., and Bucala, R. (2003). MIF Signal Transduction Initiated by Binding to CD74. J Exp Med *197*, 1467-1476.

Léonard, P.M., Adema, C.M., Zhang, S.-M., and Loker, E.S. (2001). Structure of two FREP genes that combine IgSF and fibrinogen domains, with comments on diversity of the FREP gene family in the snail *Biomphalaria glabrata*. Gene *269*, 155-165.

Leulier, F., and Lemaitre, B. (2008). Toll-like receptors-taking an evolutionary approach. Nat Rev Genet *9*, 165-178.

Levashina, E.A., Moita, L.F., Blandin, S., Vriend, G., Lagueux, M., and Kafatos, F.C. (2001). Conserved Role of a Complement-like Protein in Phagocytosis Revealed by dsRNA Knockout in Cultured Cells of the Mosquito, *Anopheles gambiae*. Cell *104*, 709-718.

Levy, F., Bulet, P., and Ehret-Sabatier, L. (2004). Proteomic Analysis of the Systemic Immune Response of *Drosophila*. Mol Cell Proteomics *3*, 156-166.

Ligoxygakis, P., Pelte, N., Hoffmann, J.A., and Reichhart, J.-M. (2002). Activation of *Drosophila* Toll During Fungal Infection by a Blood Serine Protease. Science *297*, 114-116.

Lin, Y.-C., Vaseeharan, B., Ko, C.-F., Chiou, T.-T., and Chen, J.-C. (2007). Molecular cloning and characterisation of a proteinase inhibitor, alpha 2-macroglobulin (α2-M) from the haemocytes of tiger shrimp Penaeus monodon. Mol Immunol *44*, 1065-1074.

Little, T.J., Hultmark, D., and Read, A.F. (2005). Invertebrate immunity and the limits of mechanistic immunology. Nat Immunol *6*, 651-654.

Liu, C., Xu, Z., Gupta, D., and Dziarski, R. (2001). Peptidoglycan Recognition Proteins. J Biol Chem *276*, 34686-34694.

Liu, L., Roberts, A.A., and Ganz, T. (2003). By IL-1 Signaling, Monocyte-Derived Cells Dramatically Enhance the Epidermal Antimicrobial Response to Lipopolysaccharide. J Immunol *170*, 575-580.

Liu, W.-J., Chang, Y.-S., Wang, A.H.J., Kou, G.-H., and Lo, C.-F. (2007). White Spot Syndrome Virus Annexes a Shrimp STAT To Enhance Expression of the Immediate-Early Gene ie1. J Virol *81*, 1461-1471.

Lockyer, A., Spinks, J., Kane, R., Hoffmann, K., Fitzpatrick, J., Rollinson, D., Noble, L., and Jones, C. (2008). *Biomphalaria glabrata* transcriptome: cDNA microarray profiling identifies resistant- and susceptible-specific gene expression in haemocytes from snail strains exposed to *Schistosoma mansoni*. BMC Genomics *9*, 634.

Lockyer, A.E., Noble, L.R., Rollinson, D., and Jones, C.S. (2004). *Schistosoma mansoni*: resistant specific infection-induced gene expression in *Biomphalaria glabrata* identified by fluorescent-based differential display. Exp Parasitol *107*, 97-104.

Lockyer, A.E., Spinks, J., Noble, L.R., Rollinson, D., and Jones, C.S. (2007a). Identification of genes involved in interactions between *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni* by suppression subtractive hybridization. Mol Biochem Parasitol *151*, 18-27.

Lockyer, A.E., Spinks, J.N., Walker, A.J., Kane, R.A., Noble, L.R., Rollinson, D., Dias-Neto, E., and Jones, C.S. (2007b). Biomphalaria glabrata transcriptome: Identification of cell-signalling, transcriptional control and immune-related genes from open reading frame expressed sequence tags (ORESTES). Dev Comp Immunol *31*, 763-782.

Lodes, M.J., and Yoshino, T.P. (1993). Polypeptides Synthesized in Vitro by *Biomphalaria glabrata* Hemocytes Bind to *Schistosoma mansoni* Primary Sporocysts. J Invertebr Pathol *61*, 117-122.

Loker, E.S., Adema, C.M., Zhang, S.-M., and Kepler, T.B. (2004). Invertebrate immune systems - not homogeneous, not simple, not well understood. Immunol Rev *198*, 10-24.

Loker, E.S., Yui, M.A., and Bayne, C.J. (1984). *Schistosoma mansoni*: Agglutination of sporocysts, and formation of gels on miracidia transforming in plasma of *Biomphalaria glabrata*. Exp Parasitol *58*, 56-62.

Lubetsky, J.B., Dios, A., Han, J., Aljabari, B., Ruzsicska, B., Mitchell, R., Lolis, E., and Al-Abed, Y. (2002). The Tautomerase Active Site of Macrophage Migration Inhibitory Factor Is a Potential Target for Discovery of Novel Anti-inflammatory Agents. J Biol Chem *277*, 24976-24982.

Lue, H., Dewor, M., Leng, L., Bucala, R., and Bernhagen, J. (2010). Activation of the JNK signalling pathway by macrophage migration inhibitory factor (MIF) and dependence on CXCR4 and CD74. Cell Signal *In Press, Accepted Manuscript*.

Luo, T., Zhang, X., Shao, Z., and Xu, X. (2003). PmAV, a novel gene involved in virus resistance of shrimp Penaeus monodon. FEBS Letters *551*, 53-57.

M

Magalhaes, E.S., Paiva, C.N., Souza, H.S.P., Pyrrho, A.S., Mourao-Sa, D., Figueiredo, R.T., Vieira-de-Abreu, A., Dutra, H.S., Silveira, M.S., Gaspar-Elsas, M.I.C., *et al.* (2009). Macrophage migration inhibitory factor is critical to interleukin-5-driven eosinophilopoiesis and tissue eosinophilia triggered by *Schistosoma mansoni* infection. FASEB J *23*, 1262-1271.

Manfruelli, P., Reichhart, J.-M., Steward, R., Hoffmann, J.A., and Lemaitre, B. (1999). A mosaic analysis in *Drosophila* fat body cells of the control of antimicrobial peptide genes by the Rel proteins Dorsal and DIF. EMBO J *18*, 3380-3391.

Marmaras, V.J., and Lampropoulou, M. (2009). Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. Cell Signal *21*, 186-195.

Marson, A.L., Tarr, D.E.K., and Scott, A.L. (2001). Macrophage migration inhibitory factor (mif) transcription is significantly elevated in *Caenorhabditis elegans* dauer larvae. Gene *278*, 53-62.

Martiney, J.A., Sherry, B., Metz, C.N., Espinoza, M., Ferrer, A.S., Calandra, T., Broxmeyer, H.E., and Bucala, R. (2000). Macrophage Migration Inhibitory Factor Release by Macrophages after Ingestion of Plasmodium chabaudi-Infected Erythrocytes: Possible Role in the Pathogenesis of Malarial Anemia. Infect Immun *68*, 2259-2267.

Martins-Souza, R.L., Pereira, C.A.J., Coelho, P.M.Z., Martins-Filho, O.A., and Negro-Correa, D. (2009). Flow cytometry analysis of the circulating haemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* following *Schistosoma mansoni* infection. Parasitology *136*, 67-76.

Matsushima, N., Tanaka, T., Enkhbayar, P., Mikami, T., Taga, M., Yamada, K., and Kuroki, Y. (2007). Comparative sequence analysis of leucine-rich repeats (LRRs) within vertebrate toll-like receptors. BMC Genomics *8*, 124.

Matsushita, M., Endo, Y., Taira, S., Sato, Y., Fujita, T., Ichikawa, N., Nakata, M., and Mizuochi, T. (1996). A Novel Human Serum Lectin with Collagen- and Fibrinogen-like Domains That Functions as an Opsonin. J Biol Chem *271*, 2448-2454.

McGuinness, D.H., Dehal, P.K., and Pleass, R.J. (2003). Pattern recognition molecules and innate immunity to parasites. Trends Parasitol *19*, 312-319.

Medzhitov, R. (2010). Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. Cell *140*, 771-776.

Medzhitov, R., and Janeway, C.A. (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. Current Opinion in Immunology *9*, 4-9.

Medzhitov, R., and Janeway, C.A. (1998). An ancient system of host defense. Current Opinion in Immunology *10*, 12-15.

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C.A. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature *388*, 394-397.

Meister, S., Agianian, B., Turlure, F., Relogio, A., Morlais, I., Kafatos, F.C., and Christophides, G.K. (2009). *Anopheles gambiae* PGRPLC-Mediated Defense against Bacteria Modulates Infections with Malaria Parasites. PLoS Pathog *5*, e1000542.

Mekata, T., Sudhakaran, R., Okugawa, S., Inada, M., Kono, T., Sakai, M., and Itami, T. (2010). A novel gene of tumor necrosis factor ligand superfamily from kuruma shrimp, Marsupenaeus japonicus. Fish Shellfish Immunology *28*, 571-578.

Meng, X., Khanuja, B.S., and Ip, Y.T. (1999). Toll receptor-mediated Drosophila immune response requires Dif, an NF-ÎºB factor. Genes Dev *13*, 792-797.

Metheniti, A., Paraskevopoulou, N., Lambropoulou, M., and Marmaras, V.J. (2001). Involvement of FAK/Src complex in the processes of Escherichia coli phagocytosis by insect hemocytes. FEBS Letters *496*, 55-59.

Meyer-Siegler, K.L., Vera, P.L., Iczkowski, K.A., Bifulco, C., Lee, A., Gregersen, P.K., Leng, L., and Bucala, R. (2007). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene polymorphisms are associated with increased prostate cancer incidence. Genes Immun *8*, 646-652.

Michel, K., Suwanchaichinda, C., Morlais, I., Lambrechts, L., Cohuet, A., Awono-Ambene, P.H., Simard, F., Fontenille, D., Kanost, M.R., and Kafatos, F.C. (2006). Increased

melanizing activity in Anopheles gambiae does not affect development of Plasmodium falciparum. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 16858-16863.

Millet, A.C.M., and Ewbank, J.J. (2004). Immunity in *Caenorhabditis elegans*. Curr Opin Immunol *16*, 4-9.

Mischke, R., Kleemann, R., Brunner, H., and Bernhagen, J. (1998). Cross-linking and mutational analysis of the oligomerization state of the cytokine macrophage migration inhibitory factor (MIF). FEBS Lett *427*, 85-90.

Mitchell, R.A., Liao, H., Chesney, J., Fingerle-Rowson, G., Baugh, J., David, J., and Bucala, R. (2002). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: Regulatory role in the innate immune response. Proc Natl Acad Sci U S A *99*, 345-350.

Mitchell, R.A., Metz, C.N., Peng, T., and Bucala, R. (1999). Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF). J Biol Chem *274*, 18100-18106.

Mitta, G., Galinier, R., Tisseyre, P., Allienne, J.F., Girerd-Chambaz, Y., Guillou, F., Bouchut, A., and Coustau, C. (2005). Gene discovery and expression analysis of immune-relevant genes from *Biomphalaria glabrata* hemocytes. Dev Comp Immunol *29*, 393-407.

Mitta, G., Vandenbulcke, F., and Roch, P. (2000). Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. FEBS Lett *486*, 185-190.

Mizue, Y., Ghani, S., Leng, L., McDonald, C., Kong, P., Baugh, J., Lane, S.J., Craft, J., Nishihira, J., Donnelly, S.C., *et al.* (2005). Role for macrophage migration inhibitory factor in asthma. Proc Natl Acad Sci U S A *102*, 14410-14415.

Moita, L.F., Wang-Sattler, R., Michel, K., Zimmermann, T., Blandin, S., Levashina, E.A., and Kafatos, F.C. (2005). In Vivo Identification of Novel Regulators and Conserved Pathways of Phagocytosis in A. gambiae. Immunity *23*, 65-73.

Moné, Y., Gourbal, B., Duval, D., Du Pasquier, L., Kieffer-Jaquinod, S., and Mitta, G. (2010). A Large Repertoire of Parasite Epitopes Matched by a Large Repertoire of Host Immune Receptors in an Invertebrate Host/Parasite Model. PLoS Negl Trop Dis *4*, e813.

Montagnani, C., Kappler, C., Reichhart, J.M., and Escoubas, J.M. (2004). Cg-Rel, the first Rel/NF-[kappa]B homolog characterized in a mollusk, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. FEBS Lett *561*, 75-82.

Morales-Montor, J., Mohamed, F., Baghdadi, A., Baig, S., Hallal-Calleros, C., and Damian, R.T. (2003). Expression of mRNA for interleukin-1[beta], interleukin-6, tumor necrosis

factor-α and macrophage migration inhibitory factor in HPA-axis tissues in *Schistosoma mansoni*-infected baboons (*Papio cynocephalus*). Int J Parasitol *33*, 1515-1524.

Morales-Montor, J., Mohamed, F., Drake, L., Baghdadi, A., Baig, S., and Damian, R.T. (2004). Dynamics of the cytokine messenger RNA expression pattern in the liver of baboons infected with *Schistosoma mansoni*. J Parasitol *90*, 547-556.

Moreno, E., Yan, M., and Basler, K. (2002). Evolution of TNF Signaling Mechanisms: JNK-Dependent Apoptosis Triggered by Eiger, the *Drosophila* Homolog of the TNF Superfamily. Curr Biol *12*, 1263-1268.

N

Nappi, A., Vass, E., Frey, F., and Carton, Y. (1995). Superoxide anion generation in Drosophila during melanotic encapsulation of parasites. Eur J Cell Biol *4*, 450-456.

Naujokas, M.F., Arneson, L.S., Fineschi, B., Peterson, M.E., Sitterding, S., Hammond, A.T., Reilly, C., Lo, D., and Miller, J. (1995). Potent effects of low levels of MHC class II-associated invariant chain on CD4+ T cell development. Immunity *3*, 359-372.

Naujokas, M.F., Morin, M., Anderson, M.S., Peterson, M., and Miller, J. (1993). The chondroitin sulfate form of invariant chain can enhance stimulation of T cell responses through interaction with CD44. Cell *74*, 257-268.

Nohara, H., Okayama, N., Inoue, N., Koike, Y., Fujimura, K., Suehiro, Y., Hamanaka, Y., Higaki, S., Yanai, H., Yoshida, T., *et al.* (2004). Association of the -173G/C polymorphism of the macrophage migration inhibitory factor gene with ulcerative colitis. J Gastroenterol *39*, 242-246.

Nonaka, M., and Kimura, A. (2006). Genomic view of the evolution of the complement system. Immunogenetics *58*, 701-713.

O

Oddo, M., Calandra, T., Bucala, R., and Meylan, P.R.A. (2005). Macrophage Migration Inhibitory Factor Reduces the Growth of Virulent *Mycobacterium tuberculosis* in Human Macrophages. Infect Immun *73*, 3783-3786.

Onodera, S., Nishihira, J., Iwabuchi, K., Koyama, Y., Yoshida, K., Tanaka, S., and Minami, A. (2002). Macrophage Migration Inhibitory Factor Up-regulates Matrix Metalloproteinase-9 and -13 in Rat Osteoblasts: RELEVANCE TO INTRACELLULAR SIGNALING PATHWAYS. J Biol Chem *277*, 7865-7874.

Osta, M.A., Christophides, G.K., and Kafatos, F.C. (2004). Effects of Mosquito Genes on *Plasmodium* Development. Science *303*, 2030-2032.

P

Pastrana, D.V., Raghavan, N., FitzGerald, P., Eisinger, S.W., Metz, C., Bucala, R., Schleimer, R.P., Bickel, C., and Scott, A.L. (1998). Filarial Nematode Parasites Secrete a Homologue of the Human Cytokine Macrophage Migration Inhibitory Factor. Infect Immun *66*, 5955-5963.

Pennock, J.L., Behnke, J.M., Bickle, Q.D., Devaney, E., Grencis, R.K., Isaac, R.E., Joshua, G.W., Selkirk, M.E., Zhang, Y., and Meyer, D.J. (1998). Rapid purification and characterization of L-dopachrome-methyl ester tautomerase (macrophage-migration-inhibitory factor) from *Trichinella spiralis, Trichuris muris and Brugia pahangi*. Biochem J *335*, 495-498.

Philo, J.S., Yang, T.-H., and LaBarre, M. (2004). Re-examining the oligomerization state of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in solution. Biophys Chem *108*, 77-87.

Plant, B.J., Ghani, S., O'Mahony, M.J., Morgan, L., O'Connor, C.M., Morgan, K., Baugh, J.A., and Donnelly, S.C. (2007). Sarcoidosis and MIF gene polymorphism: a case-control study in an Irish population. Eur Respir J *29*, 325-329.

Pulendran, B., Tang, H., and Manicassamy, S. (2010). Programming dendritic cells to induce TH2 and tolerogenic responses. Nat Immunol *11*, 647-655.

R

Raftos, D.A., Fabbro, M., and Nair, S.V. (2004). Exocytosis of a complement component C3-like protein by tunicate hemocytes. Dev Com Immunol *28*, 181-190.

Raghavan, N., and Knight, M. (2006). The snail (Biomphalaria glabrata) genome project. Trends Parasitol *22*, 148-151.

Raghavan, N., Miller, A.N., Gardner, M., FitzGerald, P.C., Kerlavage, A.R., Johnston, D.A., Lewis, F.A., and Knight, M. (2003). Comparative gene analysis of *Biomphalaria glabrata* hemocytes pre- and post-exposure to miracidia of *Schistosoma mansoni*. Mol Biochem Parasitol *126*, 181-191.

Renner, P., Roger, T., and Calandra, T. (2005). Macrophage Migration Inhibitory Factor: Gene Polymorphisms and Susceptibility to Inflammatory Diseases. Clin Infect Dis *41*, S513-S519.

Reyes, J.L., Terrazas, L.I., Espinoza, B., Cruz-Robles, D., Soto, V., Rivera-Montoya, I., Gomez-Garcia, L., Snider, H., Satoskar, A.R., and Rodriguez-Sosa, M. (2006). Macrophage Migration Inhibitory Factor Contributes to Host Defense against Acute *Trypanosoma cruzi* Infection. Infect Immun *74*, 3170-3179.

Riedemann, N.C., Guo, R.-F., and Ward, P.A. (2003). Novel strategies for the treatment of sepsis. Nat Med *9*, 517-524.

Rincón, M., and Davis, R.J. (2009). Regulation of the immune response by stress-activated protein kinases. Immunol Rev *228*, 212-224.

Robinson, M.J., and Cobb, M.H. (1997). Mitogen-activated protein kinase pathways. Curr Opin Cell Biol *9*, 180-186.

Rodriguez-Sosa, M., Rosas, L.E., David, J.R., Bojalil, R., Satoskar, A.R., and Terrazas, L.I. (2003). Macrophage Migration Inhibitory Factor Plays a Critical Role in Mediating Protection against the Helminth Parasite Taenia crassiceps. Infect Immun *71*, 1247-1254.

Roger, E., Grunau, C., Pierce, R.J., Hirai, H., Gourbal, B., Galinier, R., Emans, R.m., Cesari, I.M., Cosseau, C.l., and Mitta, G. (2008a). Controlled Chaos of Polymorphic Mucins in a Metazoan Parasite *Schistosoma mansoni* Interacting with Its Invertebrate Host *Biomphalaria glabrata*. PLoS Negl Trop Dis *2*, e330.

Roger, E., Mitta, G., Moné, Y., Bouchut, A., Rognon, A., Grunau, C., Boissier, J., Théron, A., and Gourbal, B.E.F. (2008b). Molecular determinants of compatibility polymorphism in the *Biomphalaria glabrata*/*Schistosoma mansoni* model: New candidates identified by a global comparative proteomics approach. Mol Biochem Parasitol *157*, 205-216.

Roger, T., David, J., Glauser, M.P., and Calandra, T. (2001a). MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. Nature *414*, 920-924.

Roger, T., Ding, X., Chanson, A.L., Renner, P., and Calandra, T. (2007). Regulation of constitutive and microbial pathogen-induced human macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene expression. Eur J Immunol *37*, 3509-3521.

Roger, T., Glauser, M.P., and Calandra, T. (2001b). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) modulates innate immune responses induced by endotoxin and Gram-negative bacteria. J Endotoxin Res *7*, 456-460.

Roger, T., Miconnet, I., Schiesser, A.-L., Kai, H., Miyake, K., and Calandra, T. (2005). Critical role for Ets, AP-1 and GATA-like transcription factors in regulating mouse Toll-like receptor 4 (Tlr4) gene expression. Biochem J *387*, 355-365.

Rosengren, E., Åman, P., Thelin, S., Hansson, C., Ahlfors, S., Björk, P., Jacobsson, L., and Rorsman, H. (1997). The macrophage migration inhibitory factor MIF is a phenylpyruvate tautomerase. FEBS Lett *417*, 85-88.

Rosengren, E., Bucala, R., Aman, P., Jacobsson, L., Odh, G., Metz, C.N., and Rorsman, H. (1996). The Immunoregulatory Mediator Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Catalyzes a Tautomerization Reaction Mol Med *2*, 143-149.

Ross, A.G.P., Bartley, P.B., Sleigh, A.C., Olds, G.R., Li, Y., Williams, G.M., and McManus, D.P. (2002). Schistosomiasis. N Engl J Med *346*, 1212-1220.

Rutschmann, S., Kilinc, A., and Ferrandon, D. (2002). Cutting Edge: The Toll Pathway Is Required for Resistance to Gram-Positive Bacterial Infections in Drosophila. J Immunol *168*, 1542-1546.

S

Sadd, B.M., and Schmid-Hempel, P. (2006). Insect Immunity Shows Specificity in Protection upon Secondary Pathogen Exposure. Curr Biol *16*, 1206-1210.

Sandland, G., Foster, A., Zavodna, M., and Minchella, D. (2007). Interplay between host genetic variation and parasite transmission in the *Biomphalaria glabrata – Schistosoma mansoni* system. Parasitol Res *101*, 1083-1089.

Satoskar, A.R., Bozza, M., Rodriguez Sosa, M., Lin, G., and David, J.R. (2001). Migration-Inhibitory Factor Gene-Deficient Mice Are Susceptible to Cutaneous *Leishmania major* Infection. Infect Immun *69*, 906-911.

Schneider, D.S., Ayres, J.S., Brandt, S.M., Costa, A., Dionne, M.S., Gordon, M.D., Mabery, E.M., Moule, M.G., Pham, L.N., and Shirasu-Hiza, M.M. (2007). *Drosophila* eiger mutants are sensitive to extracellular pathogens. PLoS Pathog *3*, e41.

Schulenburg, H., Boehnisch, C., and Michiels, N.K. (2007). How do invertebrates generate a highly specific innate immune response? Mol Immunol *44*, 3338-3344.

Schulenburg, H., Hoeppner, M.P., Weiner Iii, J., and Bornberg-Bauer, E. (2008). Specificity of the innate immune system and diversity of C-type lectin domain (CTLD) proteins in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Immunobiology *213*, 237-250.

Schwartz, V., Lue, H., Kraemer, S., Korbiel, J., Krohn, R., Ohl, K., Bucala, R., Weber, C., and Bernhagen, J. (2009). A functional heteromeric MIF receptor formed by CD74 and CXCR4. FEBS Lett *583*, 2749-2757.

Shao, D., Zhong, X., Zhou, Y.-F., Han, Z., Lin, Y., Wang, Z., Bu, L., Zhang, L., Su, X.-D., and Wang, H. (2010). Structural and functional comparison of MIF ortholog from *Plasmodium yoelii* with MIF from its rodent host. Mol Immunol *47*, 726-737.

Shi, X., Leng, L., Wang, T., Wang, W., Du, X., Li, J., McDonald, C., Chen, Z., Murphy, J.W., Lolis, E., *et al.* (2006). CD44 Is the Signaling Component of the Macrophage Migration Inhibitory Factor-CD74 Receptor Complex. Immunity *25*, 595-606.

Sire, C., Rognon, A., and Theron, A. (1998). Failure of *Schistosoma mansoni* to reinfect *Biomphalaria glabrata* snails: acquired humoral resistance or intra-specific larval antagonism? Parasitology *117*, 117-122.

Souza-Neto, J.A., Sim, S., and Dimopoulos, G. (2009). An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. Proc Natl Acad Sci U S A *106*, 17841-17846.

Stojanović, I., Cvjetićanin, T., Lazaroski, S., Stošić-Grujičić, S., and Miljković, D. (2009). Macrophage migration inhibitory factor stimulates interleukin-17 expression and production in lymph node cells. Immunology *126*, 74-83.

Sun, H.W., Bernhagen, J., Bucala, R., and Lolis, E. (1996). Crystal structure at 2.6-A resolution of human macrophage migration inhibitory factor. Proc Natl Acad Sci U S A *93*, 5191-5196.

Suzuki, M., Sugimoto, H., Nakagawa, A., Tanaka, I., Nishihira, J., and Sakai, M. (1996). Crystal structure of the macrophage migration inhibitory factor from rat liver. Nat Struct Mol Biol *3*, 259-266.

Swope, M., Sun, H.-W., Blake, P.R., and Lolis, E. (1998). Direct link between cytokine activity and a catalytic site for macrophage migration inhibitory factor. EMBO J *17*, 3534-3541.

T

Tan, T.H., Edgerton, S.A., Kumari, R., McAlister, M.S., Roe, S.M., Nagl, S., Pearl, L.H., Selkirk, M.E., Bianco, A.E., Totty, N.F., *et al.* (2001). Macrophage migration inhibitory factor of the parasitic nematode *Trichinella spiralis.* Biochem J *357*, 373-383.

Tauszig-Delamasure, S., Bilak, H., Capovilla, M., Hoffmann, J.A., and Imler, J.-L. (2002). *Drosophila* MyD88 is required for the response to fungal and Gram-positive bacterial infections. Nat Immunol *3*, 91-97.

Tauszig, S., Jouanguy, E., Hoffmann, J.A., and Imler, J.-L. (2000). Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in *Drosophila*. Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 10520-10525.

Taylor, S., Landman, M., and Ling, N. (2009). Flow cytometric characterization of freshwater crayfish hemocytes for the examination of physiological status in wild and captive animals. J Aquat Anim Health *3*, 195-203.

Tilo, A., Volker, G., Thuy-Anh, T.-T., Gerhard, S., Mariko, N., and Peter, C.H. (1983). The Biosynthesis of Acute-Phase Proteins in Primary Cultures of Rat Hepatocytes. Eur J Biochem *133*, 561-571.

Timothy, R.D.J.R., Fred, C.G.J.S., Paco, W., Barbara, F., Sita, H.H.M.V., Anneke, G.-M., Thierry, C., Rachelle, D., and Piet, L.C.M.v.R. (2005). Correlation of rheumatoid arthritis severity with the genetic functional variants and circulating levels of macrophage migration inhibitory factor. Arthritis Rheum *52*, 3020-3029.

Tingvall, T.Ö., Roos, E., and Engström, Y. (2001). The GATA factor Serpent is required for the onset of the humoral immune response in *Drosophila* embryos. Proc Natl Acad Sci U S A *98*, 3884-3888.

U

Umemiya, R., Hatta, T., Liao, M., Tanaka, M., Zhou, J., Inoue, N., and Fujisaki, K. (2007). *Haemaphysalis longicornis*: Molecular characterization of a homologue of the macrophage migration inhibitory factor from the partially fed ticks. Exp Parasitol *115*, 135-142.

V

Van der Knaap, W.P.W., and Loker, E.S. (1990). Immune mechanisms in trematode-snail interactions. Parasitol Today *6*, 175-182.

Vaseeharan, B., Lin, Y.-C., Ko, C.-F., Chiou, T.-T., and Chen, J.-C. (2007). Molecular cloning and characterisation of a thioester-containing α2-macroglobulin (α2-M) from the haemocytes of mud crab *Scylla serrata*. Fish & Shellfish Immunology *22*, 115-130.

Vergote, D., Bouchut, A., Sautière, P.E., Roger, E., Galinier, R., Rognon, A., Coustau, C., Salzet, M., and Mitta, G. (2005). Characterisation of proteins differentially present in the plasma of *Biomphalaria glabrata* susceptible or resistant to *Echinostoma caproni*. Int J Parasitol *35*, 215-224.

Vermeire, J.J., Cho, Y., Lolis, E., Bucala, R., and Cappello, M. (2008). Orthologs of macrophage migration inhibitory factor from parasitic nematodes. Trends Parasitol *24*, 355-363.

Vierstraete, E., Verleyen, P., Baggerman, G., D'Hertog, W., Van den Bergh, G., Arckens, L., De Loof, A., and Schoofs, L. (2004). A proteomic approach for the analysis of instantly

released wound and immune proteins in *Drosophila melanogaster* hemolymph. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 470-475.

W

Waeber, G., Thompson, N., Chautard, T., Steinmann, M., Nicod, P., Pralong, F.P., Calandra, T., and Gaillard, R.C. (1998). Transcriptional activation of the Macrophage Migration-Inhibitory Factor gene by the Corticotropin-Releasing Factor is Mediated by the Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate Responsive Element-Binding Protein CREB in Pituitary Cells. Mol Endocrinol *12*, 698-705.

Wang, B., Zhang, Z., Wang, Y., Zou, Z., Wang, G., Wang, S., Jia, X., and Lin, P. (2009). Molecular cloning and characterization of macrophage migration inhibitory factor from small abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. Fish Shellfish Immunol *27*, 57-64.

Warr, E., Das, S., Dong, Y., and Dimopoulos, G. (2008). The Gram-Negative Bacteria-Binding Protein gene family: Its role in the innate immune system of *Anopheles gambiae* and in anti-*Plasmodium* defence. Insect Mol Biol *17*, 39-51.

Watling, D., Guschin, D., Muller, M., Silvennoinen, O., Witthuhn, B.A., Quelle, F.W., Rogers, N.C., Schindler, C., Stark, G.R., Ihle, J.N., *et al.* (1993). Complementation by the protein tyrosine kinase JAK2 of a mutant cell line defective in the interferon-gamma signal transduction pathway. Nature *366*, 166-170.

Watson, F.L., Puttmann-Holgado, R., Thomas, F., Lamar, D.L., Hughes, M., Kondo, M., Rebel, V.I., and Schmucker, D. (2005). Extensive Diversity of Ig-Superfamily Proteins in the Immune System of Insects. Science *309*, 1874-1878.

Weber, A.N.R., Tauszig-Delamasure, S., Hoffmann, J.A., Lelievre, E., Gascan, H., Ray, K.P., Morse, M.A., Imler, J.-L., and Gay, N.J. (2003). Binding of the Drosophila cytokine Spatzle to Toll is direct and establishes signaling. Nat Immunol *4*, 794-800.

Webster, J.P., and Davies, C.M. (2001). Coevolution and compatibility in the snail-schistosome system. Parasitology *123*, 41-56.

Weiser, W.Y., Temple, P.A., Witek-Giannotti, J.S., Remold, H.G., Clark, S.C., and David, J.R. (1989). Molecular cloning of a cDNA encoding a human macrophage migration inhibitory factor. Proc Natl Acad Sci U S A *86*, 7522-7526.

Wu, Z., Boonmars, T., Nagano, I., Nakada, T., and Takahashi, Y. (2003). Molecular expression and characterization of a homologue of host cytokine macrophage migration inhibitory factor from *Trichinella* spp. J Parasitol *89*, 507-515.

X

Xu, D., McSorley, S.J., Tetley, L., Chatfield, S., Dougan, G., Chan, W.L., Satoskar, A., David, J.R., and Liew, F.Y. (1998). Protective effect on *Leishmania major* infection of migration inhibitory factor, TNF-α, and IFN-γ administered orally via attenuated *Salmonella typhimurium*. J Immunol *160*, 1285-1289.

Xu, Y., Tao, X., Shen, B., Horng, T., Medzhitov, R., Manley, J.L., and Tong, L. (2000). Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. Nature *408*, 111-115.

Y

Yoshino, T.P., Coustau, C., Modat, S., and Castillo, M.G. (1999). The *Biomphalaria glabrata* embryonic (Bge) molluscan cell line: establishment of an *in vitro* cellular model for the study of snail host-parasite interactions Malacologia *41*, 331-343.

Yoshino, T.P., Dinguirard, N., Kunert, J., and Hokke, C.H. (2008). Molecular and functional characterization of a tandem-repeat galectin from the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*, intermediate host of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. Gene *411*, 46-58.

Yu, X.Q., Zhu, Y.F., Ma, C., Fabrick, J.A., and Kanost, M.R. (2002). Pattern recognition proteins in *Manduca sexta* plasma. Insect Biochem Mol Biol *32*, 1287-1293.

Yuasa, H.J., Furuta, E., Nakamura, A., and Takagi, T. (1998). Cloning and sequencing of three C-type lectins from body surface mucus of the land slug, *Incilaria fruhstorferi*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol *119*, 479-484.

Z

Zahoor, Z., Davies, A.J., Kirk, R.S., Rollinson, D., and Walker, A.J. (2008). Disruption of ERK signalling in *Biomphalaria glabrata* defence cells by *Schistosoma mansoni*: Implications for parasite survival in the snail host. Dev Comp Immunol *32*, 1561-1571.

Zang, X., Taylor, P., Wang, J.M., Meyer, D.J., Scott, A.L., Walkinshaw, M.D., and Maizels, R.M. (2002). Homologues of human macrophage migration inhibitory factor from a parasitic nematode. J Biol Chem *277*, 44261-44267.

Zelensky, N.A., and Gready, J.E. (2005). The C-type lectin-like domain superfamily. FEBS Journal *272*, 6179-6217.

Zhang, S.-M., Adema, C.M., Kepler, T.B., and Loker, E.S. (2004). Diversification of Ig superfamily genes in an invertebrate. Science *305*, 251-254.

Zhang, S.-M., Léonard, P., Adema, C., and Loker, E. (2001). Parasite-responsive IgSF members in the snail *Biomphalaria glabrata*: characterization of novel genes with tandemly arranged IgSF domains and a fibrinogen domain. Immunogenetics *53*, 684-694.

Zhang, S.-M., and Loker, E.S. (2004). Representation of an immune responsive gene family encoding fibrinogen-related proteins in the freshwater mollusc *Biomphalaria glabrata*, an intermediate host for *Schistosoma mansoni*. Gene *341*, 255-266.

Zhang, S.-M., Yong, Z., and Loker, E.S. (2008). Expression profiling and binding properties of fibrinogen-related proteins (FREPs), plasma proteins from the schistosome snail host Biomphalaria glabrata. Innate Immunity *14*, 175-189.

Zhang, S.-M., Zeng, Y., and Loker, E. (2007). Characterization of immune genes from the schistosome host snail *Biomphalaria glabrata* that encode peptidoglycan recognition proteins and gram-negative bacteria binding protein. Immunogenetics *59*, 883-898.