

MONICA ROY

**MÉCANISME DE RECRUTEMENT DES
LEUCOCYTES DANS LE CERVEAU**

Thèse présentée
à la Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université Laval
dans le cadre du programme de doctorat en Physiologie-endocrinologie
pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)

FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2012

Résumé

Les leucocytes sont connus pour jouer des rôles autant bénéfiques que néfastes dans le système nerveux central. La compréhension de leur mécanisme de recrutement est donc importante afin de contrôler leur circulation à travers la barrière hémato-encéphalique. De façon générale, l'adhésion forte est reconnue comme étant une étape clé de ce recrutement. Les principales actrices qui y sont impliquées sont les chimiokines et les intégrines. Cependant, l'identité de ces dernières peut changer selon le tissu, le stimulus et la nature des leucocytes recrutés. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à une population de leucocytes principalement composée de granulocytes : les leucocytes en forme de bâtonnets. Notre objectif principal a été de caractériser le mécanisme d'adhésion de ces cellules, dans le cerveau, en conditions inflammatoires via l'utilisation d'anticorps neutralisants ou d'animaux déficients pour les gènes d'intérêt. Notre hypothèse a été que l'intégrine $\alpha M\beta 2$, via sa liaison avec ICAM-1, ainsi que l'une des chimiokines liant CXCR2, sont importantes pour l'adhésion des granulocytes en réponse à différents produits bactériens (la toxine pertussique (PTX) et le lipopolysaccharide (LPS)) et durant l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE). Afin de valider cette idée, nous avons, dans un premier temps, déterminé si l'expression spatio-temporelle d'ICAM-1 est régulée par la PTX et/ou le LPS et si son absence ainsi que la neutralisation d' $\alpha M\beta 2$ influencent le recrutement des granulocytes. En second lieu, nous avons déterminé quel ligand de CXCR2 est le plus fortement exprimé dans ces conditions et vérifié si la neutralisation de cette chimiokine, CXCL1, affecte l'adhésion des granulocytes. Nos résultats ont démontré qu'ICAM-1 peut effectivement être régulée par le LPS et la PTX, qu'en réponse à cette dernière toxine, $\alpha M\beta 2$ semble être l'unique intégrine responsable de l'adhésion des leucocytes bâtonnets et qu'elle joue son rôle via, entre autre, ICAM-1. De plus, il s'avère que CXCL1 et CXCR2 sont importants dans l'adhésion des granulocytes en réponse à la PTX et au LPS. Finalement, non seulement la neutralisation de CXCL1 diminue cette même adhésion durant l'EAE, mais réduit également la gravité de la maladie. En conclusion, dans ce projet, nous avons contribué à mieux comprendre le mécanisme de recrutement des granulocytes dans le cerveau sous différentes conditions inflammatoires.

Abstract

Leukocytes are known to be beneficial or detrimental for the central nervous system. Understanding their mechanism of recruitment is very important to control their trafficking across the blood-brain barrier. In general, adhesion is well recognized to be a crucial step in their recruitment and is mediated mainly by chemokines and integrins. However, the identity of these molecules can change according to the tissue, stimulus and nature of the recruited leukocytes. In this work, we were interested by a population of leukocytes mainly composed of granulocytes : leukocytes with a rod-shaped. Our general goal was to characterize the mechanism of granulocyte adhesion in different inflammatory conditions by using neutralizing antibodies or knockout mice. Our hypothesis was that integrin $\alpha M\beta 2$, through its association with ICAM-1, and one of CXCR2 ligand play an important role in granulocyte adhesion in response to bacterial toxins (pertussis toxin (PTX) and lipopolysaccharide (LPS)) and during experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). To validate this concept, we initially examined whether the spatio-temporal expression of ICAM-1 is regulated by PTX and/or LPS and whether its absence and the neutralization of $\alpha M\beta 2$ influence granulocyte recruitment. Second, we determined the most highly expressed CXCR2 ligand in these conditions and whether the neutralization of this chemokine affects granulocyte adhesion to the brain vasculature. Our results revealed that ICAM-1 can be regulated by PTX and LPS and that in response to PTX, $\alpha M\beta 2$ integrin seems to be the unique responsible for leukocyte adhesion and plays its role, in part, via ICAM-1. Moreover CXCL1 and CXCR2 are important in granulocytes adhesion after treatment with PTX and LPS. Finally, it appears that CXCL1 neutralization not only decreases adhesion of granulocyte during EAE, but also reduces the severity of the disease. In conclusion, the results of this project help to better understand the mechanism of recruitment of granulocytes in the brain in different inflammatory conditions.

Avant-propos

Le premier chapitre de cette thèse est un résumé de la littérature portant sur la description de la maladie d'intérêt, la sclérose en plaques, ainsi que sur ses modèles inflammatoires. Également dans ce chapitre, on retrouve une description approfondie du mécanisme de recrutement des leucocytes connu en périphérie, dans le système nerveux central, dans la sclérose en plaques et dans son modèle animal, l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale. Finalement, une caractérisation des cellules d'intérêt dans notre laboratoire, les leucocytes bâtonnets, y est également présentée.

Le chapitre 2 correspond à un article intitulé : *Crawling Phagocytes Recruited in the Brain Vasculature after Pertussis Toxin Exposure through IL6, ICAM1 and ITGaM* où la liste des auteurs est : Jean-François Richard*; Monica Roy*; Julie Audoy-Rémus; Pierrot Tremblay; Luc Vallières. Dans cet article, je suis *co-première auteure, car j'ai contribué de façon égale avec Jean-François Richard aux résultats obtenus. De plus, bien que Luc Vallières a principalement écrit l'article, j'ai contribué au développement du projet, à apporter des idées et à réviser l'article. Cet article, publié dans « Brain Pathology », a permis d'amorcer la caractérisation du mode d'action de la toxine pertussique sur le recrutement des leucocytes bâtonnets. Étant donné que mon projet de doctorat a porté sur la caractérisation de l'étape de l'adhésion forte lors du recrutement leucocytaire, ma contribution à cet article correspond aux figures 4 (A et B), 6 (B, C, D et E) et une partie de 7. Ces figures portent sur l'identification de l'intégrine et de son ligand responsables de cette dite adhésion.

Le chapitre 3 est un article intitulé : *CXCL1 can be regulated by IL-6 and promotes granulocyte adhesion to brain capillaries during bacterial toxin exposure and encephalomyelitis*. Publié dans « Journal of Neuroinflammation » où la liste des auteurs est : Monica Roy*, Jean-François Richard*, Aline Dumas, Luc Vallières. Dans cet article, je suis également *co-première auteure et j'ai réalisé les résultats des figures 1(B et C), 2(B et C), 3(A), 4, 5(A, B et C) ainsi que d'une grande partie de 6. Mon travail a donc contribué à identifier la chimiokine la plus exprimée sous certaines conditions inflammatoires. De plus, j'ai fait la preuve que CXCL1 et CXCR2 sont importants dans l'adhésion des

leucocytes bâtonnets en réponse à la toxine pertussique et au lipopolysaccharide ainsi que durant la forme animale de la sclérose en plaques : l'EAE. Finalement, via le rôle de CXCL1, j'ai démontré que la diminution de l'adhésion des granulocytes dans le cerveau, dans ce même modèle animal, semble influencer la maladie. De plus, bien que Luc Vallières a principalement écrit l'article, j'ai contribué au développement du projet, à apporter des idées et à réviser l'article.

Dans le chapitre 4, on retrouve une discussion générale des résultats obtenus portant sur la compréhension du mécanisme d'action de la toxine pertussique. Il est également question de l'intérêt, entre autre thérapeutique, d'avoir caractérisé l'adhésion forte des granulocytes et leurs rôles potentiels dans des modèles inflammatoires.

En dernier lieu, durant mon doctorat, j'ai également obtenu d'autres résultats non publiés et négatifs. Ils portaient sur l'étude de d'autres chimiokines ainsi que sur un autre ligand d' α M β 2 potentiellement important dans l'adhésion des leucocytes bâtonnets. Ces résultats sont présentés dans les annexes I et II.

Remerciements

Tout d'abord, j'aimerais remercier le Dr Luc Vallières de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Il a toujours été présent pour répondre à mes nombreuses interrogations et m'a guidé tout au long de mon doctorat. Son dynamisme et sa rigueur scientifique ont grandement contribués à ce que je puisse vous présenter cette thèse dont je suis très fière.

Ensuite, j'aimerais remercier mes collègues. Pierrot a été non seulement un assistant de recherche hyper patient pour m'apprendre toutes les nouvelles techniques que je devais faire durant mon doctorat, mais également il était celui qui mettait, la plupart du temps, la bonne humeur dans l'allée. Ensuite, je tiens à remercier Marie-Josée, Aline, Jean-François, Sébastien et Isabelle pour leur aide et pour toutes les discussions bien importantes qu'on a eues durant ces années. Finalement, un gros merci à Dominic d'avoir non seulement été un collègue, mais aussi un ami précieux.

De plus, je suis reconnaissante du soutien financier que j'ai reçu du CRSNG et de la *Multiple sclerosis society of Canada* durant mon doctorat.

Bien sûr, je tiens également à remercier mes amis, mes parents et mes beaux-parents pour m'avoir encouragé tout au long de ces longues études et, malgré le côté abstrait de ma recherche, de s'y être toujours intéressés.

Finalement, un énorme merci à mes deux plus grands complices, mon mari Christian et ma grande puce Laeticia. Ils ont été les piliers de ma réussite par, entre autre, leur présence, leur patience et leur amour. Ils ont aussi toujours su s'adapter à mes horaires et à mon humeur. Il est difficile de trouver les mots qui correspondent vraiment à la reconnaissance que j'ai de les avoir eu à mes côtés. Merci d'avoir été là pour moi !

*À Christian et Laetitia. Faire un doctorat
n'est pas facile et certains ont osé me dire
qu'avoir une petite famille compliquerait les
choses, mais c'est vos encouragements et
votre support qui m'ont été de la plus grande
aide*

Table des matières

Résumé	i
<i>Abstract</i>	ii
Avant-propos	iii
Remerciements	v
Table des matières	vii
Liste des tableaux	ix
Liste des figures	x
Liste des abréviations	xii
Chapitre 1 : Introduction.....	1
1. La sclérose en plaques et ses modèles	2
1.1 : Description de la maladie	2
1.2 : Traitements de la sclérose en plaques.....	5
1.3 : Causes de la sclérose en plaques	6
1.3.1 : La génétique	6
1.3.2 : L'environnement	7
1.3.3 : L'inflammation.....	9
1.4 : Principaux modèles animaux de la sclérose en plaques	10
1.5 : Toxines	12
1.5.1 : Le lipopolysaccharide.....	12
1.5.2 : La toxine pertussique.....	13
2. Mécanismes moléculaires et cellulaires de la sclérose en plaques et de l'EAE	14
3. Mécanismes de recrutement des leucocytes	17
3.1 : Activation de l'endothélium	19
3.2 : Capture et roulement	19
3.3 : Adhésion forte	22
3.3.1 : Les chimiokines.....	23
3.3.2 : Les intégrines.....	32
3.4 : Transmigration.....	37
4. Les leucocytes bâtonnets	39
5. Problématique, hypothèses et objectifs de la thèse.....	40
Chapitre 2 : Les phagocytes patrouillant la vasculature cérébrale sont recrutés lors d'un traitement à la toxine pertussique via IL-6, ICAM-1 et ITG α M.....	43
2.1 : Résumé	45
2.2 : <i>Abstract</i>	46
2.3 : <i>Introduction</i>	47
2.4 : <i>Methods</i>	49
2.5 : <i>Results</i>	54
2.6 : <i>Discussion</i>	59
2.7 : <i>Conclusion</i>	63
2.8 : <i>Acknowledgements</i>	64
2.9 : <i>References</i>	65
2.10 : <i>Figure legends</i>	68

Chapitre 3 : CXCL1 peut être régulé par l'IL-6 et promouvoir l'adhésion des granulocytes aux capillaires cérébraux en réponse à des toxines bactériennes et durant une encéphalomyélite	80
3.1: Résumé	82
3.2 : <i>Abstract</i>	83
3.3 : <i>Introduction</i>	84
3.4 : <i>Methods</i>	86
3.5 : <i>Results</i>	90
3.7 : <i>Conclusion</i>	97
3.8 : <i>Acknowledgements</i>	98
3.9 : <i>References</i>	99
3.10 : <i>Figure legends</i>	103
Chapitre 4 : Discussion et conclusion.....	113
Bibliographie	125
Annexe I : Résultats supplémentaires partie I : Expression et rôle de CCR1, CCR2 et CX3CR1 ainsi que de leurs ligands en réponse au LPS ou à la PTX.....	160
Annexe II : Résultats supplémentaires partie II : Expression du ligand d' α M β 2 : RAGE, en réponse au LPS ou à la PTX	164

Liste des tableaux

Tableau 1: Résumé des traitements de la SEP.....	5
Tableau 2A : Résumé des études sur les chimiokines dans la SEP et l'EAE.....	28-29
Tableau 2B : Résumé des études sur les récepteurs des chimiokines dans la SEP et l'EAE.....	30-31
Tableau 3A : Résumé des études sur les intégrines dans la SEP et l'EAE.....	35
Tableau 3B : Résumé des études sur les deux principaux ligands des intégrines dans la SEP et l'EAE.....	36

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1 : Schéma illustrant les différentes formes de la sclérose en plaques.....	4
Figure 2 : Distribution géographique mondiale de la sclérose en plaques	7
Figure 3 : Modèle moléculaire et cellulaire de la sclérose en plaques proposé à partir de l'EAE.....	16
Figure 4 : Étapes du mécanisme de recrutement des leucocytes	18
Figure 5 : Liaisons possibles entre les chimiokines et leurs récepteurs	24
Figure 6 : Principales voies de signalisation des récepteurs des chimiokines.....	26
Figure 7 : Schéma d'un exemple de structure d'intégrine (α L β 2)	33

Chapitre 2

Figure 1 : <i>Increased numbers of crawling leukocytes in the cerebral vasculature during PTX exposure and EAE.</i>	72
Figure 2 : <i>Angpt2 is not expressed in the brain in response to PTX and is not involved in EAE</i>	73
Figure 3 : <i>PTX induces few transcriptional changes in cultured cerebral endothelial cells</i>	74
Figure 4 : <i>PTX induces VCAM1 and ICAM1 expression in cerebral blood vessels.</i>	75
Figure 5 : <i>PTX induces the expression of IL6 but not of IL1β, TNF and IFNγ.</i>	76
Figure 6 : <i>IL6 mediates the effects of PTX on the recruitment of crawling leukocytes and the post-transcriptional expression of ICAM1 in the brain vasculature.</i>	77
Figure 7 : <i>Crawling leukocytes depend on ITGαM and ICAM1 for adhesion to the cerebral vasculature in response to PTX.</i>	78
Figure 8 : <i>A proposed mechanism by which phagocytes are recruited at the blood-brain interface in response to PTX.</i>	79

Chapitre 3

Figure 1 : <i>Upregulation of CXCR2 ligands in the brain after exposure to bacterial toxins</i>	107
Figure 2 : <i>Upregulation of CXCR2 ligands in the brain and spinal cord during EAE.</i>	108
Figure 3 : <i>Regulation of CXCL1 expression by IL-6 in cerebral endothelial cells in vivo and in vitro.</i>	109
Figure 4 : <i>Contribution of the CXCL1–CXCR2 axis to leukocyte adhesion within the cerebral vasculature in response to bacterial toxins.</i>	110
Figure 5 : <i>Contribution of CXCL1 to the development of EAE.</i>	111
Figure 6 : <i>Mechanism of granulocyte recruitment at the blood-brain interface during PTX exposure.</i>	112

Annexe I

Figure I.1 : Expression de CCL5, CCL9 et CCL2 dans le cerveau de souris lors d'une endotoxémie provoquée par le LPS.	160
Figure I.2 : Recrutement des leucocytes bâtonnets et ronds chez des animaux de souche sauvage ou déficients pour les récepteurs CCR1 et CCR2 lors d'une endotoxémie provoquée par le LPS.....	161

Figure I.3 : Expression de CX3CL1 dans le cerveau de souris lors de traitement au LPS ou à la PTX	162
Figure I.4 : Recrutement des leucocytes bâtonnets et ronds chez des animaux de souche sauvage ou déficients pour le récepteur CX3CR1	163

Annexe II

Figure II.1 : Expression de RAGE dans le cerveau de souris lors de traitement au LPS ou à la PTX	164
---	-----

Liste des abréviations

AC	Adénylate cyclase
Ang2	Angiopoïétine-2
BHE	Barrière hémato-encéphalique
Ca ²⁺	Calcium
CMH II	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
CPM	Cellules phagocytaires mononuclées
DAG	Diacylglycérol
EAE	Encéphalomyélite auto-immune expérimentale
EGF	Facteur de croissance de l'épiderme (<i>epidermal growth factor</i>)
Epac	Facteur d'échange activé par l'AMPc (<i>exchange protein activated by cAMP</i>)
ESAM	Molécule d'adhérence sélective des cellules endothéliales (<i>endothelial cell-specific adhesion molecule</i>)
ESL-1	Ligand 1 de la sélectine-E (<i>E-selectin ligand-1</i>)
ICAM	Molécule d'adhésion intracellulaire (<i>intercellular adhesion molecule</i>)
IFN	Interféron
IL	Interleukine
IP3	Inositol 1,4,5-triphosphate
IMR	Imagerie par résonance magnétique
JAM	Molécule d'adhésion jonctionnelle (<i>junctional adhesion molecule</i>)
LCR	Liquide céphalo-rachidien
LPN	Leucocytes polynucléaires
LPS	Lipopolysaccharide
MadCAM-1	Molécule d'adhésion cellulaire muqueuse-1 (<i>mucosal vascular addressin cell adhesion molecule-1</i>)
MAG	Glycoprotéine associée à la myéline (<i>myelin-associated glycoprotein</i>)
MAPK	Protéines kinases activées par les mitogènes (<i>mitogen-activated protein kinases</i>)
MBP	Protéine basique de myéline (<i>myelin basic protein</i>)
MMP	Métalloprotéinase
MOG	Glycoprotéine de la myéline oligodendrocytaire (<i>myelin oligodendrocyte glycoprotein</i>)

NMP	Neuromyélie optique
NO	Oxyde nitrique
PECAM-1	Molécule d'adhésion des cellules endothéliales et des plaquettes-1 (<i>platelet/endothelial cell adhesion molecule-1</i>)
OSP	Glycoprotéine oligodendrocyte spécifique (<i>oligodendrocyte-specific glycoprotein</i>)
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PK	protéine kinase
PLC	Phospholipase C
PLP	Protéine protéolipide (<i>myelin proteolipid protein</i>)
PP-SEP	Forme primaire-progressive de la sclérose en plaques
PR-SEP	Forme progressive-récurrente de la sclérose en plaques
PSGL-1	Glycoprotéine ligand 1 de la sélectine-P (<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i>)
PTX	Toxine pertussique
RAGE	Récepteur des produits de glycation avancée (<i>advanced glycosylation end product-specific receptor</i>)
ROS	Dérivés actifs de l'oxygène (<i>reactive oxygen species</i>)
RR-SEP	Forme cyclique de la sclérose en plaques
SEP	Sclérose en plaques
SLA	Sclérose latérale amyotrophique
SNC	Système nerveux central
SP-SEP	Forme secondaire-progressive de la sclérose en plaques
TNF	Facteur de nécrose tumorale (<i>tumeur necrosis factor</i>)
VAP-1	Protéine 1 d'adhésion vasculaire (<i>vascular adhesion protein-1</i>)
VCAM	Molécule d'adhésion cellulaire vasculaire (<i>vascular cell adhesion molecule</i>)
VE-cadhérine	Cadhérine endothéliale vasculaire
UV	Ultraviolet

Chapitre 1 : Introduction

Les leucocytes constituent un système de défense très important pour les organismes humains et animaux. Par contre, dans certaines circonstances encore mal expliquées, ils attaquent également les cellules saines, menant au développement de maladies auto-immunes telles que la sclérose en plaques (SEP). Afin que les leucocytes puissent pénétrer dans le système nerveux central (SNC), ils doivent d'abord être recrutés de la périphérie et traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE). Par contre, bien qu'il soit reconnu qu'un tel recrutement est augmenté en condition pathologique, la caractérisation de ce mécanisme est encore à ce jour incomplète. En effet, malgré les nombreuses connaissances acquises en périphérie, la particularité de la BHE nécessite de valider ou encore d'élucider ce mécanisme spécifiquement pour le SNC. La pleine compréhension du mécanisme de recrutement des leucocytes dans ce système est un enjeu très important afin d'ultimement développer des thérapies efficaces contre des maladies telles que la SEP. Par ailleurs, non seulement les molécules impliquées peuvent varier selon le type de leucocytes recrutés, mais également selon les tissus et les stimuli inflammatoires. De ce fait, une caractérisation du mécanisme de recrutement de chacune des populations de leucocytes ainsi que de l'influence des différentes conditions stimulant ce recrutement doit être effectuée. Dans le modèle animal de la SEP, l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), la toxine pertussique (PTX) agit comme stimulus en mimant une infection et potentialise la maladie. Par contre, on ignore encore par quel mécanisme elle agit exactement. Élucider le mode d'action de la PTX sur le recrutement des différents types de leucocytes dans le SNC peut nous apporter des informations importantes pour mieux comprendre et guérir la SEP

1. La sclérose en plaques et ses modèles

1.1 : Description de la maladie

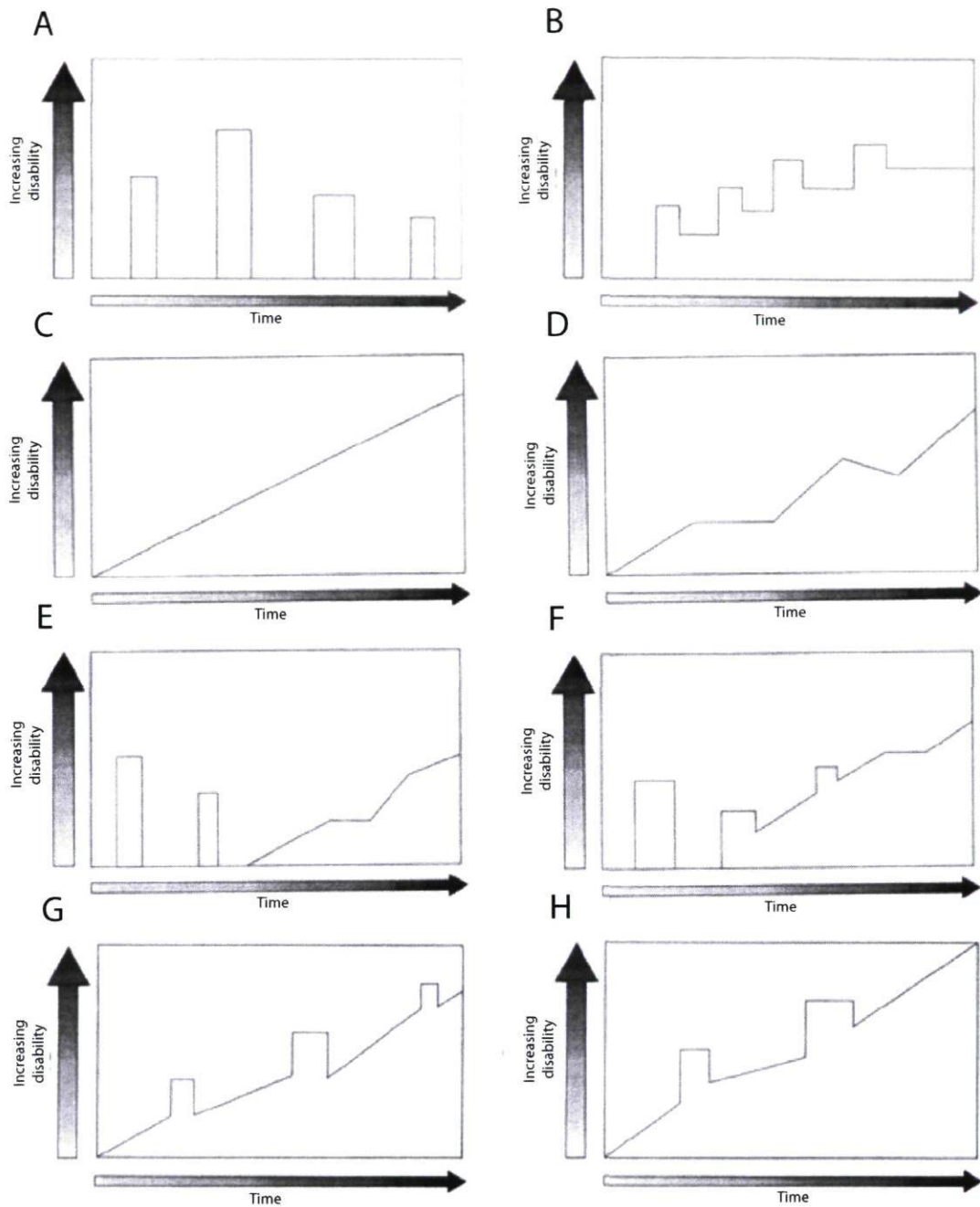
Décrite pour la première fois en 1868 par un neurologue français, le Dr Jean-Martin Charcot [1], la SEP est une maladie auto-immune démyélinisante du SNC. En effet, lors de cette affection neurologique, le système immunitaire est anormalement activé, ce qui engendre une attaque de la myéline. Il y a alors la formation de lésions démyélinisantes (plaques) où l'on retrouve des dommages et des pertes d'axones [2, 3]. La dissémination dans le temps et dans l'espace des plaques crée non seulement un problème pour poser le diagnostic, mais en fait également une maladie polymorphe [4, 5]. Lorsque les plaques sont formées dans le nerf optique, la moelle épinière, le tronc cérébral, le cerveau ou le cervelet [2, 6], les principaux symptômes sont: faiblesse et spasmes musculaires, troubles de coordination, vertige, troubles de mémoire, dysfonctions urinaires et sexuelles, douleur, engourdissements, dépression, anxiété, troubles visuels, fatigue et somnolence, maux de tête, problèmes de déglutition, troubles intestinaux, etc. [7-17]. Parmi les symptômes moins fréquents, il y a la dystonie, les troubles olfactifs, l'aphasie, la perte auditive et l'épilepsie [18-22]. Un autre fait intéressant au sujet des symptômes de la SEP est que lorsque les lésions se manifestent d'abord dans les zones périventriculaires cérébrales, il n'y a souvent aucune manifestation clinique au début de la maladie, même que chez certains individus, le diagnostic sera posé que lors de l'autopsie [2, 19, 23].

Bien que les enfants puissent être atteints de la SEP, cette maladie se développe généralement entre 15 et 40 ans [24]. Les femmes sont plus touchées que les hommes, soit en général deux fois plus. Au Canada, elles le sont jusqu'à trois fois plus. L'incidence de cette maladie varie d'ailleurs selon les pays et, au Canada, elle touche environ 1/500 personnes, soit entre 13 000 et 18 000 Québécois et entre 55 000 et 75 000 Canadiens [5].

Il n'y a pas que les symptômes qui soient multiples, mais également les formes de la maladie, lesquelles sont définies en fonction des différents patrons de rémission et

d'attaque (exacerbation). Les attaques sont dues aux dommages et à la perte des axones causés par leur démyélinisation. Pour leur part, les rémissions sont attribuables à la remyélinisation, à la redistribution des canaux sodium sur les axones, à une compensation du SNC telle que l'augmentation de l'activité cérébrale et/ou à une diminution de l'inflammation [25]. Au total, il existe quatre formes de manifestations cliniques de la maladie. Il y a la forme cyclique (RR-SEP) qui se manifeste par des exacerbations suivies de périodes de rémission complète ou partielle (Figure 1A et B). De plus, entre chacune des attaques, aucune progression de la maladie n'est notée et cette période peut durer très longtemps (mois ou années). Il s'agit de la forme la plus fréquente, soit environ 85-90% des cas. La forme primaire-progressif (PP-SEP) se caractérise par une progression de la maladie dès l'apparition des signes cliniques (figure 1C) et où l'on peut parfois noter des plateaux ou de faibles améliorations (figure 1D). Cette forme touche environ 10-15% des patients. La forme secondaire-progressif (SP-SEP), quant à elle, fait suite à la forme cyclique, c'est-à-dire qu'environ 50% des gens ayant la forme RR-SEP vont voir leur maladie s'aggraver de façon continue où pourront apparaître quelques rares plateaux, améliorations ou petites attaques (Figure 1E et F). Finalement, la forme progressive-récurrente (PR-SEP) se manifeste par une progression continue avec certains épisodes d'exacerbation où la rémission est absente ou très faible (Figure 1G et H). C'est la forme la plus rare de la maladie [5, 26, 27].

Le principe de base du diagnostic de la SEP est qu'il doit y avoir la preuve d'une dissémination dans le temps et dans l'espace d'au moins deux plaques dans le SNC. C'est par une combinaison d'analyses et de critères que cette dissémination est démontrée, puisqu'il n'existe encore aucun test simple et unique [28]. Les différents outils utilisés sont : 1) l'histoire médicale complète, qui met en évidence les différents symptômes de la SEP; 2) l'imagerie par résonance magnétique (IRM), qui permet de visualiser les plaques; 3) l'étude du liquide céphalo-rachidien (LCR), où, contrairement au sérum du patient, la présence de bandes oligoclonales d'immunoglobulines fait preuve d'une synthèse intrathécale d'immunoglobulines et 4) l'évaluation des potentiels évoqués visuels, qui, par la mise en place stratégique de petites électrodes au niveau de la tête, détermine s'il y a des anomalies d'influx nerveux [6, 28-30].



Adaptée de Lublin et coll., 1996

Figure 1 : Schéma illustrant les différentes formes de la sclérose en plaques

La forme cyclique (Figure A et B) est la forme la plus fréquente de la maladie et dans environ 50% des cas, elle se développe en forme secondaire-progressive (Figure E et F). Pour leur part la forme primaire-progressive (figure C et D) et la forme progressive-récurrente (figure G et H) affectent respectivement 10-15% et 5% des patients.

1.2 : Traitements de la sclérose en plaques

Malgré toutes les recherches menées sur la SEP à ce jour, il n'existe aucun remède pour guérir cette maladie. Les traitements existants sont classés en trois catégories. La première est celle des médicaments qui modifient l'évolution de la maladie, la deuxième atténue les rechutes et la dernière diminue les symptômes. Les principaux traitements et les mécanismes d'actions proposés des deux premières catégories sont résumés au tableau 1. Ce dernier ne comprend pas une liste de la dernière catégorie, car tel que mentionné dans la section précédente, les symptômes sont très nombreux. Alors, une grande quantité de produits peut cibler ces différentes manifestations cliniques. Il s'agit donc de traitements « cas par cas » selon les symptômes et les réponses de chaque patient à chaque traitement. Donc, malgré la grande quantité de produits utilisés dans le but d'améliorer la qualité de vie des gens atteints de la SEP, non seulement aucun de ceux qui existent ne peut guérir la maladie, mais certains causent même des effets secondaires très importants. Par exemple, certains patients traités avec le natalizumab ont développé une leucoencéphalopathie [31]. La découverte d'un traitement guérissant la SEP est donc encore un enjeu de grande envergure.

Tableau 1: Résumé des traitements de la SEP

Traitements	Mécanismes d'actions
(IFN- β)-1b et 1a	<ul style="list-style-type: none">- Immunorégulateur- Inhibition de l'adhésion- Blocage des MMPs- Blocage de la présentation d'antigène
Acétate de glatiramère	<ul style="list-style-type: none">- Immunorégulateur- Augmentation des lymphocytes T régulateurs- Diminue la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires- Blocage de la présentation d'antigène
Mitoxantrone	<ul style="list-style-type: none">- Immunorépresseur- Blocage de la prolifération des lymphocytes T- Diminue la sécrétion des cytokines Th1
Natalizumab	<ul style="list-style-type: none">- Blocage de l'intégrine $\alpha 4\beta 1$- Diminue l'adhésion des lymphocytes T
Corticostéroïdes	<ul style="list-style-type: none">- Diminue l'inflammation- Restaure la BHE

Réalisé à partir de Frohman et coll., 2006

1.3 : Causes de la sclérose en plaques

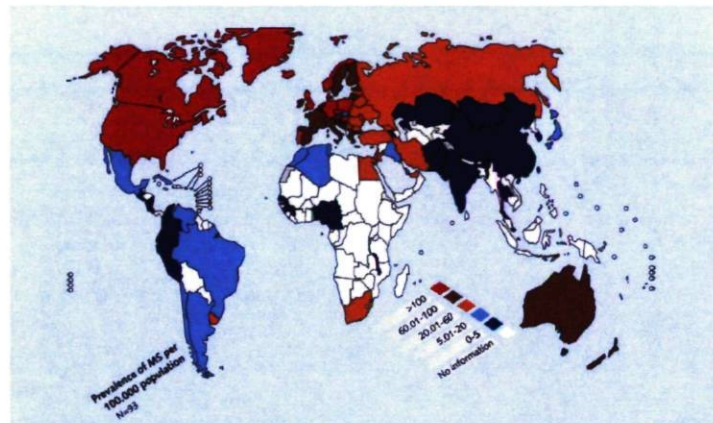
Une autre raison, qui fait de la SEP une maladie encore mal comprise, est que la cause de la maladie demeure encore inconnue. En effet, diverses causes sont suspectées d'être impliquées dans l'étiologie de la maladie telles que des facteurs génétiques et environnementaux.

1.3.1 : La génétique

L'un des facteurs candidats responsable de la SEP est la génétique. En effet, des études d'agrégation familiale ont révélé que le risque de développer la SEP augmente avec le degré de parenté avec une personne déjà atteinte de la maladie [32-34]. L'importance potentielle de la contribution génétique a donc mené à chercher l'identité du ou des gènes de susceptibilité. Parmi tous les gènes étudiés, trois candidats se sont révélés être majoritairement impliqués. Le premier groupe, reconnu depuis de nombreuses années, correspond aux haplotypes des gènes HLA-DR et HLA-DQ et, entre autre chez les caucasiens, l'haplotype en question est le DR15, DQ6 [26, 35-37]. Dernièrement, ce sont les gènes de deux récepteurs qui ont été révélés comme étant des facteurs de risque. Il s'agit du récepteur alpha de l'interleukine-2 (IL-2R-alpha) et du récepteur alpha de l'interleukine-7 (IL-7R-alpha) [38, 39]. Évidemment, bien que ces gènes soient associés à une probabilité plus élevée de développer la maladie, aucun n'est l'unique cause de la SEP. Alors, de nombreux autres gènes ont été étudiés tels que ceux de chimiokines, de cytokines, d'immunoglobulines, de molécules de surfaces des cellules T, etc. Certaines relations ont été écartées, d'autres, telles que des polymorphismes, ont été détectées chez des gens souffrant de la SEP. Par contre, encore là, aucun de ces gènes ne semble être exclusivement la cause de la maladie [40-46].

1.3.2 : L'environnement

L'autre facteur suspecté d'être responsable de la SEP est l'environnement. La contribution de ce dernier est mise en évidence par une distribution géographique bien particulière de la maladie. En effet, tel qu'illustré à la figure 2, l'incidence de la maladie est beaucoup plus faible dans les pays tropicaux que dans les pays tempérés, c'est-à-dire qu'on note une augmentation de la maladie avec la latitude [4, 47-50].



Tirée de Milo et coll., 2010

Figure 2 : Distribution géographique mondiale de la sclérose en plaques

Une augmentation des cas de SEP est généralement observée avec la latitude.

Il existe donc des zones à hauts risques de développer la maladie et des zones à faibles risques. Bien sûr, une distribution géographique particulière pourrait être due à des caractéristiques génétiques des populations occupant ces zones géographiques. Cependant, supportant l'hypothèse d'un rôle important de l'environnement, il a été démontré que si une population donnée migre d'une zone à fort risque vers une zone à faible risque, les chances que les membres de cette population développent la SEP sont diminuées comparativement aux personnes restées dans le pays d'origine. L'inverse est également vrai [4, 51]. Parmi les candidats environnementaux, on retrouve l'exposition aux rayons ultraviolets (UV). En

effet, il existe une corrélation inverse entre l'exposition aux rayons solaires et la susceptibilité de développer la SEP [52]. Le rayonnement UV est la principale source de vitamine D. Cette production est d'abord réalisée par les fibroblastes dermaux ainsi que par les kératinocytes épidermiques qui absorbent les rayons UVB (290-315 nm) via le déhydrocholestérol présent dans leur membrane plasmique. Il y aura alors transformation dans l'organisme en vitamine D₃, puis en 25-hydroxyvitamine D₃ et finalement en forme biologiquement active et utilisée par le corps : le 1,25-dihydroxyvitamine D₃ [53]. Alors, l'une des explications à la corrélation négative décrite précédemment serait un effet protecteur de la vitamine D [47, 50, 54-57]. Son mode d'action pourrait être de diminuer l'inflammation dans le SNC. En effet, diverses études effectuées chez des animaux souffrant d'EAE et traités avec le 1,25-dihydroxyvitamine D₃ ont démontré soit une augmentation de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-4 et le TGF-β1, une diminution de l'accumulation de macrophages dans le SNC, une inhibition du développement des lymphocytes Th1 ou une augmentation de l'apoptose des cellules CD4⁺ [55, 58-60]. Une autre observation, supportant l'effet bénéfique de la vitamine D, est la relation entre le risque qu'une personne développe la SEP et le mois auquel elle est née. En effet, les personnes nées en mai seraient plus susceptibles d'être atteintes de cette maladie contrairement à celles nées en novembre, lesquelles seraient d'ailleurs les moins à risque de développer la SEP. L'une des explications à cette observation serait le niveau d'exposition de la mère aux UV durant la grossesse [61].

Un autre facteur environnemental suspecté d'être impliqué dans la SEP est l'infection. L'une des observations supportant cette hypothèse est que plus de 90% des patients atteints de cette maladie manifestent une très haute concentration d'IgG dans leur cerveau et dans leur LCR [62]. De plus, il a été démontré qu'après une infection, le risque d'être victime d'une exacerbation est augmenté [63-65]. La responsabilité réelle d'une telle infection reste à découvrir, mais il est possible qu'elle puisse mener à une activation non spécifique des cellules auto-réactives entraînant une réponse inflammatoire auto-immune amplifiée [26]. Une autre évidence qui supporte l'idée que l'infection est importante dans l'étiologie de la SEP, est que les souris transgéniques qui expriment le récepteur de cellules T spécifiques de la MBP (*myelin basic protein*) ne peuvent pas développer d'EAE

spontanée tant qu'elles sont hébergées en milieu stérile ou qu'elles n'ont pas eu d'injection de PTX, laquelle est utilisée pour mimer l'infection dans l'induction de l'EAE [66]. Il existe un autre mécanisme par lequel les agents infectieux pourraient causer la SEP : le mimétisme moléculaire. Ce dernier correspond à l'activation de cellules auto-réactives par un antigène de l'agent infectieux qui a soit un épitope partagé ou une conformation spatiale très similaire avec un antigène du soi (la myéline dans ce cas-ci) [26]. Un des candidats pour ce dernier mécanisme est le virus d'Epstein-Barr, lequel cause la mononucléose [4, 67]. L'hypothèse liée à ce virus est que la dite infection aurait eu lieu des années avant le début de la maladie. L'agent d'infection pourrait alors demeurer latent durant plusieurs années avant d'être ré-activé et responsable de la maladie ou encore créer une réaction immunitaire continue [62, 67]. Supportant l'implication du virus, il a été démontré que les gens non-infectés ou infectés tôt dans leur vie, c'est-à-dire qui développent rarement la mononucléose, ont moins de chance de développer la SEP [68]. De plus, une plus forte quantité d'anticorps contre ce virus a été détectée chez les personnes atteintes de la SEP, bien que 95% des gens soient porteurs du virus [67]. Le virus d'Epstein-Barr n'est pas le seul agent infectieux potentiellement impliqué, puisque l'herpès virus 6 et 1 humain, le virus de la varicelle et du zona ainsi que la bactérie *Chlamydia pneumoniae* font aussi partie des candidats suspectés [26].

D'autres facteurs environnementaux, tels que la cigarette et l'apport d'antioxydants dans l'alimentation, ont également été suspectés d'être impliqués dans la SEP [47]. En effet, certaines études ont démontré qu'il pouvait y avoir un risque plus élevé de développer la SEP chez les fumeurs ou encore que la prise d'antioxydants dans l'alimentation empêche ou retarde le développement de l'EAE [69, 70]. Par contre, aucun d'eux n'est encore reconnu comme étant l'unique responsable de la SEP.

1.3.3 : L'inflammation

Bien que la cause exacte de la SEP demeure inconnue, il est généralement admis qu'il s'agit d'une maladie auto-immune inflammatoire. L'inflammation est donc un élément clé. De très nombreux faits supportent cette idée. Par exemple, il est connu que le transfert de cellules T CD4⁺ spécifiquement auto-réactives pour la myéline chez des souris

naïves mène au développement de l'EAE [26]. Aussi, les plaques caractéristiques de la maladie sont peuplées d'une très grande quantité de lymphocytes T ($CD8^+$ et $CD4^+$) et de macrophages activés [71]. Il a même été démontré que les macrophages au centre des plaques pouvaient contenir des débris de myéline, démontrant ainsi l'importance de leur rôle de phagocyte [72]. Une infiltration de leucocytes polynucléaires dans le SNC a également été notée durant l'EAE [73, 74]. De plus, de nombreuses cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-6, l'IL-12 et l'IL-17, sont augmentées chez les malades et les souris déficientes pour certaines cytokines, telles que l'IL-6 ou l'IL-23, sont résistantes à l'EAE [2, 26, 75, 76]. Cette liste n'est pas exhaustive, mais elle démontre bien le rôle important de l'inflammation dans la SEP. Les nombreuses recherches menées sur le sujet apportent même des pistes quant aux mécanismes moléculaires et cellulaires inflammatoires impliqués dans cette maladie. Étant donné que l'inflammation est le sujet principal de ce travail, une attention particulière sera portée à ce mécanisme et sera décrit dans la section 2.

1.4 : Principaux modèles animaux de la sclérose en plaques

Un nombre important de connaissances que nous avons au sujet de la SEP a bien sûr été acquis à partir d'études effectuées chez les patients. Cependant, une grande partie de celles-ci provient également de l'utilisation de différents modèles animaux soient : la démyélinisation par la cuprizone, le virus de Theiler et l'EAE. Dans le cadre de ce projet de doctorat, nous nous sommes plus particulièrement intéressé à l'EAE. En effet, ce modèle permet non seulement de caractériser le côté auto-immunitaire de la SEP, mais également d'évaluer et de caractériser la participation potentielle de différents facteurs environnementaux sur la maladie. C'est donc ce modèle qui sera décrit dans la présente section.

Bien que l'EAE ne soit pas le reflet exact de la SEP, puisqu'il s'agit d'une inflammation auto-immune provoquée, il est reconnu qu'il s'agit d'un modèle de prédilection pour étudier la maladie. En effet, il aide à mieux comprendre l'implication de différents gènes et facteurs environnementaux sur les processus inflammatoires impliqués dans l'initiation et le développement de la maladie. De plus, contrairement à l'infection

créée par le virus de Theiler, l'EAE peut être causée chez diverses espèces animales, incluant les primates non-humains. C'est d'ailleurs chez le singe que l'EAE a été induite pour la première fois en 1933 [77]. Aussi, en apportant certaines modifications lors de l'immunisation, telles que modifier le produit d'émulsion à l'aide d'ultrason, il est possible d'induire l'EAE chez différentes souches de rongeurs dont les souris BALB/c. Ainsi, on peut acquérir des informations supplémentaires sur le processus inflammatoire. En effet, dans ce contexte, contrairement à l'EAE induite chez des souches de souris plus conventionnelles, les neutrophiles sont les principaux leucocytes recrutés et, malgré ce changement, les signes cliniques de la maladie sont similaires. Ce résultat peut donc apporter de nouvelles informations sur l'importance de cette population de leucocytes dans la maladie [78]. Le modèle conventionnel de l'EAE est caractérisé par une infiltration de cellules inflammatoires créant des lésions démyélinisantes qui apparaissent en premier dans la moelle épinière [79]. La manifestation clinique de l'EAE est donc généralement une paralysie ascendante, c'est-à-dire qu'elle commence par une perte de mouvement de la queue (ramollissement), suivie d'une paralysie des membres postérieurs, puis des membres antérieurs [79]. La progression des signes cliniques est notée de 0 à 5, où le 0 représente un animal non malade et le 5 un animal moribond ou mort. L'EAE est une pathologie qui se manifeste assez rapidement, c'est-à-dire que les signes cliniques apparaissent généralement entre les jours 10 et 15. Finalement, une faible rémission peut être observée et, s'il s'agit de l'EAE sous la forme cyclique, la rémission peut être plus importante et être suivie d'une exacerbation [79].

Il existe deux modèles d'EAE, mais tous deux partent du même principe, c'est-à-dire l'activation en périphérie de cellules T CD4⁺ reconnaissant une protéine de la myéline [80].

Le premier modèle, le modèle actif, est induit par une immunisation avec des antigènes de myéline, tels que la MBP, le PLP (*myelin proteolipid protein*) ou encore le MOG (*myelin oligodendrocyte glycoprotein*), dans un adjuvant complet de Freud. Ce dernier est composé de *mycobacterium tuberculosis* mort dans une émulsion d'huile et d'eau. De plus, afin d'augmenter la sévérité et l'incidence de la maladie, une injection de PTX est également donnée à l'animal [80-82]. L'effet de cette toxine sera discuté dans le

prochain chapitre. Bien que le MOG, le MBP et le PLP soient les antigènes les plus utilisés pour induire l'EAE actif, d'autres peuvent être employés tels que la MAG (*myelin-associated glycoprotein*) la protéine S100 β , l'OSP (*oligodendrocyte-specific glycoprotein*) [26, 82, 83].

Le deuxième modèle est l'EAE passif. Il est induit par le transfert adoptif, dans des souris naïves, de cellules T isolées de souris préalablement induites par l'injection d'antigènes de la myéline [79, 82]. Dans ce modèle, on peut, entre autre, modifier *in vitro* les cellules transférées pour les rendre fluorescentes, afin de les suivre durant la pathologie et ainsi mieux caractériser leur rôle. Il est également possible de modifier certaines de leurs caractéristiques toujours dans le but d'étudier leurs fonctions [79].

1.5 : Toxines

Tel que mentionné précédemment, il est généralement bien reconnu que l'inflammation joue un rôle important dans la SEP. Afin de mieux comprendre quelles influences peut avoir l'environnement, et plus précisément dans le cadre du présent travail une infection sur une telle inflammation, les toxines bactériennes peuvent s'avérer être des outils précieux. En effet, par leur capacité à mimer certains aspects des infections, leur utilisation peut fournir des informations importantes pour ultimement développer de cibles thérapeutiques efficaces. Le lipopolysaccharide (LPS) est l'une des toxines les plus utilisées pour étudier l'implication du système immunitaire lors d'une inflammation systémique. Dans le cadre de ce travail, elle a surtout été utilisée à titre comparatif. En effet, lors de l'induction de l'EAE, la PTX est l'un des agents qui substitue l'infection, mais son mode d'action est méconnu. C'est pour cette raison que notre intérêt a davantage été porté sur cette toxine.

1.5.1 : Le lipopolysaccharide

Le lipopolysaccharide est une endotoxine présente dans les membranes externes des bactéries gram-négatives et il est bien connu pour stimuler le système immunitaire inné [84-86]. En effet, le LPS se lie tout d'abord à une protéine soluble, la LBP, qui s'associe au CD14. Par la suite, il sera dirigé vers le récepteur TLR4, lequel doit également être lié au

MD-2 afin que la voie signalétique subséquente puisse être activée [87]. Après sa liaison avec le LPS, le TLR4 oligomérisse et ensuite, par diverses régions de son domaine TIR, recrute la protéine MyD88 qui, via des kinases associées au récepteur d'IL-1 (IRAK) et TRAF6, active la translocation nucléaire du NF- κ B ou de l'AP-1 [88, 89]. Ainsi, diverses cytokines inflammatoires, molécules d'adhésion, chimiokines, etc., seront produites et conduiront à une inflammation systémique [86, 88, 90]. L'utilisation du LPS et la régulation des molécules inflammatoires qu'il affecte ont été étudiées dans divers systèmes de l'organisme dont le SNC. En effet, dans ce système, il a entre autre été démontré le LPS régule l'expression de l'IL-6, de l'IL-1 β , du *tumor necrosis factor* (TNF) et de l'angiopoïétine-2 (Ang2) [91, 92]. Son utilisation apporte donc des informations de première ordre sur la réponse inflammatoire du SNC lors d'une inflammation systémique.

1.5.2 : La toxine pertussique

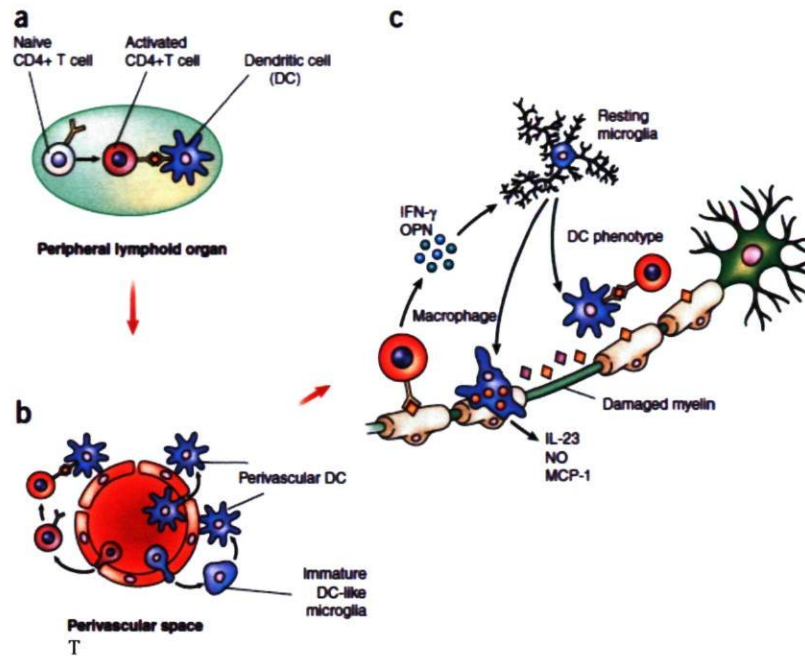
Dans l'EAE, la toxine utilisée pour mimer l'infection et augmenter la sévérité la maladie est la toxine pertussique. La compréhension de son mécanisme d'action, lequel est encore méconnu, procure des informations essentielles sur l'influence d'un tel stimulus sur le processus inflammatoire de cette maladie. La PTX est produite par la *Bordetella pertussis*. C'est une toxine qui possède six sous-unités. Une seule d'entre-elles, soit celle nommée S1 ou A, possède une activité enzymatique. En effet, les cinq autres, soit celles correspondant aux portions S2 à S5 ou nommées portion B, se lient à la surface cellulaire [93, 94]. La principale fonction pour laquelle la PTX a longtemps été reconnue est d'altérer la signalisation des protéines G. En effet, la sous-unité S1 hydrolyse le NAD cellulaire. Le ADP-ribose libéré sera alors transféré à un résidu cystéine de la région C-terminale de la sous-unité α de protéines G (G_i) et fera une ADP-ribosylation de cette dernière. Il y aura alors activation de l'adénylate cyclase, production d'AMPc ainsi que suractivation des voies subséquentes. De plus, cette modification empêche tout récepteur d'activer la dite protéine G [93-96]. À noter qu'il est suggéré que pour jouer son rôle, la sous-unité S1 est d'abord dissociée des autres sous-unités et que le réticulum endoplasmique est un organe très important pour cette action de la sous-unité S1 [94, 97].

Concernant son rôle dans l'EAE, la PTX a été utilisée pour la première fois dans les années 50 [98]. Depuis, de façon courante, on administre cette toxine aux animaux afin de potentialiser la maladie. Cependant, malgré son importance dans l'induction de l'EAE, son mode d'action est encore méconnu. En effet, il a longtemps été suggéré que l'unique rôle de la PTX dans l'EAE est d'augmenter la perméabilité de la BHE [99], facilitant ainsi la circulation des cellules inflammatoires vers le SNC. Par la suite, il a été découvert que la PTX peut activer la signalisation cellulaire via le récepteur TLR4 et qu'elle augmente l'expression d'une molécule importante dans le recrutement des leucocytes, la sélectine-P [100]. De plus, non seulement la PTX stimule le recrutement des Th1 dans le SNC, mais elle peut aussi être responsable de la production, entre autre, d'IFN- γ et d'IL-17 par les lymphocytes T, tout comme elle semble accroître la réponse de ces cellules en activant les cellules présentatrices d'antigène [81, 100-102]. Également, chez des souris où la chimiokine CCL2 est sur-exprimée, l'injection de la PTX provoque, en plus d'une forte infiltration de leucocytes dans le cerveau, une induction de métalloprotéinases (MMP-8,10 et ADAM-12), d'IL-1 β et de TNF [103]. La PTX semble donc agir sur différentes composantes du processus inflammatoire, c'est-à-dire qu'elle n'intervient pas uniquement sur la perméabilité de la BHE. Alors, continuer d'élucider son mécanisme d'action peut contribuer à mieux comprendre, entre autre, quelle influence peut avoir les agents infectieux sur l'inflammation dans l'EAE et ultimement dans la SEP.

2. Mécanismes moléculaires et cellulaires de la sclérose en plaques et de l'EAE

Les détails du processus inflammatoire impliqué dans la SEP ne sont pas encore tous connus, mais grâce aux nombreuses études effectuées sur l'EAE, un modèle de mécanisme moléculaire et cellulaire de la maladie est proposé. Ce dernier est illustré à la figure 3 et se décrit comme suit : en périphérie et fort probablement dans les organes lymphoïdes, des cellules présentatrices d'antigène, telles que les cellules dendritiques, activent des lymphocytes T CD4⁺ en les exposant à l'antigène de la myéline via leur complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II). Une fois activés, ces lymphocytes T vont migrer vers le SNC. Ensuite, ils vont être ré-activés par des cellules présentatrices d'antigène de ce système (cellules dendritiques ou microglie). Une fois que les cellules T sont ré-activées,

elles produisent des cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ , OPN, LT etc.) qui, à leur tour, activent les microglies et macrophages du SNC. Ces derniers relâchent également des cytokines pro-inflammatoires, créant une boucle d'activation. De plus, ils secrètent des substances toxiques, telles que l'oxyde nitrique (NO) ou des dérivés actifs de l'oxygène (ROS), qui peuvent attaquer soit les oligodendrocytes ou directement les axones. Également, ils peuvent devenir des phagocytes de la myéline menant ainsi à la destruction de cette dernière. Une augmentation de chimiokines est également notée, laquelle mène au recrutement de d'autres cellules inflammatoires dans le SNC. Un bris de la BHE sera aussi ultimement observé [26, 104-107]. L'identité de l'antigène impliqué dans la maladie n'est pas encore connue, mais des études suggèrent qu'il pourrait s'agir du MOG, de la MBP, de la PLP, de la MAG, de l'OSP ou encore du MOBP, soit la vaste majorité des protéines de la myéline [108]. En effet, ces antigènes de la myéline peuvent être utilisés pour induire l'EAE, démontrant ainsi leur rôle potentiel dans la maladie [108-112]. Concernant les lymphocytes T, on a longtemps cru que les cellules Th1 étaient les principales cellules T impliquées dans la maladie, mais de récentes évidences supportent l'idée que les Th17 y sont les principaux acteurs [113, 114].



Tirée de Platten et coll., 2005

Figure 3 : Modèle moléculaire et cellulaire de la sclérose en plaques proposé à partir de l'EAE

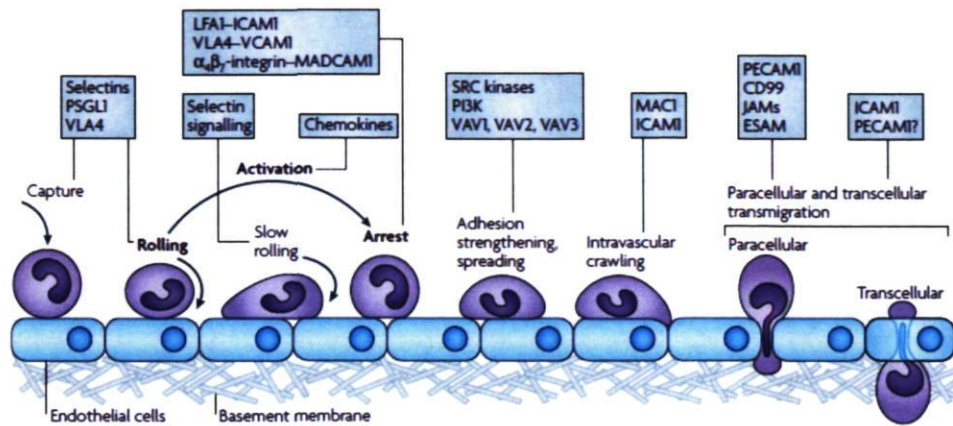
Les lymphocytes T sont d'abord activés en périphérie par des cellules présentatrices d'antigène avant de migrer vers le SNC où ils seront ré-activés. Les cytokines pro-inflammatoires qu'ils sécrètent stimulent alors les microglies et les macrophages du SNC.

Dans le modèle proposé et décrit, les cellules présentatrices d'antigène et les lymphocytes T sont les principales cellules immunitaires importantes dans la SEP. Cependant, de plus en plus de recherches menées au sujet de l'inflammation dans la SEP et dans l'EAE démontrent qu'une autre population serait importante dans la maladie, les granulocytes. En effet, bien qu'on retrouve peu de granulocytes dans les lésions des patients, leur nombre est augmenté dans le sang des patients [115, 116]. De plus, l'analyse de ces granulocytes a démontré que chez les patients ils sont un fort potentiel de dégranulation et de production de ROS [117]. Finalement, chez les gens souffrants de la neuromyéélite optique (NMO) une maladie très similaire à la SEP plus commune, c'est-à-dire qu'elle est caractérisée par la présence de lésion démyélinisante dans la moelle épinière et le nerf optique, les neutrophiles sont une population de leucocytes grandement retrouvée

dans les lésions [118]. Concernant la forme animale de la maladie, non seulement leur recrutement augmente avec les signes cliniques dans l'EAE [74], mais l'utilisation d'un anticorps, qui déplete ces cellules ainsi qu'une portion de cellules monocytaires, empêche également le développement de la maladie chez l'animal [119, 120]. De plus, lorsque l'EAE est induite chez la souche de souris BALB/c, souris ayant des signes cliniques similaires à ceux des souches conventionnelles, les neutrophiles sont les principaux leucocytes infiltrés [78]. La connaissance du rôle que peut jouer ces cellules dans la maladie est donc un nouvel enjeu pour la recherche sur la SEP.

3. Mécanismes de recrutement des leucocytes

Afin qu'un processus inflammatoire puisse prendre place dans un tissu donné, il est important que les leucocytes soient recrutés dans ce tissu. Ils doivent donc préalablement traverser l'endothélium via un mécanisme de recrutement bien précis. De façon générale, et principalement décrit en périphérie, le processus de recrutement, illustré à la figure 4, comporte différentes étapes. Tout d'abord, il y a capture et roulement des leucocytes sur l'endothélium activé. Cette étape est assurée principalement par les sélectines. Ensuite, les chimiokines activent les intégrines présentes sur les leucocytes. Cette activation permettra l'adhésion forte des leucocytes par l'interaction de ces intégrines avec des molécules d'adhésion sur l'endothélium. Une fois adhérents fortement, les leucocytes vont patrouiller la vasculature avant de transmigrer, par diapédèse, dans le tissu. Les principaux acteurs de cette étape sont les chimiokines, les intégrines, les molécules d'adhésion et les métalloprotéinases [121-126].



Tiré de Ley et coll., 2007

Figure 4 : Étapes du mécanisme de recrutement des leucocytes

Les leucocytes sont d'abord capturés et adhèrent faiblement à l'endothélium. Ensuite, ils sont activés, puis adhèrent fortement avant de patrouiller et de transmigrer par diapédèse dans le tissu.

Dans la SEP, le mécanisme du recrutement leucocytaire occupe également une place importante, car tel que mentionné précédemment, les leucocytes doivent pénétrer dans le SNC pour que la maladie s'amorce et progresse. Cependant, une autre particularité s'ajoute à cette pathologie. En effet, contrairement aux autres systèmes de la périphérie, avant de pénétrer dans le SNC, les cellules doivent traverser une structure unique à ce système, la BHE. Cette dernière représente un endothélium non fenêtré et scellé par des jonctions serrées. De plus, l'étanchéité de la BHE est encore plus assurée par la présence de péricytes et de pieds d'astrocytes [121, 127, 128]. Alors, par cette structure, la circulation cellulaire à travers la BHE est très limitée. Par conséquent, bien que la connaissance approfondie du mécanisme de recrutement des leucocytes en périphérie nous apporte un certain nombre d'informations, nous ne pouvons être certain que ce dernier soit parfaitement transposable au SNC. Sa caractérisation dans le SNC peut donc apporter des informations importantes permettant d'ultimement développer des cibles thérapeutiques

pour le traitement de la SEP. De plus, étant donné que le mécanisme de recrutement des leucocytes est le sujet principal de la présente thèse, dans les sections suivantes, chacune de ses étapes sera décrite comme suit : d'abord les connaissances acquises en périphérie seront présentées, puis celles confirmées dans le SNC et finalement celles concernant plus particulièrement la SEP et l'EAE.

3.1 : Activation de l'endothélium

Lorsqu'on décrit le mécanisme général de recrutement des leucocytes dans la littérature, on mentionne très souvent la capture et le roulement comme étant les premières étapes de ce recrutement. Par contre, il est important de souligner qu'afin que l'endothélium exprime les différentes composantes importantes dans ce mécanisme, telles que les sélectines, il doit d'abord être activé [129, 130]. Les médiateurs inflammatoires les plus connus pour jouer ce rôle sont les cytokines, l'histamine, la thrombine et les leucotriènes et ce, autant au niveau de la périphérie qu'au niveau du SNC. [92, 126, 131-144]. Bien que les principales cytokines impliquées dans l'activation de l'endothélium soient l'IL-1 β , le TNF et l'IFN γ , d'autres évidences démontrent la participation de certaines autres cytokines, telles que l'IL-6, laquelle, via son récepteur, IL-6R α et la sous-unité gp130, active la voie de signalisation JAK/STAT3 [145-147]. Il s'agit d'ailleurs d'une cytokine importante dans l'EAE, puisqu'en son absence, les souris sont résistantes à cette maladie [75, 148]. Au niveau de la SEP, l'IL-6 peut être augmentée chez les patients [149]. Par contre, les études n'arrivent pas toutes à ce même résultat, ce qui peut s'expliquer par la durée de vie relativement courte des cytokines [150, 151].

3.2 : Capture et roulement

Une fois l'endothélium activé, la première étape proprement dit du recrutement est la capture et le roulement des leucocytes. Elle est principalement médiée par les sélectines. En effet, ces dernières vont attraper les leucocytes, ce qui aura pour effet de réduire leur vélocité et d'amorcer leur roulement sur l'endothélium. La famille des sélectines comprend trois membres : 1) la sélectine-L (CD62L), qui est exprimée sur la majorité des leucocytes;

2) la sélectine-P (CD62P), qui est retrouvée sur l'endothélium et les plaquettes activés et 3) la sélectine-E (CD62E) qui est exprimée uniquement sur l'endothélium sous conditions inflammatoires [123]. De façon plus précise, on peut retrouver la sélectine-L chez tous les monocytes et granulocytes ainsi que chez la plupart des lymphocytes [152-155]. Concernant la sélectine-P, dans l'endothélium, elle est entreposée dans les corps de Weibel-Palade. Une stimulation provoque alors la fusion de ces corps avec la membrane plasmique endothéliale exposant ainsi la sélectine-P en quelques minutes seulement [155, 156]. Pour sa part, la sélectine-E, à l'exception de la peau, n'est pas emmagasinée dans l'endothélium et doit donc être synthétisée *de novo* lors de stimulations inflammatoires [155, 156].

Les sélectines sont des glycoprotéines transmembranaires de type I [155, 156]. Leur portion N-terminale extracellulaire est considérablement bien conservée entre chacune d'elles et entre les espèces. Cette région est composée d'un domaine lectine, suivit d'un domaine EGF (*epidermal growth factor*) et d'un nombre variable de répétitions et de domaines homologues aux protéines régulatrices du complément (domaine CR) [154, 155]. Les portions transmembranaires et cytoplasmiques diffèrent plus entre les trois sélectines, mais demeurent bien conservées entre les espèces [154]. Les sélectines se lient à leurs ligands via les hydrates de carbones présents sur ces derniers de façon calcium-dépendante [155]. Le ligand commun aux trois sélectines est PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*) et il est retrouvé sur les leucocytes et parfois sur les cellules endothéliales [126, 154, 157-159]. De plus, il est important de noter que PSGL-1 doit être glycosylé afin d'être le ligand des sélectines [123]. Une autre nuance à apporter est que malgré sa capacité à être lié à la sélectine-E, PSGL-1 n'est pas son principal ligand [154, 160]. En effet, CD44, ESL-1 (*E-selectin ligand-1*) de même que l'intégrine $\alpha M\beta 2$ sont d'autres ligands potentiels de cette sélectine [123, 126, 161].

Au début de la présente section, il a été mentionné que les sélectines sont les principales actrices de la première étape du recrutement des leucocytes. Par contre, elles ne sont pas les seules. En effet, des études ont démontré qu'en absence de ces trois sélectines, la capture n'est pas totalement éliminée et que l'intégrine $\alpha 4$ et ses ligands peuvent être responsables d'une partie de cette capture et du roulement des leucocytes lors de

l'inflammation [154, 162-164]. De plus, l'importance de VAP-1 (*vascular adhesion protein-1*) a également été démontrée dans le roulement des leucocytes [165].

Au niveau du SNC, bien qu'il ait été démontré que l'intégrine $\alpha 4$ puisse effectivement participer au roulement leucocytaire [163, 166, 167], c'est surtout les sélectines qui ont été étudiées dans cette étape. Il a d'ailleurs été démontré autant *in vitro* qu'*in vivo* que toutes les sélectines sont induites par des stimulants (IL- β , TNF, LPS) et dans des maladies telles que l'ischémie-reperfusion (AVC), la malaria, la méningite. [139, 141, 168-177].

Chez les patients souffrant de la SEP, la forme soluble des sélectines- L, E et P est retrouvée dans le LCR, le plasma et/ou le sérum. L'augmentation de la sélectine-P soluble corrèle même avec la présence et la grosseur des plaques [178-184]. D'un point de vue fonctionnel, la sélectine-L et son ligand, PSGL-1, sont fortement exprimés par les cellules T CD8⁺ de malades lorsque comparés à des contrôles sains. De plus, lorsque ces cellules humaines sont injectées chez la souris, il a été démontré que PSGL-1 contribue grandement à leur capture et à leur roulement, ce qui ne semble pas être le cas pour les lymphocytes CD4⁺ [169]. En effet, même s'il a été démontré que les cellules CD4⁺ peuvent exprimer PSGL-1 et la sélectine-P [185, 186], il semblerait que ce soit VCAM-1, lequel est un ligand d' $\alpha 4$, qui permet la capture et le roulement de ces cellules humaines lorsque transférées chez la souris [169].

Dans l'EAE, il a été démontré que les leucocytes exprimant la sélectine-L sont augmentés dans le cerveau avant l'apparition des signes cliniques, que la sélectine-P est également exprimée chez les souris malades et que les microglies et les cellules T expriment PSGL-1 [164, 187-189]. Les résultats fonctionnels, quant à eux, diffèrent selon les études et selon le modèle d'induction de la maladie. On se rappellera que l'EAE peut être induit de façon active par des antigènes de la myéline ou de façon passive par le transfert adoptif de cellules T. Dans des études où la protéine de myéline utilisée pour l'induction était la MPB ou le MOG, la neutralisation ou l'absence de la sélectine-L, avant le début des signes cliniques, a diminué voire supprimé la maladie. Chez le modèle par transfert adoptif, une telle neutralisation diminue beaucoup moins la sévérité de la maladie,

même que dans certains cas, il n'y a pas d'effet [190-193]. En ce qui concerne PSGL-1, la sélectine-P et la sélectine-E, leur absence ou leur neutralisation n'affecte pas l'EAE induit avec le MOG ou par transfert adoptif [164, 188, 189, 194-197]. Par contre, même sans effet clinique, la neutralisation de la sélectine-P diminue grandement le roulement leucocytaire [164]. Concernant les autres molécules, la neutralisation de CD44 et de l'intégrine $\alpha 4$ empêche le développement de l'EAE. Par contre, dans une étude, on a démontré qu'afin que l'effet d' $\alpha 4$ se situe au niveau du roulement, sa neutralisation doit être combinée à celle d'une autre molécule telle que la sélectine-P [164, 195, 198]. Concernant VAP-1, son inhibition, durant le pic de la maladie, diminue grandement la sévérité de cette dernière [199]. Ces études démontrent donc que l'étape de la capture et du roulement des leucocytes est cruciale pour initier ou développer l'EAE.

Une autre étude a été réalisée avec le modèle de la PTX. L'étude en question a démontré que la toxine induit l'expression de la sélectine-P dans l'endothélium cérébral et que l'absence de cette dernière diminue l'inflammation cérébrale causée par la PTX, entre autre, en bloquant le roulement des leucocytes [100].

Au sujet des traitements de la SEP, aucun n'est spécifiquement dirigé contre l'étape du roulement. En effet, bien que le natalizumab cible l' $\alpha 4\beta 1$, son effet ne serait pas au niveau de la capture et du roulement, mais plutôt au niveau de l'adhésion forte [200-202].

3.3 : Adhésion forte

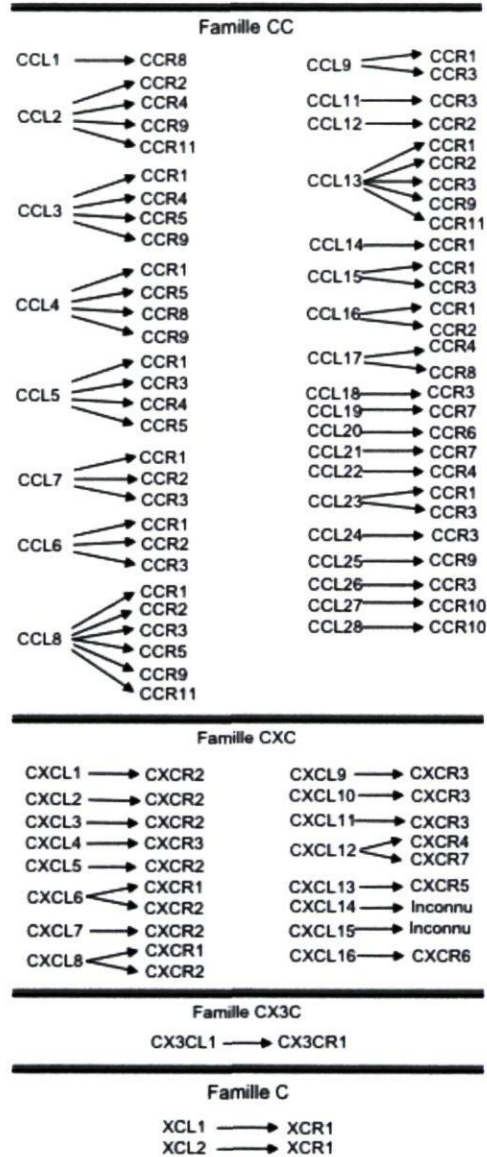
Une fois que les leucocytes ont été capturés et qu'ils ont amorcé leur roulement, ils entrent en contact avec des molécules nommées chimiokines, lesquelles sont liées à des glycosaminoglycanes présentes sur l'endothélium [122, 123, 203-206]. Alors, il y aura liaison entre les récepteurs des chimiokines présents sur les leucocytes et ces chimiokines. Ainsi, une activation de voies signalétiques, dans le leucocyte, sera déclenchée menant à l'activation d'intégrines et ultimement à l'adhésion forte et au patrouillage des leucocytes [122]. L'adhésion forte est, dans la présente recherche, l'étape d'intérêt, c'est donc cette dernière qui sera décrite le plus en détails.

3.3.1 : Les chimiokines

Les chimiokines sont de petites protéines sécrétées (8-14 kDa) à l'exception faite de CX3CL1 et CXCL16 qui peuvent être transmembranaires. Parmi leurs stimuli, on compte les cytokines telles que l'IL-1, le TNF, l'IFN, l'IL-17 et l'IL-4 [122, 205, 206]. À ce jour, on connaît environ 50 chimiokines classées en quatre sous-classes selon le nombre et l'espacement de leurs résidus de cystéine dans leur région N-terminale. La sous-catégorie C possède seulement deux cystéines reliées entre elles par un pont disulfure. Les sous-divisions CC, CXC et CX3C possèdent toutes quatre cystéines et sont classées selon le nombre d'acides aminés séparant les deux premières cystéines [122, 205-208]. Dans le sous-groupe CXC, une seconde subdivision existe soit par la présence ou non d'un motif tripeptide composé par l'acide glutamique, la leucine et l'arginine (ELR). À noter qu'à l'exception de CXCL15, les chimiokines ELR⁺ représentent les ligands de CXCR2 [207-209]. Les chimiokines sont préférentiellement associées à certains groupes de leucocytes. En effet, les chimiokines C recrutent surtout les lymphocytes, alors que le sous-groupe CC excelle au niveau des monocytes, des lymphocytes T, des éosinophiles, des basophiles, des cellules dendritiques et des cellules NK. Pour sa part, la sous-catégorie CX3C agit sur les cellules NK, les monocytes et les lymphocytes T. Finalement la sous-classe CXC divise ses préférences selon ses groupes ELR⁺ ou ELR⁻. Les chimiokines CXC ELR⁺ recrutent les neutrophiles, alors que celles ELR⁻ ciblent les lymphocytes T et les monocytes [131, 207].

Concernant les récepteurs des chimiokines, ils sont constitués de sept domaines transmembranaires d'environ 40 kDa, qui se lient à des protéines G, et ont un niveau d'homologie de 25% à 80%. Ils sont composés d'un court domaine N-terminal extracellulaire de trois boucles qui lie le ligand et d'une région C-terminale également formée de trois boucles qui, pour sa part, transduit le signal [122, 131, 207, 210]. Certains d'entre eux, tels que CXCR4, CCR2 et CCR5 sont, après leur liaison avec leur ligand, sous forme dimérique, laquelle semble nécessaire à l'activation des voies signalétiques subséquentes [207, 211]. Concernant cette liaison récepteur-ligand, outre pour CX3CR1, qui se lie uniquement avec CX3CL1 et vice versa, il est possible qu'une chimiokine lie plusieurs récepteurs et qu'un récepteur puisse lier plusieurs chimiokines à l'intérieur d'une

même sous-classe [207, 208]. Toutes les interactions possibles et connues à ce jour sont résumées à la figure 5.

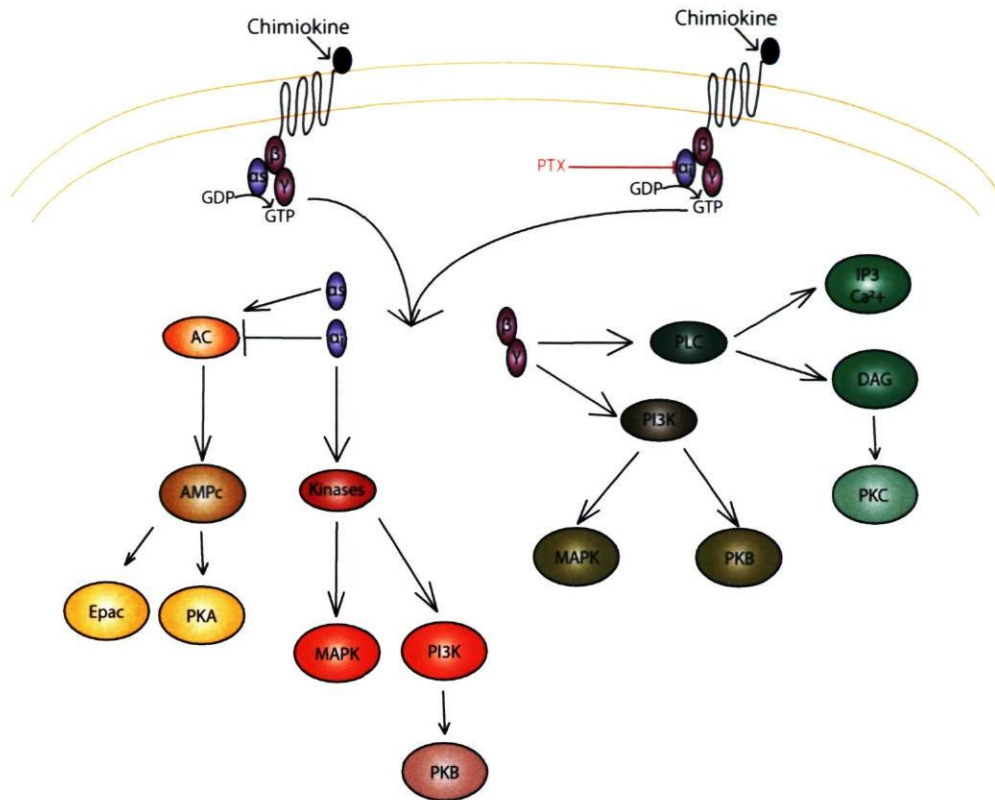


Réalisée à partir de Bajetto et coll., 2001, Carter et coll., 2005, Fukumoto et coll., 2004, Gonzalez-Scarano et coll., 2005, Kallankari et coll., 2010, Savarin-Vuaillet et coll., 2007, Yamamoto et coll., 2011 et Zabel BA et coll., 2009

Figure 5 : Liaisons possibles entre les chimiokines et leurs récepteurs

Une chimiokine peut généralement lier plusieurs récepteurs et un récepteur peut avoir plusieurs ligands dans une même classe.

La liaison des chimiokines avec leurs récepteurs active non seulement différents canaux ioniques, tels que ceux du calcium et du potassium, mais aussi elle agit directement sur diverses voies signalétiques [207, 212]. En effet, selon le type de chimiokines, le récepteur et les circonstances impliquées, cette liaison affecte différentes voies de signalisation intracellulaire [122, 211, 213]. Un modèle général des principales voies, les plus reconnues, est illustré à la figure 6. Tout d'abord, après que la chimiokine ait lié son récepteur, il y a échange du GDP pour le GTP sur la sous-unité α de la protéine G hétérotrimérique à laquelle ils sont associés. Ensuite, il y a séparation des portions α et $\beta\gamma$ et donc possibilité de stimuler diverses voies via l'une ou l'autre de ces portions [131, 213]. La voie signalétique, qui a longtemps été reconnue comme étant celle de prédilection des protéines G, est celle impliquant la sous-unité α_i , sous-unité cible de la PTX, qui, contrairement à la sous-unité $G_{\alpha s}$, inhibe l'adénylate cyclase (AC). Ainsi, le niveau d'AMPc est diminué tout comme l'activation des voies impliquant la PKA (protéine kinase A) et l'Epac (exchange protein activated by cAMP) [213-215]. Évidemment, d'autres voies ont été démontrées importantes dans la signalisation de la sous-unité α_i . En effet, via l'activation de diverses kinases (tyrosines kinases ou Src kinases), il peut y avoir soit activation de MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) ou la PI3K (phosphoinositide 3-kinase). D'ailleurs, cette dernière pourra ultimement activer la PKB (protéine kinase B) [213, 215-218]. Pour sa part, la portion $\beta\gamma$ peut mener à l'activation de la PLC (phospholipase C), ce qui augmente le niveau d'IP3 (inositol 1, 4,5-triphosphate) et de Ca^{2+} (calcium). De plus, cette phospholipase mène aussi à la production du DAG (diacylglycérol) qui, ultimement, peut stimuler de la PKC (protéine kinase C). Une autre voie que peut activer les sous-unités $\beta\gamma$ est celle de la PI3K. Par la suite, il peut y avoir soit stimulation de la PKB ou encore de MAPK [126, 207, 213, 219]. Finalement, l'internalisation et la phosphorylation du récepteur mettent fin au signalement émis par ce dernier [206, 208].



Réalisée à partir de Zarbock et coll., 2009, Thelen, 2001, Cartier et coll., 2005, Bajetto et coll., 2001, Proost et coll., 1996, Mellado et coll., 2001, Imhof et coll., 2004, Domanska et coll., 2010, Murdoch et coll., 2000, Wu et coll., 2009

Figure 6 : Principales voies de signalisation des récepteurs des chimiokines

Une fois que la chimiokine a lié le récepteur, il y a échange du GDP pour le GTP, séparation des sous-unités α et $\beta\gamma$ qui activent différentes voies de signalisation selon la chimiokine, le tissu et/ou le stimulus.

Dans le SNC, les chimiokines et leurs récepteurs sont des molécules grandement étudiées. Leurs expressions et leurs fonctions dans l'adhésion de tous les types de leucocytes ont été démontrées en réponse à de nombreux stimuli dont l'IFN γ , le TNF, l'IL- β et le LPS ou en conditions pathologiques (ischémie, méningite, alzheimer, infection virale, VIH, etc.) [207, 208, 219-241].

Concernant la SEP et l'EAE, il existe également un grand nombre de recherches menées sur les chimiokines. Alors, afin de faciliter l'interprétation de toutes ces études, les résultats obtenus, portant sur leurs expressions et/ou leurs rôles inflammatoires dans la SEP ou l'EAE, sont résumés aux tableaux 2A (chimiokines) et 2B (récepteurs). Deux tableaux séparant les chimiokines et les récepteurs ont été créés, car dû aux relations récepteur-ligand multiples, le rôle d'un ligand n'est pas automatiquement attribuable à un seul récepteur et vice versa. De plus, à noter que les résultats présentés dans ces tableaux sont, pour l'EAE, ceux obtenus dans le système d'intérêt de la présente recherche, le SNC. Par contre, étant donné que ce type de résultats est plus difficile à obtenir chez les patients atteints de la SEP, dans leur cas, les résultats acquis en périphérie ont également été rapportés.

Au sujet des thérapies de la SEP, il a été démontré que celles sur le marché peuvent faire varier l'expression de diverses chimiokines [242-244]. Par contre, malgré le grand nombre d'études effectuées sur les chimiokines et des résultats très intéressants pour certaines d'entre elles dans l'EAE, à ce jour, aucun traitement ne cible précisément ces protéines. En effet, bien que des études portant sur certains de leurs récepteurs, tels que CCR1 et CCR2, ont été réalisées ou sont encore cours, les résultats de ces dernières se sont avérés négatifs ou demeurent à connaître [234, 242, 245]. Une notion qui peut complexifier l'élaboration d'un traitement avec les chimiokines et/ou leur récepteur est, encore une fois, les liens multiples entre les ligands et leurs récepteurs. En effet, bloquer un récepteur pourrait empêcher ses liaisons avec de nombreux ligands et vice versa et ainsi non seulement prévenir le recrutement de tout un type de leucocytes pathologiques, mais aussi celui de leucocytes importants dans la défense dite « normale » de l'organisme tel que démontré avec un traitement de la sclérose ciblant un récepteur impliqué dans le recrutement de leucocytes, l'intégrine $\alpha 4$ [246]. De plus, concernant les récepteurs, les bloquer pourrait mener à un surnombre de ligands tel que démontré avec CXCR3, CXCR2 et CCR2 [247]. Alors, si ces ligands possèdent un autre récepteur potentiel, dans une maladie plus longue que l'EAE, telle que la SEP, un mécanisme de compensation ou d'effet indésirable pourrait se produire. Toutes ces notions sont donc très importantes à considérer dans l'élaboration d'un traitement à partir de ces molécules.

Tableau 2A : Résumé des études sur les chimiokines dans la SEP et l'EAE

Nom	Études dans la SEP	Études dans l'EAE	Réf.*
CCL2	<ul style="list-style-type: none"> - Expression associée à l'endothélium, aux gros vaisseaux des lésions, aux cellules périvasculaires et aux astrocytes - ↑, ↓ ou ≠ dans le LCR ou le sérum - ↓ dans les CPM activées du sang - ↑ durant la rémission - ↓ chez les patients en phase aiguë 	<ul style="list-style-type: none"> - Expression similaire aux signes cliniques - Expression associée aux astrocytes, aux CPM et à l'endothélium - ↑ dans la zone sub-ventriculaire - CCL2^{-/-}, antagoniste et vaccin : retarde le début et ↓ la sévérité jusqu'à la suppression, sauf une étude par transfert adoptif : pas d'effet sur la maladie - CCL2^{-/-}, antagoniste et vaccin : ↓ l'adhérence et les CPM infiltrées 	[119, 248-272]
CCL3	<ul style="list-style-type: none"> - Expression associée à l'endothélium, aux CPM et aux astrocytes - ↑ dans le LCR 	<ul style="list-style-type: none"> - Expression similaire aux signes cliniques - Expression associée aux CPM et aux astrocytes - Neutralisation : ↓ la sévérité et l'inflammation dont l'infiltration des cellules T - Vaccin : ↓ la sévérité et les CPM - CCL3^{-/-} : ≠ 	[119, 248, 250, 256, 261, 265, 266, 268, 270, 271, 273-278]
CCL4	<ul style="list-style-type: none"> - ↑ dans les lésions 	<ul style="list-style-type: none"> - Expression similaire aux signes cliniques - Expression associée aux CPM périvasculaires, aux astrocytes et à l'endothélium - Vaccin : ↑ la sévérité et l'infiltration des CPM 	[261, 266, 267, 270, 278, 279]
CCL5	<ul style="list-style-type: none"> - ↑ dans le sérum, le LCR et dans les lésions - Expression associée à l'endothélium 	<ul style="list-style-type: none"> - ↑ au pic de la maladie - Expression associée surtout aux cellules T, mais aussi aux CPM et aux astrocytes - Recombinant bloqueur : ↓ la sévérité mais pas l'infiltration des CPM - Neutralisation ou vaccin: ≠ ou ↓ l'adhérence des leucocytes 	[119, 250, 257, 261, 266, 270, 274, 277, 278, 280-284]
CCL6		<ul style="list-style-type: none"> - Expression associée aux cellules inflammatoires 	[261]
CCL7	<ul style="list-style-type: none"> - Expression autour des vaisseaux avec des leucocytes infiltrés, mais aussi dans le cortex non affecté 		[264]
CCL19	<ul style="list-style-type: none"> - ↑ dans le LCR et dans les lésions - Concorde avec la production d'IgG 	<ul style="list-style-type: none"> - ↑ au pic de la maladie - Expression associée aux astrocytes, aux CPM et à l'endothélium - CCL19^{-/-}/CCL21^{-/-} : résistant, ↓ l'adhésion et l'infiltration 	[119, 261, 285-288]
CCL20	<ul style="list-style-type: none"> - ↑ dans le sérum 	<ul style="list-style-type: none"> - ↑ au pic de la maladie - Expression associée aux astrocytes - Neutralisation : résistant et ↓ les CPM infiltrées 	[289-294]
CCL21		<ul style="list-style-type: none"> - Expression associée aux vaisseaux sanguins et à l'endothélium - CCL21^{-/-}/CCL19^{-/-} : résistant, ↓ l'adhésion et l'infiltration 	[261, 285, 288]

Réf.* : Références

Légende : ↑ : Augmente, ↓ : Diminue, ≠ : Pas d'effet ou pas de différence

Tableau 2A suite : Résumé des études sur les chimiokines dans la SEP et l'EAE

Nom	Études dans la SEP	Études dans l'EAE	Réf.*
CCL22		- ↑ au début des signes cliniques - Neutralisation: ↓ la sévérité et les CPM infiltrées - Expression associée à l'inflammation	[295, 296]
CXCL1	- Expression associée aux CPM et aux astrocytes au bord des lésions	- ↑ avant les signes cliniques puis similarité avec ces signes - Sur-expression sur astrocytes : ↓ la sévérité, l'inflammation et la démyélinisation durant la phase chronique	[119, 266, 297-303]
CXCL2		- Expression similaire aux signes cliniques - Expression associée aux LPN et aux astrocytes - Plus forte expression dans la moelle que dans le cervelet au pic de la maladie	[119, 265, 266, 304]
CXCL8	- Expression associée à l'endothélium et aux CPM - ↑ dans sérum et le LCR		[116, 248, 253]
CXCL9		- Plus forte expression au pic de la maladie - Expression associée aux CPM	[261, 266, 305, 306]
CXCL10	- ↑ dans le LCR, le sérum et le cerveau - ↑ chez les patients en phase aiguë - Coordone avec l'expression de CXCR3 - Expression associée aux astrocytes autour des lésions, aux lymphocytes dans les lésions et diffusée sur l'endothélium des lésions	- ↑ dans la zone sub-ventriculaire - Expression similaire aux signes cliniques - Expression associée aux astrocytes, aux CPM et à l'endothélium - Expression similaire à l'inflammation - Sur-expression : ↑ de leucocytes périvasculaires dans les zones d'infiltration - CXCL10 ^{-/-} : MOG normal : ≠; Faible dose de MOG : ↑ la sévérité et les CMP infiltrées - Neutralisation : ≠, ↑ ou ↓ la sévérité, les CPM et les lymphocytes T infiltrés	[248, 251, 254, 256, 261, 263, 266, 272, 274, 280, 284, 299, 305, 307-314]
CXCL11	- ↑ dans le sérum	- Expression associée aux astrocytes	[242, 306]
CXCL12	- ↑ dans le LCR - Expression associée aux astrocytes dans les lésions, à l'endothélium du côté luminal et parenchymal des lésions - Corrélation avec les CPM infiltrées	- ↑ au pic de la maladie chez le rat albinos et la neutralisation induit une faible maladie chez l'animal initialement peu ou pas malade - Neutralisation : ↑ la sévérité - Expression associée aux cellules inflammatoires	[261, 292, 315-318]
CXCL13	- ↑ dans le LCR, mais pas dans le sérum - Condorde avec l'index d'IgG - Expression dans le parenchyme et associée aux cellules périvasculaires infiltrées dans les lésions	- ↑ durant les rechutes - Expression associée aux CPM - CXCL13 ^{-/-} : ↓ la sévérité et les CPM infiltrées	[243, 287, 318-322]
CXCL16		- ↑ après l'apparition des signes cliniques - Neutralisation: résistant	[239]
CX3CL1	- ↑ dans le LCR - ↓ dans le sérum	- Expression associée aux CPM, à l'endothélium et aux capillaires	[266, 323]

Tableau 2B : Résumé des études sur les récepteurs des chimiokines dans la SEP et l'EAE

Nom	Études dans la SEP	Études dans l'EAE	Réf.*
CCR1	- ↑ dans le LCR - Expression associée aux vaisseaux, aux CPM et aux lymphocytes T - Expression associée aux CPM CCR5 ⁺ infiltrées dans les lésions - Antagoniste : ≠	- ↑ après le début des signes cliniques - Expression associée aux CPM et à l'endothélium dans les lésions et aux zones d'inflammation - CCR1 ^{-/-} et antagoniste: ↓ la sévérité et l'infiltration inflammatoire	[245, 266, 324-333]
CCR2	- ↑ dans le LCR, le sérum, le sang et les lésions actives - Expression associée aux CPM, à l'endothélium, aux lymphocytes T et aux astrocytes	- ↑ après le début des signes cliniques - Exprimé dans les zone d'inflammation - Expression associée aux CPM - CCR2 ^{-/-} et inhibiteur : retarde et/ou ↓ la sévérité selon la souche, ↓ les CPM et ↑ les neutrophiles dans les lésions	[249, 254, 264, 266, 267, 309, 324, 328, 332, 334-338]
CCR3	- Expression associée aux astrocytes et aux CPM activées dans les lésions	- Expression associée à l'endothélium, aux CPM et aux lymphocytes T	[264, 266, 339]
CCR4	- ↑ dans sang et le LCR - Expression associée aux lymphocytes T	- Expression associée aux lymphocytes T, aux CPM et à l'endothélium - CCR4 ^{-/-} : retarde le début et ↓ les CPM et les lymphocytes T	[295, 335, 340]
CCR5	- ↑ dans le LCR - Expression associée aux CPM et/ou aux lymphocytes dans les lésions, le sang, le LCR et aux astrocytes	- ↑ après le début des signes cliniques - Expression associée aux CPM et à l'endothélium - Expression dans les zones d'inflammation - Antagoniste seul ou avec CXCR3 : ↓ la sévérité et les cellules inflammatoires - CCR5 ^{-/-} : ≠	[264, 266, 276, 284, 324, 328, 330-332, 339-345]
CCR6	- Expression associée aux lymphocytes T dans le LCR et le sang	- Expression associée aux lymphocytes T - CCR6 ^{-/-} et neutralisation: résistant, ↓ ou ↑ la sévérité et l'inflammation dont les lymphocytes T	[289, 290, 346-348]
CCR7	- ↑ dans le LCR - ↑ l'expression associée aux lymphocytes T - Expression associée aux CPM dans les lésions	- ↑ lors de rechutes - Expression associée aux CPM - Exprimé dans les zones d'inflammation, dans le parenchyme et dans les lésions - CCR7 ^{-/-} : résistant ou ≠	[285, 288, 349-352]
CCR8	- Expression associée aux CPM dans les lésions	- ↑ au début des signes cliniques	[266, 350, 353]

Réf.* : Références

Légende : ↑ : Augmente, ↓ : Diminue, ≠ : Pas d'effet ou pas de différence

Tableau 2B suite : Résumé des études sur les récepteurs des chimiokines dans la SEP et l'EAE

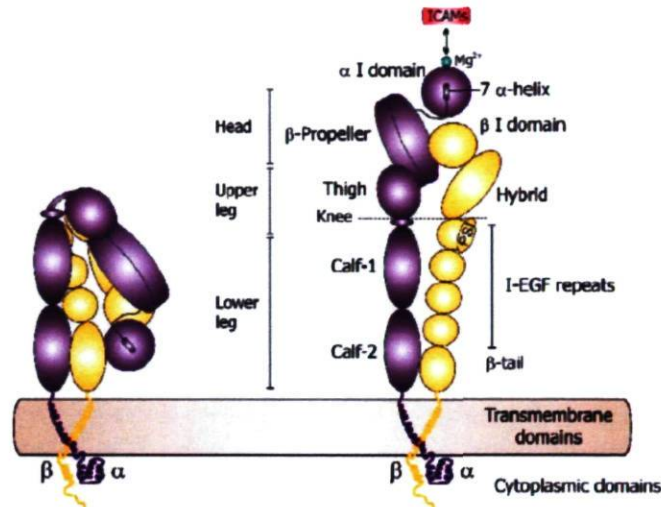
Nom	Études dans la SEP	Études dans l'EAE	Réf.*
CXCR1	<ul style="list-style-type: none"> - ↑ de l'expression associée aux CPM du sang - Expression associée aux vaisseaux et aux astrocytes dans les lésions - Diffusé dans lésions 		[248, 354]
CXCR2	<ul style="list-style-type: none"> - ↑ de l'expression associée aux CPM et aux oligodendrocytes du sang et/ou des lésions 	<ul style="list-style-type: none"> - Expression similaire aux signes cliniques - Expression associée aux LPN - CXCR2^{-/-} et antagoniste : résistant et ↓ les LPN, les monocytes, les infiltrats inflammatoires et les lésions 	[119, 266, 297, 301, 354-356]
CXCR3	<ul style="list-style-type: none"> - ↑ dans le sang, le LCR - Expression associée aux vaisseaux, aux astrocytes, aux CPM et aux lymphocytes T dans les lésions, le sang et/ou le LCR - Expression diffusée dans les lésions - Corrélation avec le volume des lésions - Co-localise avec CXCL10 dans les infiltrats périvasculaires 	<ul style="list-style-type: none"> - Expression associée aux CPM, aux lymphocytes T - T et à l'endothélium - Neutralisation : EAE actif : ≠; Passif : ↓ la sévérité et les lymphocytes T - CXCR3^{-/-} et antagoniste : résistant, ↓ ou ↑ et /ou la sévérité, les zones d'inflammation et les lymphocytes T 	[248, 266, 274, 284, 306, 312, 328, 332, 335, 340, 357-366]
CXCR4	<ul style="list-style-type: none"> - ↑ dans les lésions - Expression associée aux CPM et aux lymphocytes T 	<ul style="list-style-type: none"> - Expression associée aux lymphocytes T - Expression similaire aux signes cliniques - Antagoniste : ↓ la sévérité et les lymphocytes T ou ↑ la sévérité et l'infiltration périvasculaire et intraparenchymale des CPM 	[284, 317, 328, 355, 358, 367]
CXCR5		<ul style="list-style-type: none"> - ↑ de l'expression associée aux lymphocytes T et aux CPM 	[287]
CXCR7		<ul style="list-style-type: none"> - Expression associée à l'endothélium - CXCR7^{-/-} : ↓ sévérité, les CPM et les lymphocytes T 	[368]
CX3-CR1	<ul style="list-style-type: none"> - ↓ l'expression associée aux cellules NK périphériques 	<ul style="list-style-type: none"> - Expression associée aux CPM - CX3CR1^{-/-} : ↑ la sévérité et ↓ les cellules NK 	[327, 369, 370]

3.3.2 : Les intégrines

L'action des chimiokines sur les leucocytes est de mener à l'activation des intégrines et, d'un point de vue physique, ce sont ces dernières qui sont responsables de l'adhésion forte des leucocytes. En effet, les intégrines sont retrouvées sur les leucocytes et elles se lient à leurs ligands exprimés sur l'endothélium. De façon plus spécifique, les intégrines sont des molécules hétérodimériques composées d'une sous-unité α associée de façon non-covalente à une sous-unité β . À ce jour, on dénote 24 intégrines créées par diverses combinaisons de 18 sous-unités α et de 8 sous-unités β [371]. Concernant l'adhésion des leucocytes, les intégrines importantes sont celles possédant les sous-unités $\alpha 4$ ($\alpha 4\beta 1$ ou $\alpha 4\beta 7$) ou $\beta 2$ ($\alpha L\beta 2$ ou $\alpha M\beta 2$) [372]. D'un point de vue structural, les intégrines sont des protéines transmembranaires qui possèdent une tête globulaire extracellulaire ainsi que deux jambes (figure 7) [371, 373]. Il existe deux types d'intégrines, soit celles possédant ou non un domaine I sur la sous-unité α . Pour le premier groupe, (αX , αM , αL , αE , αD , $\alpha 2$, $\alpha 1$, $\alpha 11$, $\alpha 10$), ce domaine I est le site de liaison au ligand, alors qu'en absence de ce dernier, ce sera la tête formée par les deux sous-unités qui servira de site de liaison. La région transmembranaire est également formée des deux sous-unités et possède une séquence GxxxG importante dans l'activation des intégrines. Finalement, le domaine cytoplasmique est relativement court et dépourvu d'activité enzymatique [371, 373].

Les intégrines jouent de nombreux rôles dans l'organisme dont la signalisation, la prolifération et la différenciation cellulaire, le maintien de l'intégrité structurale ainsi que le recrutement leucocytaire. Il existe deux types de signaux, soit celui nommé extérieur-intérieur qui se produit lorsque le ligand est lié à l'intégrine et celui appelé intérieur-extérieur qui se déclenche suite à l'activation du leucocyte par les chimiokines. Cette dernière activation rend l'intégrine disponible pour une liaison avec ses ligands [372, 373]. En effet, en condition normale, les intégrines sont liées à l'actine sur le cytosquelette des leucocytes et ont peu d'affinité pour leur ligand. Elles sont alors inactives [372, 374]. Donc, via les voies de signalisation décrites dans la section précédente, les chimiokines vont activer en quelques millisecondes les intégrines. En effet, il va se produire un éloignement

de leurs jambes ainsi qu'une extension de leur tête. Cette nouvelle conformation va permettre à l'intégrine de se lier à son ligand. De plus, il y aura augmentation de leur valence, c'est-à-dire qu'elles vont se concentrer en des lieux donnés [123, 372, 374-376].



Tirée de Gahmberg et coll., 2009

Figure 7 : Schéma d'un exemple de structure d'intégrine (α L β 2)

Les intégrines sont des protéines transmembranaires possédant une tête et deux jambes extracellulaires ainsi qu'une région transmembranaire et un domaine cytoplasmique.

Les ligands les plus connus des intégrines, lors de l'adhésion leucocytaire, sont les molécules d'adhésion appartenant aux familles des molécules d'adhésion intracellulaire (ICAM) (principalement ICAM-1) et des molécules d'adhésion cellulaire vasculaire (VCAM) (principalement VCAM-1) exprimées sur l'endothélium activé. Plus précisément, VCAM-1 interagit avec les intégrines α 4, tandis qu'ICAM-1 s'associe aux intégrines β 2. De plus, malgré que ces molécules d'adhésion soient les principaux ligands des intégrines dans l'adhésion, il n'est pas à exclure que d'autres ligands puissent exister. Par exemple, le récepteur RAGE (*advanced glycosylation end product-specific receptor*) et les héparanes sulfates se lient à α M β 2, alors que MadCAM-1 (*mucosal vascular addressin cell adhesion molecule-1*) s'associe à α 4 β 7 [124, 377, 378]. Concernant la distribution des intégrines sur les leucocytes, α 4 β 1 est exprimée par les lymphocytes, les éosinophiles et les monocytes. α 4 β 7, quant à elle, est retrouvée sur les monocytes, les lymphocytes et les granulocytes,

alors qu' α L β 2 est présente sur les lymphocytes T et B, les cellules NK et les monocytes. Finalement, α M β 2 est exprimée sur neutrophiles, les cellules mononuclées, les cellules dendritiques et NK et sur certains lymphocytes T [379-382] .

Dans le SNC, toutes ces intégrines et leurs ligands nommés précédemment sont des molécules très étudiées. En effet, elles ont été détectées et caractérisées dans diverses conditions pathologiques telles que les ischémies, la malaria, le HIV, la toxoplasmose, la méningite, le lupus érythémateux systémique, l'Alzheimer, le parkinson, le syndrome de Guillain-Barré, la sclérose latérale amyotrophique (SLA) et le parkinson [166, 383-399]. De plus, alors que les intégrines sont activées par les chimiokines, leurs principaux ligands (ICAM-1 et VCAM-1) le sont, dans le SNC, en situations inflammatoires telles que lorsqu'exposés au LPS, à l'IL-1, au TNF et à l'IFN γ [400-405].

Dans la SEP et l'EAE, les intégrines et leurs deux principaux ligands, ICAM-1 et VCAM-1, sont encore une fois le sujet de nombreuses études et, tout comme pour les chimiokines, afin de faciliter leur consultation, les résultats sont résumés aux tableaux 3A et 3B. Concernant les thérapies de la SEP, l'une de ces molécules, l' α 4, fait l'objet d'un traitement qui diminue les rechutes de la maladie : le natalizumab [406]. En effet, il s'agit d'un anticorps dirigé contre cette intégrine et, plus exactement, il y a deux ans, une équipe a précisé dans l'EAE que c'est fort probablement l'intégrine α 4 β 1 et non l' α 4 β 7 qui est bloquée, empêchant ainsi l'adhésion forte des lymphocytes T [202]. Malheureusement, bien que ce traitement semble très prometteur, il a un effet secondaire très important. En effet, suite à son utilisation, certains patients ont développé une infection causée par le polyomavirus JC menant alors à une leucoencéphalopathie [407]. Le développement de cet effet secondaire semble alors démontrer que les sujets traités avec le natalizumab n'arrivent plus à se défendre contre ce virus. Ceci concorde d'ailleurs avec les résultats que le recrutement de tous les lymphocytes T encéphalitogènes doit être bloqué par le traitement pour qu'il y ait suppression de la maladie chez l'animal [202] .De plus, d'autres bloquants contre β 2, VCAM-1 ou α 4 sont maintenant en phase II ou III, mais très peu d'informations à leur sujet sont disponibles [408, 409]. Les autres traitements sur le marché peuvent influencer l'expression des intégrines, mais ils ne les ciblent pas précisément.

Tableau 3A : Résumé des études sur les intégrines dans la SEP et l'EAE

Nom	Études dans la SEP	Études dans l'EAE	Réf.*
$\alpha 4$		- Expression associée aux lymphocytes T au pic de la maladie - Neutralisation : retarde le début, ↓ la sévérité, l'adhésion leucocytaire dont les lymphocytes T et les CPM	[164, 198, 410-414]
$\alpha 4\beta 1$	- ↑ dans le sang, les lésions et durant les rechutes - ↑ l'expression associée aux lymphocytes T dans le sang, les lésions et le LCR - ↑ durant les rechutes - ↑ l'expression associée aux CPM du sang et le LCR - Concorde avec le niveau d'IgG dans le LCR	- ↑ l'expression associée aux CPM du sang au début et au pic de la maladie - Neutralisation : ↓ l'adhésion des cellules dendritiques - Neutralisation : ↓ la sévérité, les CPM et les lymphocytes T lorsque administré avant les signes cliniques; si après : ↑ la sévérité et l'inflammation dont les lymphocytes T	[164, 179, 195, 201, 415-424]
$\alpha 4\beta 7$		- $\alpha 4\beta 7^{-/-}$: ↓ la sévérité jusqu'à la résistance et ↓ l'infiltration leucocytaire - Neutralisation après le début de la maladie : ≠	[413, 425]
$\beta 2$		- ↑ au début des signes cliniques - Neutralisation : ↓ la sévérité et l'inflammation	[426, 427]
$\alpha M\beta 2$	- ↑ l'expression associée aux LPN périphériques	- $\alpha M\beta 2^{-/-}$, neutralisation : retarde le début jusqu'à la résistance, ↓ la sévérité et l'inflammation dont les lymphocytes T	[115, 195, 428, 429]
$\alpha L\beta 2$	- ↑ dans les lésions et distribuée assez uniformément - Expression associée aux lymphocytes T et les CPM dans les lésions et à proximité des lésions - ↑ l'expression associée aux CPM et aux lymphocytes T périphériques et dans le LCR - ↑ l'expression associée aux LPN périphériques - Concorde avec le niveau d'IgG dans le LCR	- ↑ l'expression associée aux lymphocytes T au début des signes cliniques - Fortement exprimée au pic de la maladie et expression associée aux CPM - $\alpha L\beta 2^{-/-}$: ↑ la sévérité et les lymphocyte T ou ↓ la sévérité et les lymphocytes T, ↑ les lymphocytes T régulatrices - Transfert d' $\alpha L\beta 2^{-/-}$ à $\alpha L\beta 2^{+/+}$: ↓ la sévérité ; $\alpha L\beta 2^{+/+}$ à $\alpha L\beta 2^{-/-}$: ↑ la sévérité et les lymphocytes T - Neutralisation : ↑ ou ↓ la sévérité et l'inflammation - Neutralisation avec ICAM : ↓ la sévérité et l'inflammation	[115, 179, 201, 415, 429-439]

Réf.* : Références

Légende : ↑ : Augmente, ↓ : Diminue, ≠ : Pas d'effet ou pas de différence

Tableau 3B : Résumé des études sur les deux principaux ligands des intégrines dans la SEP et l'EAE

Nom	Études dans la SEP	Études dans l'EAE	Réf.*
ICAM-1	<ul style="list-style-type: none"> -↑ dans le sérum -↑ forme soluble dans le LCR et le sang -↑ l'expression associée aux LPN périphériques, à l'endothélium (dont les capillaires) et dans les lésions (où distribué assez uniformément) -↓ l'expression associée aux leucocytes dans le LCR et le sang - Expression associée aux lymphocytes T périphériques - Concordance de la forme soluble avec les lésions 	<ul style="list-style-type: none"> -↑ aux début des signes cliniques sur et autour des vaisseaux sanguins -↑ dans les lésions - Expression similaire à l'infiltration des lymphocytes T -↑ l'expression associée aux petits et gros vaisseaux (dont dans les lésions), dans le plexus choroïde, les organes circumventriculaires, aux CPM et aux lymphocytes T - Mutation : ↓ la sévérité uniquement lors de la perte du site de liaison à $\alpha\text{L}\beta\text{2}$; autres mutants : ↑ la sévérité et la prolifération des lymphocytes T - Neutralisation : Durant le début ou la progression : retarde le début, ↓ la sévérité (plus d'effet en EAE actif) et l'inflammation; durant rémission : ↑ la sévérité - Neutralisation avec $\alpha\text{L}\beta\text{2}$: ↓ la sévérité et l'inflammation - ICAM-1^{-/-} : ↓ la sévérité jusqu'à la résistance et ↓ l'inflammation dont les lymphocytes T ou ↑ la sévérité et l'inflammation 	[115, 187, 201, 275, 418, 432, 435, 437, 440-456]
VCAM-1	<ul style="list-style-type: none"> - Expression associée à l'endothélium dans et autour des lésions -↑ l'expression associée à l'endothélium chez les patients avec des lésions actives, dans le plexus choroïde et dans les lésions -↑ la forme soluble dans le sérum des patients avec des lésions actives 	<ul style="list-style-type: none"> - Expression associée à l'endothélium (gros et petits vaisseaux) principalement, mais aussi aux astrocytes et aux CPM -↑ au début des signes cliniques -↑ dans les lésions -↑ l'expression associée aux capillaires des organes circumventriculaires - Neutralisation : retarde le début ou ≠ 	[187, 402, 413, 418, 420, 441, 444, 446, 448, 457-460]

Réf.* : Références

Légende : ↑ : Augmente, ↓ : Diminue, ≠ : Pas d'effet ou pas de différence

3.4 : Transmigration

Une fois que les leucocytes vont avoir adhérents et patrouillés, ils peuvent pénétrer dans le tissu par le processus de diapédèse, soit en passant entre les cellules endothéliales ou directement à travers ces dernières [126]. Au site de transmigration, il peut y avoir formation d'une « coupe de transmigration » créée par un réarrangement de l'actine et par la formation de protrusions membranaires de l'endothélium activé. Ces dernières vont entourer le leucocyte afin d'y faciliter la transmigration [461, 462]. Encore une fois, plusieurs molécules sont impliquées dans ce processus telles que les chimiokines, les intégrines, la VE-cadhérine (cadhérine endothéliale vasculaire), la PECAM-1 (*platelet/endothelial cell adhesion molecule-1*), la CD99, les JAMs (*junctional adhesion molecule*), l'ESAM (*endothelial cell-specific adhesion molecule*) et des protéinases (MMPs, élastases) [123]. À l'exception de la VE-cadhérine, toutes ces molécules semblent réguler positivement la transmigration. En effet, la VE-cadhérine est retrouvée dans les jonctions adhérentes entre les cellules endothéliales et leurs liaisons doivent être dissoutes afin que les leucocytes puissent passer entre les cellules, si c'est ce type de parcours qu'ils emprunteront [463]. Cette étape peut être réalisée par des protéases, telles que les élastases des neutrophiles, ou encore par la phosphorylation de ces adhérentes par l'activation de voies signalétiques par des ligands d'intégrines tels qu'ICAM-1 [464, 465]. Concernant la transmigration au travers de l'endothélium, elle peut être réalisée grâce au chemin que se tracera le podosome du leucocyte polarisé et aussi grâce à la participation de protéinases telles que les métalloprotéinases. En effet, ces dernières peuvent augmenter la perméabilité endothéliale [466-468]. Les autres molécules évoquées, quant à elle, participeront à la transmigration, notamment par leur rôle en tant que molécules d'adhésion. Toutefois, il est également suggéré qu'elles pourraient activer des voies signalétiques importantes pour cette étape, telles que celles de GTPases et de protéines kinases, et/ou mener à la production de ROS [462, 463, 469].

À propos des caractéristiques des molécules impliquées dans la transmigration, PECAM-1 fait partie de la superfamille des immunoglobulines, car elle possède six domaines Ig et elle est exprimée autant sur les leucocytes que sur l'endothélium. C'est via une interaction homophile que cette molécule joue son rôle [463, 469]. CD99, une

molécule O-glycosylée et également exprimée sur l'endothélium et les leucocytes, crée une interaction entre ces deux composantes via aussi une liaison homophilique [470, 471]. De plus, il est intéressant de noter que la participation de PECAM-1 et de CD99 semble, pour certaines transmigration, séquentielle, c'est-à-dire que PECAM-1 est importante au début de la transmigration, alors que CD99 la poursuit [463]. Pour sa part, la famille des JAMs est composée de trois membres soit JAM-A, JAM-B et JAM-C. Il s'agit de protéines possédant deux domaines Ig extracellulaires et d'une petite portion cytoplasmique ayant un motif de liaison PDZ [463]. JAM-A et JAM-C sont exprimées sur l'endothélium et les leucocytes et forment des liaisons entre elles ou avec des intégrines, soit respectivement α L β 2 et α M β 2. Pour sa part, JAM-B, également retrouvée sur l'endothélium, se lie à JAM-C durant la transmigration [463, 469]. ESAM est une autre molécule à domaine Ig exprimée sur l'endothélium mais, cette fois-ci, elle ne l'est pas sur les leucocytes. Son rôle pourrait se situer au niveau de la perméabilité vasculaire, mais des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse [463, 469]. Finalement la participation d'ICAM-1-2, de VCAM-1, des intégrines et d'un gradient de chimiokines est également reconnue comme importante dans la transmigration [206, 463, 464]. De plus, tout comme dans les étapes du recrutement décrites précédemment, les médiateurs inflammatoires, dont l'IL-1 β et le TNF, peuvent influencer l'expression des molécules importantes dans la transmigration [122, 469]. Concernant la spécificité leucocytaire des molécules décrites, PECAM-1 est importante pour la transmigration des cellules myéloïdes, les trois molécules, CD99, JAM-A et JAM-C, le sont pour tous les types de leucocytes, alors qu'ESAM semble davantage impliquée au niveau des neutrophiles [469].

Dans le SNC, contrairement aux autres étapes du recrutement, la plupart des études sur les molécules impliquées dans la transmigration ont été réalisées *in vitro* [472]. Toutefois, l'expression de certaines d'entre elles, telles que les JAMs et PECAM-1, a bien été démontrée dans le SNC *in vivo* [473-479]. Il est également important de noter qu'au niveau de la transmigration, la présence de la BHE est un facteur important à considérer. En effet, il est beaucoup plus difficile pour les cellules inflammatoires de traverser cette barrière et sa présence peut apporter des caractéristiques, au mécanisme de recrutement de leucocytes dans le cerveau, qui diffèrent de la périphérie où elle est absente [480, 481]. De plus, une autre information importante à souligner est que dans certaines neuropathologies,

telles que la SEP, il est possible d'observer un bris de la BHE [482-484]. Ainsi, cette rupture permettra aux leucocytes d'entrer plus facilement dans le SNC. À noter d'ailleurs que les protéinases dont les MMPs peuvent être des actrices importantes dans cette rupture [482].

Dans la SEP, JAM-A et JAM-B ont été détectées dans le sérum et/ou le cerveau des patients [485, 486]. De plus, une forte expression de PECAM-1 et de MMPs, telles que MMP-2, -7, -9 et 12, a été détectée dans les lésions, le LCR, le plasma et/ou le sérum des malades [474, 487-490].

Dans l'EAE, il a été démontré que l'expression de PECAM-1 est présente autour des vaisseaux sanguins chez l'animal et que son expression semble légèrement augmentée durant la maladie. Par contre, bien que sa neutralisation ne semble pas avoir d'effet sur l'EAE, puisqu'il n'y a pas de retard ni de diminution de la sévérité de la maladie, les souris déficientes pour ce gène sont malades plus tôt. [477, 491, 492]. Concernant les MMPs, l'expression de MMP-2,-3, -8, -9, -10, -11, -12, -13, -14, -25 augmente dans la moelle au pic de la maladie [487]. Quant à leur rôle, les souris déficientes pour MMP-2 sont malades plus tôt et plus gravement, ce qui semble dû à une augmentation de l'expression de MMP-9 chez ces souris. Pour leur part, les souris doubles déficientes pour MMP-2 et MMP-9 sont résistantes à l'EAE, alors que les jeunes souris uniquement déficientes pour MMP-9 sont moins malades. Finalement, celles ne possédant pas MMP-12 sont plus affectées par l'EAE [483, 487, 493, 494].

Concernant les traitements de la SEP, aucun ne cible particulièrement ces protéines [495].

4. Les leucocytes bâtonnets

Le mécanisme de recrutement des leucocytes détaillé dans la section précédente décrit bien ce qui est connu en périphérie. Dans le SNC, ce mécanisme est de plus en plus étudié et bien que beaucoup de nouvelles connaissances sont acquises, il n'en demeure pas moins qu'il n'est pas complètement élucidé dans toutes les conditions inflammatoires et pour tous les types de leucocytes. Dans notre laboratoire, c'est donc à cette tâche que nous nous afférons. Plus particulièrement, nous nous intéressons à un type de cellules récemment

identifié : les leucocytes bâtonnets [92, 496]. Au début de la présente recherche plusieurs informations étaient connues à leur sujet. En effet, il a été déterminé que : 1) il s'agit de leucocytes d'origine myéloïde adhérents et patrouillant les capillaires cérébraux; 2) ils ont la capacité de proliférer tel que révélée par leur capacité à incorporer le BrdU; 3) c'est une population composée de monocytes et de granulocytes où les proportions restent à être déterminées dans les conditions inflammatoires; 4) leur recrutement est augmenté lors d'un traitement au LPS et 5) le TNF, l'IL-1 β et l'Ang2 sont importants dans leur recrutement lors d'une endotoxémie provoquée par le LPS [92, 496, 497].

L'étude de ces leucocytes bâtonnets ainsi que la démarche que nous utilisons pour y arriver a d'importants avantages. Tout d'abord, l'identification de ces cellules par leur morphologie et leurs caractéristiques, par exemple les marqueurs qu'elles expriment, nous permet de les étudier *in situ*. En effet, cela nous donne l'opportunité de les suivre *in vivo*, et non d'étudier l'adhésion leucocytaire uniquement en culture cellulaire, car bien que l'*in vitro* peut donner des pistes très intéressantes, cela ne représente pas assurément ce qui se passe dans le cerveau.

Tel que mentionné, les études portant sur le recrutement des leucocytes bâtonnets ont été réalisées en réponse au LPS, lequel induit une inflammation systémique. Dans l'EAE, la PTX est la toxine utilisée pour potentialiser la maladie. Alors, afin de caractériser le processus inflammatoire dans l'EAE et ultimement dans la SEP, clarifier la nature des leucocytes d'intérêt et leur mécanisme de recrutement, dont l'étape de l'adhésion forte, en réponse à la PTX puis dans l'EAE pourrait apporter des informations importantes permettant de mieux comprendre la maladie et développer des cibles thérapeutiques efficaces. Les deux prochains chapitres traiteront des nouvelles connaissances acquises à ces niveaux.

5. Problématique, hypothèses et objectifs de la thèse

Il est connu que la SEP est une maladie auto-immune inflammatoire du SNC. Cependant, le processus par lequel les leucocytes sont recrutés dans le SNC n'est pas

entièrement caractérisé. De plus, nos connaissances ne sont pas complètes quant au rôle réel des différents facteurs environnementaux, tels qu'une infection, dans cette maladie. En effet, le mode d'action de l'agent substituant l'infection et potentialisant l'EAE, la PTX, est encore méconnu.

Lors de mon arrivée dans le laboratoire, l'équipe avait déjà amorcé la caractérisation des leucocytes bâtonnets. On savait que lors d'une endotoxémie provoquée par le LPS, elles sont recrutées en plus grand nombre et que l'IL-1 β , le TNF et l'Ang-2 sont importants dans ce recrutement [92]. De plus, à ce moment, il semblait qu'une grande proportion de ces cellules, qui patrouillent la vasculature cérébrale en réponse au LPS, était majoritairement des cellules monocytaires. C'est d'ailleurs pour cette raison que les premières chimiokines étudiées durant mon doctorat étaient celles impliquées dans l'adhésion des monocytes (résultats de l'annexe I). La poursuite de la caractérisation de cette population leucocytaire et plus particulièrement l'identification des molécules responsables de l'adhésion forte des cellules bâtonnets lors de réactions inflammatoire, provoquée par la PTX ou le LPS, comme élément comparatif, ainsi que durant l'EAE, est alors devenue le sujet de ce doctorat.

Plus précisément, dans le chapitre 2, l'objectif principal a été de confirmer les proportions exactes de chacune des populations leucocytaires (monocytes et granulocytes) composant les leucocytes bâtonnets ainsi que d'amorcer la caractérisation de leur mécanisme de recrutement en réponse à la PTX. Dans le cadre de ce doctorat, nous nous sommes surtout intéressé à identifier l'intégrine responsable de l'adhésion forte de ces cellules. Pour ce faire, nous avons, suite à la démonstration que les leucocytes bâtonnets sont principalement des granulocytes, émis l'hypothèse qu' α M β 2 et son principal ligand, ICAM-1, sont responsables de leur adhésion dans le cerveau en situation inflammatoire provoquée par la PTX. Afin de valider cette hypothèse, nous avons 1) caractérisé l'expression d'ICAM-1 et de VCAM-1 lors de traitement à la PTX et au LPS comme contrôle; 2) étudié la régulation d'ICAM-1 par la cytokine qui est importante dans le recrutement des leucocytes bâtonnets en réponse à la PTX; 3) déterminé si α M β 2 est responsable de l'adhésion de ces cellules sous l'influence de la PTX et 4) vérifié si ICAM-1 est le ligand d' α M β 2 responsable de cette même adhésion.

Par la suite, dans le chapitre 3, nous avons voulu savoir quelle chimiokine est importante dans le recrutement des leucocytes bâtonnets en réponse aux toxines et dans l'EAE. Étant donné qu'il avait déjà été démontré que le principal récepteur des chimiokines recrutant les neutrophiles, CXCR2, affecte le développement de l'EAE [119], nous avons émis l'hypothèse que l'un de ses ligands serait important dans l'adhésion des leucocytes bâtonnets. Nous avons donc eu comme objectifs de :1) étudier l'expression des ligands de CXCR2 en réponse à la PTX, au LPS ainsi que durant l'EAE; 2) vérifier si l'IL-6 produite, lors de traitement à la PTX, est importante dans la régulation de la chimiokine la plus exprimée; 3) valider si cette même chimiokine est importante dans le recrutement des granulocytes adhérents à la vasculature cérébrale sous stimulation à la PTX, au LPS et durant l'EAE et 4) déterminer si la diminution de l'adhésion des granulocytes à la vasculature cérébrale peut influencer le développement de l'EAE.

**Chapitre 2 : Les phagocytes patrouillant la vasculature
cérébrale sont recrutés lors d'un traitement à la toxine
pertussique via IL-6, ICAM-1 et ITG α M**

***Crawling Phagocytes Recruited in the Brain Vasculature after
Pertussis Toxin Exposure through IL6, ICAM1 and ITGaM***

**Jean-François Richard*; Monica Roy*; Julie Audoy-Rémus; Pierrot Tremblay; Luc
Vallières**

Department of Endocrinology and Genomics, Laval University Hospital Research Center, Quebec City,
Quebec, Canada.

Corresponding author:

Luc Vallières, PhD, Professor, Department of Endocrinology and Genomics, Laval
University Hospital Research Center,
2705 Laurier Boulevard, Quebec, QC G1V 4G2, Canada
(E-mail: luc.vallieres@crchul.ulaval.ca)

Received 6 January 2011; accepted 15 March 2011.

*** These authors contributed equally to this work and are listed in alphabetical order.**

Author contributions: LV designed the experiments, supervised the project and wrote the
paper.

JFR and MR performed most of the experiments with the assistance of PT. JAR performed
the experiments on Angpt2.

doi:10.1111/j.1750-3639.2011.00490.x

2.1 : Résumé

La surface endothéliale luminale de la vasculature cérébrale est constamment patrouillée par des leucocytes bâtonnets. Le recrutement de ces cellules est augmenté après l'exposition au lipopolysaccharide bactérien (LPS) par un mécanisme impliquant le *tumor necrosis factor* (TNF), l'interleukine 1- β (IL-1 β) et l'angiopoïétine-2 (Ang2). Dans cette recherche, nous démontrons que cette population de leucocytes bâtonnets, principalement composée de granulocytes, est aussi recrutée dans le cerveau de souris souffrant de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) et lors de traitement à la toxine pertussique (PTX), laquelle est utilisée pour potentialiser l'EAE. Cependant, le mécanisme impliqué dans ce recrutement ne nécessite pas la participation de l'Ang2. L'utilisation de micropuces à ADN, d'animaux déficients pour les gènes à l'étude et d'anticorps neutralisants, nous ont permis de démontrer que la PTX agit indirectement sur l'endothélium via, entre autre, l'IL-6. De plus, cette cytokine s'avère essentielle pour réguler, au niveau post-transcriptionnel, la molécule d'adhésion intracellulaire-1 (ICAM-1) lors du traitement à la PTX et non au LPS. Nous avons aussi démontré que ces phagocytes adhèrent aux capillaires cérébraux via l'interaction de l'intégrine α M avec ICAM-1 ainsi qu'avec un autre ligand encore inconnu. En conclusion, notre étude supporte l'idée que la PTX potentialise l'EAE, en autre, en induisant des changements vasculaires nécessaires au recrutement des leucocytes qui patrouillent cette vasculature.

2.2 : *Abstract*

The cerebral vasculature is constantly patrolled by rod-shaped leukocytes crawling on the luminal endothelial surface. These cells are recruited in greater numbers after exposure to bacterial lipopolysaccharide (LPS) by a mechanism involving tumor necrosis factor (TNF), interleukin-1 β (IL1 β) and angiopoietin-2 (Angpt2). Here, we report that the population of crawling leukocytes, consisting mainly of granulocytes, is also increased in the brains of mice suffering from experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) or injected with pertussis toxin (PTX), which is commonly used to induce EAE. However, this recruitment occurs through an alternative mechanism, independent of Angpt2. In a series of experiments using DNA microarrays, knockout mice and neutralizing antibodies, we found that PTX acts indirectly on the endothelium in part through IL6, which is essential for the posttranscriptional upregulation of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1) in response to PTX but not to LPS. We also found that phagocytes adhere to brain capillaries through the interaction of integrin α M (ITG α M) with ICAM1 and an unidentified ligand. In conclusion, this study supports the concept that PTX promotes EAE, at least in part, by inducing vascular changes necessary for the recruitment of patrolling leukocytes.

2.3 : Introduction

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune demyelinating disease often characterized by unpredictable episodes of exacerbation and remission. While its etiology is still unknown, epidemiological studies suggest that environmental factors influence its course. For example, the risk of exacerbation is significantly increased during or after common infections of the upper respiratory tract (1, 6, 10, 21, 26, 32, 34). Several non-exclusive mechanisms have been proposed to explain how infections may influence MS, including adjuvant actions, molecular mimicry, bystander activation and epitope spreading (23).

To induce encephalomyelitis (EAE), the most widely used model of MS, mice immunized with myelin antigens or transplanted with myelin-reactive T lymphocytes are commonly injected with pertussis toxin (PTX), which is used as a surrogate for infection to increase the severity of the disease. PTX is a hexameric protein produced by *Bordetella pertussis*, the bacterium that causes whooping cough. The subunit S1 forms the A protomer responsible for the enzymatic activity, while the four other subunits (including two copies of S4) form the B oligomer responsible for binding to the cell surface (33). The best-known action of PTX involves its endocytosis and transport to the endoplasmic reticulum (28). There, the A protomer catalyzes the ADP-ribosylation of the α subunits of G proteins (5, 8), thereby preventing their interaction with G protein-coupled receptors. A less understood mechanism relies on the ability of the B oligomer to interact with transmembrane receptors and modulate intracellular signaling pathways. For example, it has been shown that PTX stimulates P-selectin expression in the cerebral endothelium by acting through toll-like receptor 4 (TLR4) (17), better known as the signaling receptor for lipopolysaccharide (LPS). Through such actions, PTX induces responses that presumably promote EAE, such as leukocyte adhesion to the cerebral vasculature, activation of antigen-presenting cells and differentiation of CD4⁺ T lymphocytes (29).

We have recently uncovered a mixed population of phagocytes that constantly patrol the cerebral vasculature by crawling on the luminal endothelial surface (2, 35). Our knowledge about these cells can be summarized as follows: (i) they include granulocytes and monocytes, whose proportions remain uncertain; (ii) they adopt a rod-shaped

morphology when crawling in the capillary network, facilitating their discrimination from parenchymal phagocytes; (iii) they are recruited upon stimulation with LPS by a mechanism involving the pro-inflammatory cytokines tumor necrosis factor (TNF) and interleukin-1 β (IL1 β), and the vascular destabilization factor angiopoietin-2 (Angpt2); and (iv) neutralization of the latter using a peptide-Fc fusion protein called L1-10 blocks the recruitment of crawling phagocytes during endotoxemia. An important question to be addressed is whether crawling phagocytes are recruited in other conditions through the same mechanism as the one induced by LPS. Considering their privileged position at the blood–brain interface and the roles of myeloid cells in immunity, it is plausible that crawling phagocytes are involved in protective neuroinflammatory responses against infection, injury and degenerative diseases, as well as in detrimental neuroinflammatory disorders, such as MS.

The initial goals of the present study were (i) to examine whether the population of crawling leukocytes increases during EAE, a model of MS, and in response to PTX, which is commonly used to induce EAE without clear understanding of its mechanism of action; and (ii) to explore the possibility of using the Angpt2 inhibitor L1-10 to block such recruitment. The results confirmed that crawling leukocytes are attracted in greater numbers in response to PTX and EAE, but through an Angpt2-independent mechanism. To clarify this alternative mechanism, our ultimate goal was to compare the effects of PTX and LPS using a combination of *in vitro* and *in vivo* approaches.

2.4 : Methods

Animals

C57BL/6 mice were purchased from Charles River Laboratories (Montreal, Quebec, Canada). Mice deficient in IL6 or intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1) and their wild-type controls (C57BL/6 background) were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). The animals were adapted to standard laboratory conditions for at least 1 week before any manipulation. The experiments were done on 8–10-week-old males in accordance with the current guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

Toxins

PTX (List Biological Laboratories, Campbell, CA, USA) was dissolved in phosphate-buffered saline (PBS) and injected intraperitoneally at a dose of 20 µg/kg. LPS from *Escherichia coli* O55:B5 (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) was dissolved in PBS and injected intraperitoneally at a dose of 2 µg/kg or 1 mg/kg. Control mice were injected with PBS.

Neutralizing antibodies

One hour before PTX injection, mice were injected via a tail vein with either one of the following antibodies at a concentration of 4 mg/kg and diluted in saline: anti-ITGαL (rat IgG2a; BD Biosciences, Mississauga, Ontario, Canada), anti-ITGαM (rat IgG2b; BD Biosciences), anti-ITGα4 (rat IgG2a; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), anti-ITGβ1 (rat IgG2a; R&D Systems), anti-ITGβ2 (rat IgG1; BD Biosciences) and anti-ITGβ7 (rat IgG2a; R&D Systems). Control mice were injected with isotype-matched non-specific antibodies.

EAE induction and clinical evaluation

Mice were injected subcutaneously on days 0 and 7 with 200 µL (100 µL/site) of emulsion containing 300 µg of myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide 35–55

(AnaSpec, Fremont, CA, USA) dissolved in saline and mixed with an equal volume of complete Freund's adjuvant containing 500 µg of killed *Mycobacterium tuberculosis* H37 RA (BD Biosciences). The animals were also injected intraperitoneally with PTX at a dose of 20 µg/kg immediately and 48 h after the first immunization. The clinical signs were monitored daily and scored as follows: 0, no detectable sign; 1, tail flaccidity; 2, hindlimb weakness and poor righting ability; 3, hindlimb paralysis/paresis; 4, hindlimb paralysis and forelimb paraparesis; 5, moribund or dead.

L1-10

EAE mice were injected subcutaneously every other day with 4 mg/kg of L1-10 (kindly provided by Amgen Inc., Thousand Oaks, CA, USA) diluted in PBS. Control mice were injected with PBS.

RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNA was isolated from tissue samples and cell cultures using the TRI Reagent (Sigma-Aldrich) or GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich), respectively. RNA integrity and yield were assessed by capillary electrophoresis using the Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Mississauga, Ontario, Canada). Complementary DNA was generated from 2 µg of total RNA using random primer hexamers and Superscript II (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The RNA template was digested with RNase H (Invitrogen).

Microarray analysis

Total RNA (200 ng) was used to produce biotinylated single-strand DNA targets using the GeneChip Whole Transcript Sense Target Labeling Assay (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). The targets were hybridized to Affymetrix GeneChip Mouse Gene 1.0 ST arrays for 16 h at 45°C with constant rotation at 60 rpm. The arrays were washed and stained with streptavidin–phycoerythrin (10 µg/mL) and biotinylated goat anti-streptavidin (3 mg/mL) using the Affymetrix Fluidics Station 450 (protocol FS450-0007), then read using the Affymetrix GeneChip Scanner 3000 G7. The data were processed using the RMA algorithm in Expression Console software (Affymetrix) and filtered using the following

criteria: (i) expression level >100 in at least one sample; and (ii) mean fold change >1.5 between at least two groups. Using the MeV software (31), the filtered data were log₂-transformed and analyzed using the LIMMA algorithm with an alpha level of 0.05. The list of modulated genes was filtered for redundant entries and used to create a Venn diagram with GeneVenn (27).

Quantitative polymerase chain reaction (PCR)

Quantitative PCR (qPCR) was conducted in a final volume of 15 μ L containing 1 \times Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 5 μ L cDNA, 250 nM Amplifluor Uniprimer probe (Chemicon, Temecula, CA, USA), 10 nM Z-tailed primer (18S rRNA, 5'-ACTGAACCTGACCGTACACGGTACAGTGAAACTGCGAATG-3'; ICAM1, 5'-ACTGAACCTGACCGTACACAGGACCGGAGCTGAAAAGTT-3'; VCAM1, 5'-ACTGAACCTGACCGTACAGCCCACTCATTTTAATTACTGGATC-3') and 100 nM untailed primer (18S rRNA, 5'-CCAAAGGAACCATAACTGATTTAATGA-3'; ICAM1, 5'-CTGGAGACGCAGAGGACCTT-3'; VCAM1, 5'-AGGTGGAGGTCTACTCATTCCT-3'). The amplification was performed using the ABI PRISM 7900 Sequence Detector (Applied Biosystems) under the following conditions: 2 min at 50°C, 4 min at 95°C, followed by 55 cycles of 15 s at 95°C and 30 s at 55°C. Ribosomal 18S RNA was used to normalize each sample.

Immunostaining

Immunostaining was performed as described previously (2) using the following primary antibodies: rat anti-CD3 (1:500; Serotec, Raleigh, NC, USA), rat anti-CD45 (1:1000; BD Biosciences), rabbit anti-CD45 (1:500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), rat anti-Ly6G/C (GR1) (1:500; Invitrogen), rat anti-Ly6G (1:5000; BD Biosciences), hamster anti-ICAM1 (1:500; BD Biosciences), rat anti-VCAM1 (1:500; BD Biosciences).

***In situ* hybridization**

Brain sections were analyzed by radioisotopic *in situ* hybridization as described previously (37). Riboprobes were synthesized from linearized plasmids containing a

fragment of the mouse cDNA of Angpt2 (1544 bp), ICAM1 (1474 bp) or VCAM1 (1507 bp).

Stereology

As described previously (2), cell number and volume estimates were obtained using the optical fractionator and Cavalieri methods, respectively.

Microscopy

Confocal images were acquired using an Olympus Fluoview microscope (BX61) by sequential scanning using a z-separation of 0.1 μm . For each fluorochrome, the upper and lower thresholds were set using the range indicator to minimize data loss. Bright-field and dark-field micrographs were taken using a Retiga EX monochrome camera mounted on a Nikon E800 microscope. Images were adjusted for contrast, brightness and sharpness using Photoshop 8 (Adobe Systems, San Jose, CA, USA).

Enzyme-linked immunosorbent assay

Blood samples were obtained by intracardiac puncture, allowed to clot and centrifuged for 20 min at $2000 \times g$. Serum was collected and analyzed for $\text{IFN}\gamma$, $\text{IL}1\beta$, $\text{IL}6$ and TNF using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (R&D Systems).

Flow cytometry

Blood samples were blocked for 15 min with 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti-CD16/CD32 antibody (BD Biosciences) and stained for 30 min on ice with 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti-Ly6G/C (Gr1) antibody. After hemolysis and fixation with the Whole Blood Lysing Reagent Kit (Beckman Coulter, Mississauga, Ontario, Canada), cells were analyzed with a BD FACSCanto II flow cytometer and FlowJo software (Tree Star, San Carlos, CA, USA).

Statistical analyses

Data are expressed as mean \pm standard error. Means were compared using the unpaired Student's t-test, one-way ANOVA or two-way ANOVA. Alternatively, the

Wilcoxon rank-sum test was used when the distribution was abnormal. Bonferroni or Student's t-tests were performed for post hoc multiple comparisons. All these analyses were performed using JMP (SAS Institute, Cary, NC, USA) or Prism 4 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) with a significance level of 5%.

2.5 : Results

Crawling phagocytes are recruited in the cerebral vasculature during PTX exposure and EAE

To determine whether crawling leukocytes can be recruited in the cerebral vasculature in response to stimuli other than LPS, we performed immunohistochemistry for the pan-hematopoietic marker CD45 on brain sections from mice euthanized either 6 h after intraperitoneal injection of PTX (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) or 12–16 days after induction of EAE by active immunization against myelin oligodendrocyte glycoprotein (Figure 1A). As estimated using stereological procedures, the number of crawling leukocytes (ie, CD45⁺ intraluminal leukocytes with a rod-shaped or rounded morphology) was at least twice higher in the cerebral cortex of these mice compared with that of sham-treated mice (Figure 1B–C). For comparison, we also analyzed brain sections from mice treated with LPS and found a roughly similar increase when LPS was administered at a high dose (1 mg/kg), but no difference when administered at a low dose (2 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (Figure 1B). These results are consistent with our previous study showing an increase in crawling leukocytes during endotoxemia that peaks at 6 h and that lasts for at least 3 days (2).

To clarify the identity of the newly recruited crawling leukocytes, we first double-stained brain sections using antibodies against CD45 and Ly6C/G (Figure 1D). The latter antibody, called GR1, labels both granulocytes and inflammatory (type 1) monocytes (13). Under basal conditions, the ratio of GR1⁺ to GR1⁻ rod-shaped leukocytes was roughly 1:3. Interestingly, this ratio was reversed to nearly 3:1 after injection of PTX or LPS (Figure 1E). No significant change was observed in the case of round leukocytes (Figure 1E). The increases in GR1⁺ cells were confirmed by stereological counting using adjacent sections stained for GR1 by immunohistochemistry (Figure 1F–G). We next addressed the question of whether the newly recruited GR1⁺ cells were granulocytes or monocytes using an antibody against the granulocyte-specific antigen Ly6G (12, 24) (Figure 1H). The results revealed increases in Ly6G⁺ cells (Figure 1I) that were comparable with the increases in GR1⁺ cells (Figure 1G) and CD45⁺ cells (Figure 1B). Significant

increases in rod-shaped Ly6G⁺ cells were also recorded in EAE mice (Figure 1J). Finally, we examined whether the population of crawling leukocytes included T cells by performing immunohistochemistry for the lymphocytic marker CD3. No CD3⁺ cell was detected in the brains of mice treated with either one of the toxins, whereas a significant fraction of rod-shaped leukocytes were CD3⁺ in EAE mice killed 14 or 16 days after immunization (72–90 CD3⁺ cells/mm³, representing ~29%–38% of the total population of rod-shaped leukocytes) (Figure S1). Taken together, these observations indicate that the increase in the population of crawling leukocytes is a non-specific response triggered by diverse immune stimuli and attributable largely to the recruitment of granulocytes.

No involvement of Angpt2 during PTX exposure and EAE

We have previously reported that the recruitment of crawling phagocytes in the cerebral vasculature during LPS exposure occurs through an Angpt2-dependent mechanism and can be blocked using an anti-Angpt2 peptide-Fc fusion protein called L1-10 (2). To determine whether PTX and EAE trigger this mechanism, we performed *in situ* hybridization for Angpt2 mRNA on brain sections from mice euthanized 3, 6, 12 or 24 h after PTX injection or euthanized when a clinical scores of 1 to 4 were obtained after EAE induction (n = 4–6 mice per group). No hybridization signal was detected in any sections (Figure 2A). In contrast and as observed previously (2), strong signals were detected in control mice euthanized 6 h after LPS injection (Figure 2A). Similar results were obtained by qPCR (Figure 2B). To definitively exclude a role for Angpt2 in EAE, we injected EAE mice once every other day with L1-10 (4 mg/kg), a regimen previously shown to inhibit Angpt2 activity (25, 36). No significant difference in disease severity was detected in these mice compared with sham-treated animals (Figure 2C). Therefore, these results suggest that PTX and EAE induce the recruitment of crawling phagocytes by a mechanism that is independent of Angpt2 and distinct from the one previously described for LPS (2).

PTX induces vascular changes involved in phagocyte adhesion

In seeking to understand the mechanism by which PTX promotes the recruitment of crawling phagocytes, we hypothesized that PTX might act directly on the vasculature as does LPS (9). To test this possibility, we performed microarray analysis on RNA samples

from cerebral endothelial cells cultured for 6 h in the presence of PTX (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or PBS. The raw data (Table S1) were filtered to retain only the genes that were significantly expressed in at least one sample (hybridization signal >100) and whose average expression varied significantly between at least two conditions by a factor >1.5 ($P < 0.05$). As illustrated in Figure 3A,B, PTX altered the expression of only 14 genes by a magnitude ranging from 1.5 to 3. In contrast, LPS, at a lower molarity, produced a greater effect, with 233 genes that were modulated by a magnitude of 1.7 to 18. All of the genes modulated by PTX were also modulated, to a greater extent, by LPS. To validate these data, we quantified by qPCR two genes known to be involved in leukocyte recruitment, namely VCAM1 and ICAM1 (16). The results confirmed that PTX induced only modestly VCAM1 expression in cultured cerebral endothelial cells but did not affect at all ICAM1 expression (Figure 3C).

To confirm the latter observations *in vivo*, we performed *in situ* hybridization for VCAM1 and ICAM1 mRNAs on brain sections from mice treated for 6 h with PTX (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) or LPS (2 $\mu\text{g}/\text{kg}$), thus respecting the concentration ratio tested *in vitro* (ie, 10:1). As a positive control, we examined the brains of mice injected with a high dose of LPS (1 mg/kg). Surprisingly, PTX strongly induced the expression of VCAM1 and ICAM1 mRNAs in blood vessels, whereas LPS induced their expression only when administered at a high concentration (Figure 4A). Similar observations were made using adjacent sections stained with antibodies against VCAM1 or ICAM1 (Figure 4B). However, an interesting difference in the distribution of these proteins was noted: VCAM1 was restricted to large blood vessels, whereas ICAM1 was also present on capillaries (Figure 4B). In summary, the differences between our *in vitro* and *in vivo* results suggest that PTX promotes vascular changes necessary for leukocyte adhesion by acting indirectly via a mechanism distinct from that of LPS. Our observations also suggest that ICAM1 rather than VCAM1 is involved in the recruitment of phagocytes in the cerebral microvasculature.

IL-6 mediates the effect of PTX on ICAM1 expression and phagocyte recruitment

To identify a mediator through which PTX might act on the vasculature, we measured, in serum of mice exposed to PTX or LPS, the levels of cytokines classically known as regulators of ICAM1 expression in the brain, namely TNF, IL1 β and IFN γ (18).

We also measured the levels of IL6, whose effect on ICAM1 expression has been studied *in vitro* (22, 30) but not in the brain. As is well known, all these cytokines were increased in response to a high dose of LPS (Figure 5). In contrast, only IL6 was significantly increased in response to PTX (Figure 5A)

To determine whether IL6 mediates the effects of PTX, we first counted the number of crawling leukocytes in the cerebral cortex of IL6-knockout and wild-type mice injected with PTX or LPS as a control. As shown in Figure 6A, a normal increase in rod-shaped leukocytes was observed in the knockouts treated with LPS, whereas no increase was observed in those treated with PTX. This result was not caused by an intergroup difference in the number of circulating myeloid cells, as confirmed by flow cytometry (GR1⁺ blood cells: IL6-knockout mice, 22 ± 2%; wild-type mice, 19 ± 2%; Student's t-test, P = 0.22). Next, we examined ICAM1 expression at the mRNA and protein levels by *in situ* hybridization and immunohistochemistry (Figure 6B–C). Quantitative analysis revealed no difference in the mRNA levels of ICAM1 between the knockout and wild-type mice after treatment with PTX or LPS (Figure 6D). However, the protein levels of ICAM1 were not increased in the knockouts treated with PTX, whereas they were normally increased in those treated with LPS (Figure 6E). Overall, these results indicate that IL6 is necessary for the recruitment of rod-shaped phagocytes in response to PTX but is dispensable in the context of LPS. They also suggest that IL6 produces this effect, at least in part, by increasing ICAM1 expression at the post-transcriptional level.

Phagocytes crawl on the cerebral endothelium using ITGαM and ICAM1

It is known that leukocytes can bind to ICAM1 through the integrin dimers αMβ2 (Mac1) or αLβ2 (LFA1) and to VCAM1 through α4β7 (LPAM1) or α4β1 (VLA4). To examine the importance of such interactions in the recruitment of crawling phagocytes in response to PTX, we counted these cells in the cerebral cortex of mice intravenously injected with neutralizing antibodies directed against each of the abovementioned integrin monomers. We also counted these cells in ICAM1-knockout mice, which are viable, as opposed to VCAM1-knockout mice, and which had normal counts of circulating myeloid cells, as confirmed by flow cytometry (%GR1⁺ blood cells: ICAM1-knockout mice, 22 ± 3%; wild-type mice, 23 ± 4%; Student's t-test, P = 0.75). The results revealed a

complete blockage of the recruitment of rod-shaped leukocytes in response to PTX after treatment with an anti-ITG α M antibody but not with any of the other antibodies (Figure 7A–B). Consistently, a partially attenuated recruitment of rod-shaped leukocytes was observed in ICAM1-knockout mice exposed to PTX (Figure 7C). Altogether, these results suggest that phagocytes require ITG α M to adhere to the cerebral endothelium through ICAM1 and probably also another ligand that remains to be identified.

2.6 : Discussion

How phagocytes are attracted to the brain and how PTX promotes EAE are two important questions that confront neuroimmunologists. As illustrated in Figure 8, the present study helps to answer these questions by showing that PTX promotes vascular changes required for leukocyte adhesion. In contrast to LPS, PTX exerts few direct effects on endothelial cells and must act indirectly through mediators distinct from TNF, IL1 β and IFN γ , which are classical regulators of endothelial adhesiveness. Instead, PTX acts through IL6, which contributes to stimulate ICAM1 expression on the capillary surface. In response, appropriately activated phagocytes, mainly granulocytes, adhere to the endothelium, at least in part, through interaction involving ITG α M and ICAM1. In summary and as discussed below, this study (i) identifies the existence of an alternative, non-classical mechanism by which phagocytes are recruited at the blood-brain interface; (ii) it demonstrates the importance of a ligand-receptor couple in this process; and (iii) it suggests that PTX might promote EAE by increasing the patrolling of the CNS vasculature by immune cells capable of crawling on its luminal surface. PTX induces vascular changes required for leukocyte adhesion

It was long believed that PTX promotes EAE by increasing the permeability of the blood–brain barrier (19, 20). However, a few years ago, it was discovered that this effect is secondary, and that PTX rather acts by increasing the adhesiveness of the cerebral endothelium by inducing P-selectin expression (17). The underlying mechanism was not fully elucidated but was found to be dependent on TLR4. Our results extend these observations by showing that PTX induces the expression of other adhesion molecules, namely ICAM1 and VCAM1. It will be important in future studies to consider the following two hypotheses. First, it is plausible that PTX acts through a receptor different from that of LPS and absent in endothelial cells. This is suggested by our observation that PTX exerts few direct effects on endothelial cells, while the latter were responsive to LPS and are known to express TLR4 (9). Second, it is possible that the relative importance of the adhesion molecules involved in phagocyte recruitment varies according to vessel caliber. On the one hand, we did not count leukocytes in large blood vessels, where they

can be confounded with perivascular macrophages caused by their amoeboid morphology. On the other hand, Kerfoot et al could not examine leukocytes in capillaries, because they are too deeply dispersed in the nervous tissue to be visualized by real-time microscopy through an intracranial window. Therefore, it is not possible to definitively conclude that P-selectin has the same importance in capillaries as in larger vessels (eg, arterioles) and vice versa for ICAM1.

IL6 contributes to the effects of PTX

Our observation that PTX did not affect ICAM1 expression in cultured cerebral endothelial cells but strongly induced its expression *in vivo* lead us to examine the possibility that PTX acts indirectly via soluble mediators. ICAM1 is classically regulated by IFN γ and factors that stimulates the nuclear factor-kappa B (NF- κ B) signaling pathway, such as TNF and IL1 β (18). The present study shows that these three mediators are dispensable, and that IL6 is absolutely required for mediating the effect of PTX. The ability of IL6 to induce ICAM1 expression has been demonstrated *in vitro* (22, 30) but not in the brain. Interestingly, the fact that ICAM1 expression was altered in IL6-knockout mice only at the protein level and not at the mRNA level suggests that IL6 stimulates the post-transcriptional machinery that governs ICAM1 production, while another soluble mediator is responsible for stimulating the transcriptional machinery. Further work is needed to identify this mediator and demonstrate how it cooperates with IL6 to increase endothelial adhesiveness.

Adhesion molecules used by crawling phagocytes

ICAM1 and VCAM1 are well-known adhesion molecules, but their relative importance in the recruitment of phagocytes in the brain was unclear. Our observation that VCAM1 was only expressed on large blood vessels during endotoxemia, whereas ICAM1 was also expressed on capillaries, led us to believe that ICAM1, but not VCAM1, is involved in the recruitment of crawling phagocytes. This was confirmed in PTX-treated mice deficient in ICAM1 or injected with an antibody against ITG α M, which is an integrin that forms with ITG β 2 a receptor for ICAM1 called Mac1. No role was found for ITG α L, which forms with ITG β 2 another receptor for ICAM1 called LFA1. This negative result

was not likely caused by an inability of our antibody to neutralize ITG α L, because this antibody was proved to be effective in another study in which it was shown to detach type 2 (GR1⁺) monocytes that crawl in post-capillary venules of the ear in steady-state conditions (3). This difference between our results and those of Auffray et al. could arise from the types of leukocytes and vessels that were studied (ie, inflammatory vs. resident leukocytes and cerebral capillaries vs. large blood vessels of peripheral tissues). Nevertheless, ICAM1 is ostensibly not the only ligand used by crawling phagocytes in the brain, as suggested by the fact that their increase was totally blocked in mice treated with the anti-ITG α M antibody, but only partially blocked in mice lacking ICAM1. Further work will be required to test whether Mac1 interacts with an alternative ligand exposed on the surface of cerebral capillaries.

Recruitment of crawling phagocytes via two different mechanisms

We have previously shown that Angpt2 is needed for the recruitment of crawling leukocytes in response to LPS (2). Angpt2 is believed to be a gatekeeper of endothelial activation. It sensitizes the endothelium toward TNF, thereby enhancing the expression of ICAM1 and VCAM1 (11). This effect might be attributable to the ability of Angpt2 to block the interaction between Tie2 and ABIN-2, an inhibitor of the NF- κ B signaling pathway (15). Considering that TNF, an important regulator of Angpt2 expression (2), was not produced in PTX-treated mice, it is not so surprising that Angpt2 was also not produced in these animals. There are thus at least two different mechanisms that induce phagocyte adhesion in response to different stimuli: one dependent and the other independent of the TNF-Angpt2 axis. It will be interesting in the future to examine why different mechanisms are required, whether the leukocytes recruited by these mechanisms exhibit phenotypic differences and whether there is an alternative gatekeeper to Angpt2 that sensitizes the endothelium toward IL6.

Reinforced patrolling of the vasculature in response to alarm signals

It is interesting to speculate that PTX might promote EAE, at least in part, by increasing the patrolling of the CNS vasculature by leukocytes able to crawl on the endothelium. These leukocytes could be not only innate immune cells, but also T

lymphocytes, as suggested by our finding of CD3⁺ cells with a rod-shaped morphology in the brains of EAE mice. The ability of T cells to crawl in the cerebral vasculature of EAE mice and to interact with phagocytes has been observed in another study using intravital microscopy (4). It therefore seems plausible that microbes and other toxins can produce a similar effect in MS patients, thereby affecting disease severity and progression. It would be exciting to examine in the future whether an anti-ITG α M antibody, or any other drugs designed to block phagocyte crawling, could be used to attenuate MS, as it was the case for EAE (14).

2.7 : Conclusion

Neuroimmunologists have traditionally used LPS as a simple model to study the development of immune responses in the nervous system with the hope of gaining insight into neuroinflammatory diseases, such as EAE and MS. The present study warrants that LPS may not be appropriate for such a purpose, as it induces leukocyte recruitment via an Angpt2-dependent mechanism that is not involved in EAE. Future studies on the alternative mechanism triggered by PTX and uncovered in this study may allow for the identification of new potential targets for the treatment of MS.

2.8 : Acknowledgements

This work was supported by grants from the Multiple Sclerosis Society of Canada (MSSC) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). LV received a Career Award from the Rx&D Health Research Foundation and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), as well as a Chercheur-Boursier Sénior award from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. JFR received master's fellowships from the MSSC and the CIHR. MR received a doctoral fellowship from the NSERC. JAR received a CIHR Strategic Training Program Grant in genomics. We thank Maurice Dufour and Ezequiel-Luis Calvo for assistance with flow cytometry and microarray analysis, respectively. We thank Amgen Inc. for providing L1-10.

2.9 : References

- 1 Andersen O, Lygner PE, Bergstrom T, Andersson M, Vahlne A (1993) Viral infections trigger multiple sclerosis relapses: a prospective seroepidemiological study. *J Neurol* **240**:417–422.
- 2 Audoy-Remus J, Richard JF, Soulet D, Zhou H, Kubes P, Vallieres L (2008) Rod-Shaped monocytes patrol the brain vasculature and give rise to perivascular macrophages under the influence of proinflammatory cytokines and angiopoietin-2. *J Neurosci* **28**:10187–10199.
- 3 Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S *et al* (2007) Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* **317**:666–670.
- 4 Bartholomaeus I, Kawakami N, Odoardi F, Schlager C, Miljkovic D, Ellwart JW *et al* (2009) Effector T cell interactions with meningeal vascular structures in nascent autoimmune CNS lesions. *Nature* **462**:94–98.
- 5 Bokoch GM, Katada T, Northup JK, Hewlett EL, Gilman AG (1983) Identification of the predominant substrate for ADP-ribosylation by islet activating protein. *J Biol Chem* **258**:2072–2075.
- 6 Buljevac D, Flach HZ, Hop WC, Hijdra D, Laman JD, Savelkoul HF *et al* (2002) Prospective study on the relationship between infections and multiple sclerosis exacerbations. *Brain* **125**:952–960.
- 7 Clahsen T, Schaper F (2008) Interleukin-6 acts in the fashion of a classical chemokine on monocytic cells by inducing integrin activation, cell adhesion, actin polymerization, chemotaxis, and transmigration. *J Leukoc Biol* **84**:1521–1529.
- 8 Codina J, Hildebrandt J, Iyengar R, Birnbaumer L, Sekura RD, Manclark CR (1983) Pertussis toxin substrate, the putative Ni component of adenylyl cyclases, is an alpha beta heterodimer regulated by guanine nucleotide and magnesium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**:4276–4280.
- 9 Dauphinee SM, Karsan A (2006) Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. *Lab Invest* **86**:9–22.
- 10 Edwards S, Zvartau M, Clarke H, Irving W, Blumhardt LD (1998) Clinical relapses and disease activity on magnetic resonance imaging associated with viral upper respiratory tract infections in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **64**:736–741.
- 11 Fiedler U, Reiss Y, Scharpfenecker M, Grunow V, Koidl S, Thurston G *et al* (2006) Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF-alpha and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nat Med* **12**:235–239.
- 12 Fleming TJ, Fleming ML, Malek TR (1993) Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family. *J Immunol* **151**:2399–2408.
- 13 Geissmann F, Jung S, Littman DR (2003) Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* **19**:71–82.
- 14 Gordon EJ, Myers KJ, Dougherty JP, Rosen H, Ron Y (1995) Both anti-CD11a (LFA-1) and anti-CD11b (MAC-1) therapy delay the onset and diminish the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* **62**:153–

- 160.
- 15 Hughes DP, Marron MB, Brindle NP (2003) The antiinflammatory endothelial tyrosine kinase Tie2 interacts with a novel nuclear factor-kappaB inhibitor ABIN-2. *Circ Res* **92**:630–636.
 - 16 Imhof BA, Aurrand-Lions M (2004) Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nat Rev Immunol* **4**:432–444.
 - 17 Kerfoot SM, Long EM, Hickey MJ, Andonegui G, Lapointe BM, Zanardo RC *et al* (2004) TLR4 contributes to disease-inducing mechanisms resulting in central nervous system autoimmune disease. *J Immunol* **173**:7070–7077.
 - 18 Lee SJ, Benveniste EN (1999) Adhesion molecule expression and regulation on cells of the central nervous system. *J Neuroimmunol* **98**:77–88.
 - 19 Linthicum DS (1982) Development of acute autoimmune encephalomyelitis in mice: factors regulating the effector phase of the disease. *Immunobiology* **162**:211–220.
 - 20 Linthicum DS, Munoz JJ, Blaskett A (1982) Acute experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. I. Adjuvant action of Bordetella pertussis is due to vasoactive amine sensitization and increased vascular permeability of the central nervous system. *Cell Immunol* **73**:299–310.
 - 21 Marrie RA, Wolfson C, Sturkenboom MC, Gout O, Heinzlef O, Rouillet E, Abenheim L (2000) Multiple sclerosis and antecedent infections: a case-control study. *Neurology* **54**:2307–2310.
 - 22 Modur V, Li Y, Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre TM (1997) Retrograde inflammatory signaling from neutrophils to endothelial cells by soluble interleukin-6 receptor alpha. *J Clin Invest* **100**:2752–2756.
 - 23 Munz C, Lunemann JD, Getts MT, Miller SD (2009) Antiviral immune responses: triggers of or triggered by autoimmunity? *Nat Rev Immunol* **9**:246–258.
 - 24 Nagendra S, Schlueter AJ (2004) Absence of cross-reactivity between murine Ly-6C and Ly-6G. *Cytometry A* **58**:195–200. Direct Link:
 - 25 Oliner J, Min H, Leal J, Yu D, Rao S, You E *et al* (2004) Suppression of angiogenesis and tumor growth by selective inhibition of angiopoietin-2. *Cancer Cell* **6**:507–516.
 - 26 Panitch HS (1994) Influence of infection on exacerbations of multiple sclerosis. *Ann Neurol* **36**(Suppl):S25–S28. Direct Link:
 - 27 Pirooznia M, Nagarajan V, Deng Y (2007) GeneVenn—a web application for comparing gene lists using Venn diagrams. *Bioinformatics* **1**:420–422.
 - 28 Plaut RD, Carbonetti NH (2008) Retrograde transport of pertussis toxin in the mammalian cell. *Cell Microbiol* **10**:1130–1139. Direct Link:
 - 29 Racke MK, Hu W, Lovett-Racke AE (2005) PTX cruiser: driving autoimmunity via TLR4. *Trends Immunol* **26**:289–291.
 - 30 Romano M, Sironi M, Toniatti C, Polentarutti N, Fruscella P, Ghezzi P *et al* (1997) Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of
 - 31 Saeed AI, Sharov V, White J *et al* (2003) TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* **34**:374–378.
 - 32 Sibley WA, Bamford CR, Clark K (1985) Clinical viral infections and multiple sclerosis. *Lancet* **1**:1313–1315.
 - 33 Tamura M, Nogimori K, Murai S, Yajima M, Ito K, Katada T *et al* (1982) Subunit structure of islet-activating protein, pertussis toxin, in conformity with the A-B

- model. *Biochemistry* **21**:5516–5522.
- 34 Tremlett H, van der Mei IA, Pittas F, Blizzard L, Paley G, Mesaros D *et al* (2008) Monthly ambient sunlight, infections and relapse rates in multiple sclerosis. *Neuroepidemiology* **31**:271–279.
- 35 Vallieres L, Sawchenko PE (2003) Bone marrow-derived cells that populate the adult mouse brain preserve their hematopoietic identity. *J Neurosci* **23**:5197–5207.
- 36 Villeneuve J, Galarnau H, Beudet MJ, Tremblay P, Chernomoretz A, Vallieres L (2008) Reduced glioma growth following dexamethasone or anti-angiopoietin 2 treatment. *Brain Pathol* **18**:401–414. Direct Link:
- 37 Villeneuve J, Tremblay P, Vallieres L (2005) Tumor necrosis factor reduces brain tumor growth by enhancing macrophage recruitment and microcyst formation. *Cancer Res* **65**:3928–3936.

2.10 : *Figure legends*

Figure 1. *Increased numbers of crawling leukocytes in the cerebral vasculature during PTX exposure and EAE.* **A.** Nomarski interference micrographs of crawling leukocytes with a rod-shaped or rounded morphology in mouse brain sections stained for CD45 by immunohistochemistry. **B.** Counts of CD45⁺ crawling leukocytes in the cerebral cortex of mice euthanized 6 h after intraperitoneal injection of PBS, LPS or PTX. *Significantly different from PBS according to *post hoc* Student's *t*-tests. ANOVA: $P = 0.012$ (rod cells) or 0.0005 (round cells). Sample size: four to nine mice per group. **C.** Counts of CD45⁺ crawling leukocytes in the cerebral cortex of mice euthanized before (day 0) or 12–16 days after EAE induction. *Significantly different from day 0 according to *post hoc* Student's *t*-tests. ANOVA: $P = 0.011$ (rod cells) or 0.31 (round cells). Sample size: three to six per group. **D.** Confocal micrographs of a rod-shaped leukocyte doubly labeled for GR1 (Ly6C/G) and CD45 by immunofluorescence. **E.** Percentages of CD45⁺ crawling leukocytes positively labeled with the GR1 antibody. *Significantly different from PBS according to *post hoc* Student's *t*-tests. ANOVA: $P < 0.0001$. Sample size: 6 per group. **F.** Micrograph of a rod-shaped leukocyte immunostained with the GR1 antibody. **G.** Counts of GR1⁺ leukocytes in the cerebral cortex of mice treated with PBS, LPS, or PTX. *Significantly different from PBS according to *post hoc* Student's *t*-tests. ANOVA: $P = 0.0032$ (rod cells) or 0.039 (round cells). Sample size: five to six per group. **H.** Micrograph of a rod-shaped leukocyte immunostained with an anti-Ly6G antibody. **I.** Counts of Ly6G⁺ leukocytes in the cerebral cortex of mice treated with PBS, LPS or PTX. *Significantly different from PBS according to *post hoc* Student's *t*-tests. ANOVA: $P = 0.0078$ (rod cells) or 0.027 (round cells). Sample size: five to six per group. **J.** Counts of Ly6G⁺ leukocytes in the cerebral cortex of EAE mice. *Significantly different from PBS according to *post hoc* Student's *t*-tests. ANOVA: $P = 0.036$ (rod cells) or 0.14 (round cells). Sample size: three to six per group.

Figure 2. *Angpt2 is not expressed in the brain in response to PTX and is not involved in EAE.* **A.** Dark-field micrographs showing *in situ* hybridization signals for Angpt2 mRNA in the brain of a mouse treated with LPS (upper-right panel) but not in the brains of mice

treated with PBS or PTX or subjected to EAE. The animals were euthanized 6 h after injection or when a clinical score of 4 was reached after EAE induction. **B.** Quantitative PCR quantification of *Angpt2* mRNA in the brains of mice subjected to the indicated conditions. *Significantly different from PBS. ANOVA, $P < 0.0001$. Sample size: five to seven per group. Clinical scores of the EAE mice: from 2 to 3.5. **C.** No difference in the severity of EAE was detected in mice treated with the *Angpt2* inhibitor L1-10 (4 mg/kg, once every other day) compared with mice treated with PBS. Two-way ANOVA with repeated measures: $P = 0.93$. Sample size: eight per group.

Figure 3. *PTX induces few transcriptional changes in cultured cerebral endothelial cells.*

A. Venn diagram showing the number of genes identified by microarray analysis as being modulated in bEnd.3 cerebral endothelial cells incubated for 6 h in the presence of PTX (100 ng/mL) or LPS (10 ng/mL) as compared with cells treated with PBS. **B.** Hybridization signals of the 14 genes modulated by both PTX and LPS. The color scale indicates the intensity of the signals in arbitrary unit. The dendrograms indicate the degree of similarity among the genes or samples. They were produced by hierarchical clustering using Euclidean distance as the distance metric. **C.** Quantification of VCAM1 and ICAM1 mRNAs in bEnd.3 cells by qPCR. *Significantly different from PBS according to *post hoc* Student's *t*-tests. Two-way ANOVA: time effect, $P < 0.0001$; treatment effect, $P < 0.0001$; interaction, $P < 0.0001$.

Figure 4. *PTX induces VCAM1 and ICAM1 expression in cerebral blood vessels.* **A.** Dark-field micrographs showing *in situ* hybridization signals for VCAM1 and ICAM1 mRNAs in the brains of mice killed 6 h after intraperitoneal injection of PBS, LPS or PTX. **B.** Bright-field micrographs showing immunohistochemical staining for VCAM1 or ICAM1 in adjacent brain sections.

Figure 5. *PTX induces the expression of IL6 but not of IL1 β , TNF and IFN γ .* **A–D.** Quantification of each cytokine by ELISA in serum collected from mice 6 h after intraperitoneal injection of PBS, LPS or PTX. *Significantly different from PBS according to *post hoc* Bonferroni tests. Kruskal–Wallis test: $P < 0.0001$. Sample size: eight per group.

Figure 6. *IL6 mediates the effects of PTX on the recruitment of crawling leukocytes and the post-transcriptional expression of ICAM1 in the brain vasculature.* **A.** Counts of CD45⁺ crawling leukocytes in the cerebral cortex of IL6-knockout (KO) and wild-type (WT) mice euthanized 6 h after intraperitoneal injection of PBS, LPS or PTX. *Significantly different from the wild types according to *post hoc* Student's *t*-tests. Two-way ANOVA: genotype effect, $P = 0.29$ (rod cells) or 0.34 (round cells); treatment effect, $P < 0.0001$ (rod cells) or $= 0.0004$ (round cells); interaction, $P = 0.0083$ (rod cells) or 0.66 (round cells). Sample size: seven to nine per group. **B.** Dark-field micrographs of *in situ* hybridization signals for ICAM1 mRNA in brain sections from IL6-deficient and wild-type mice treated with PTX. **C.** Bright-field micrographs of brain sections derived from IL6-deficient and wild-type mice treated with PTX and stained for ICAM1 by immunohistochemistry. **D.** Quantification of the hybridization signals in the cerebral cortex by optical density (OD) readings. ANOVA: genotype effect, $P = 0.42$; treatment effect, $P < 0.0001$; interaction, $P = 0.64$. Sample size: six to eight per group. **E.** Quantification of the volume occupied by ICAM1⁺ blood vessels in the cerebral cortex. *Significantly different from PBS according to *post hoc* Student's *t*-tests. Two-way ANOVA: genotype effect, $P < 0.0001$; treatment effect, $P < 0.0001$; interaction, $P \leq 0.0001$. Sample size: eight or nine per group.

Figure 7. *Crawling leukocytes depend on ITGaM and ICAM1 for adhesion to the cerebral vasculature in response to PTX.* **A, B.** Counts of CD45⁺ crawling leukocytes in the cerebral cortex of mice treated with different neutralizing antibodies against integrins and euthanized 6 h after intraperitoneal injection of PBS or PTX (20 μ g/kg). *Significantly different from the isotype controls according to *post hoc* Student's *t*-tests. ANOVA for **A**: $P < 0.0001$ (rod cells) or $= 0.096$ (round cells). ANOVA for **B**: $P = 0.36$ (rod cells) or 0.75 (round cells). Sample size: 5–10 per group. **C.** Counts of CD45⁺ crawling leukocytes in the cerebral cortex of ICAM1-knockout (KO) and wild-type (WT) mice euthanized 6 h after injection of PBS or PTX. *Significantly different from the wild types according to *post hoc* Student's *t*-tests. Two-way ANOVA: genotype effect, $P = 0.05$ (rod cells) or 0.035 (round cells); treatment effect, $P = 0.005$ (rod cells) or 0.10 (round cells); interaction, $P = 0.05$ (rod cells) or 0.32 (round cells). Sample size: 5–10 per group.

Figure 8. *A proposed mechanism by which phagocytes are recruited at the blood-brain interface in response to PTX.* (1) In peripheral tissues, PTX stimulates cells to secrete IL6. Ostensibly, another mediator, different from TNF, IL1 β and IFN γ , is also secreted and remains to be identified. (2) IL6 circulates in the blood and contributes to stimulate ICAM1 expression on the endothelial surface by acting at the post-transcriptional level. The as yet unknown mediator is responsible for triggering ICAM1 gene transcription. (3) IL6 might also induce integrin activation on phagocytes, as suggested by a recent study (7). (4) Activated phagocytes, mainly granulocytes, adhere to cerebral capillaries by binding to ICAM1 and an as yet unknown ligand through integrin α M β 2.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at : <http://onlinelibrary.wiley.com>

Figure S1. Micrograph of a rod-shaped leukocyte immunostained with an anti-CD3 antibody.

Table S1. Genes differentially regulated in mouse bEnd.3 cerebral endothelial cells in response to PTX and/or LPS, as determined using Affymetrix DNA microarrays.

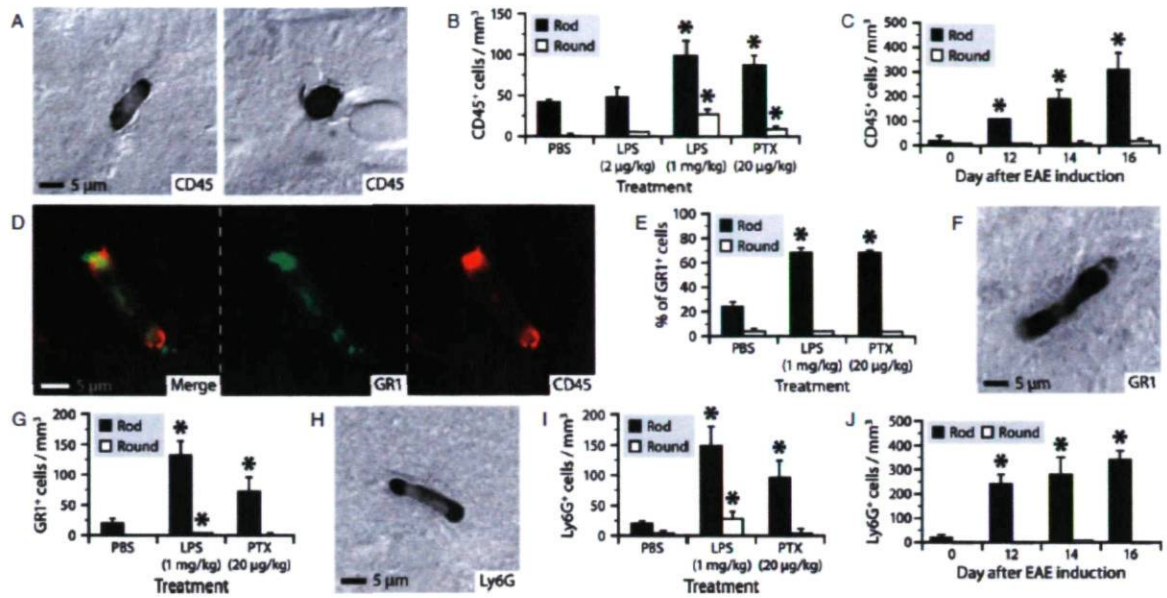


Figure 1 : Increased numbers of crawling leukocytes in the cerebral vasculature during PTX exposure and EAE.

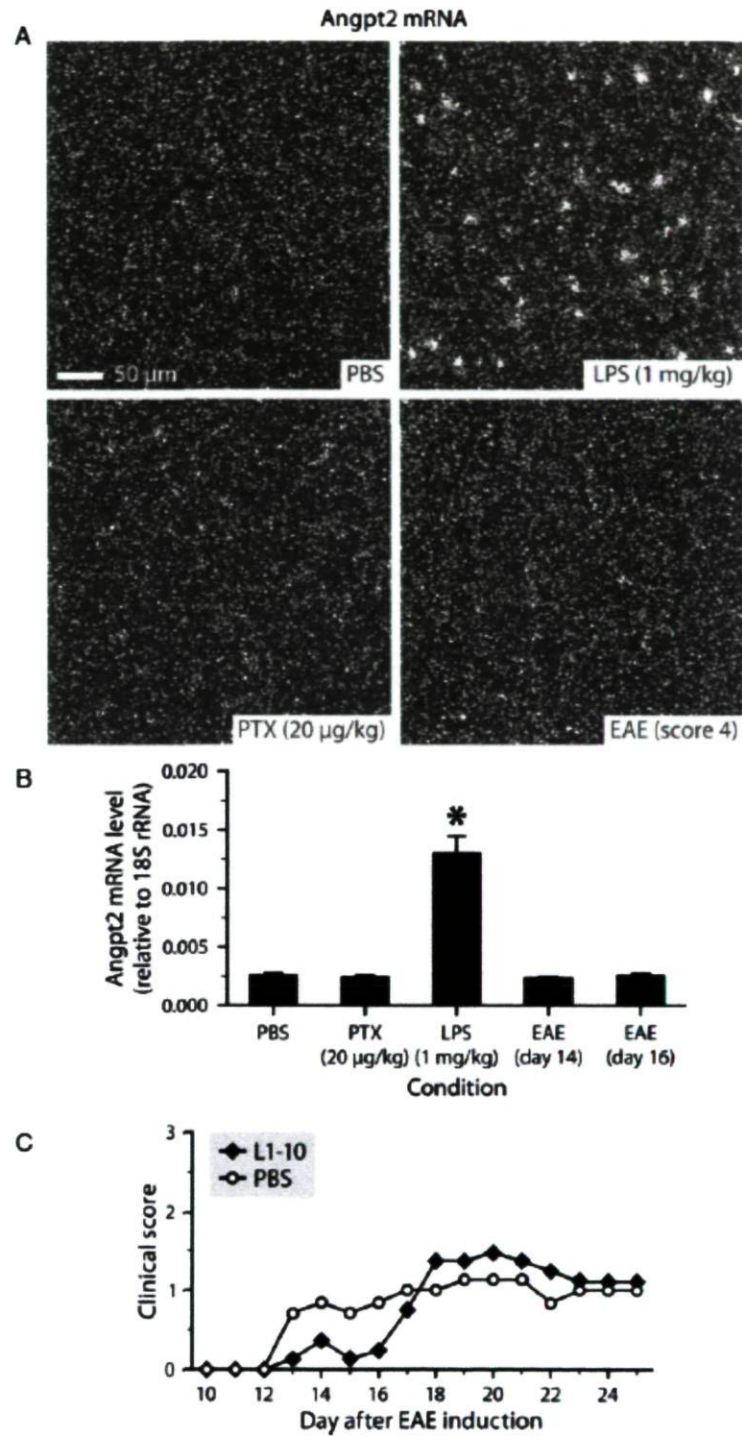


Figure 2 : *Angpt2* is not expressed in the brain in response to PTX and is not involved in EAE

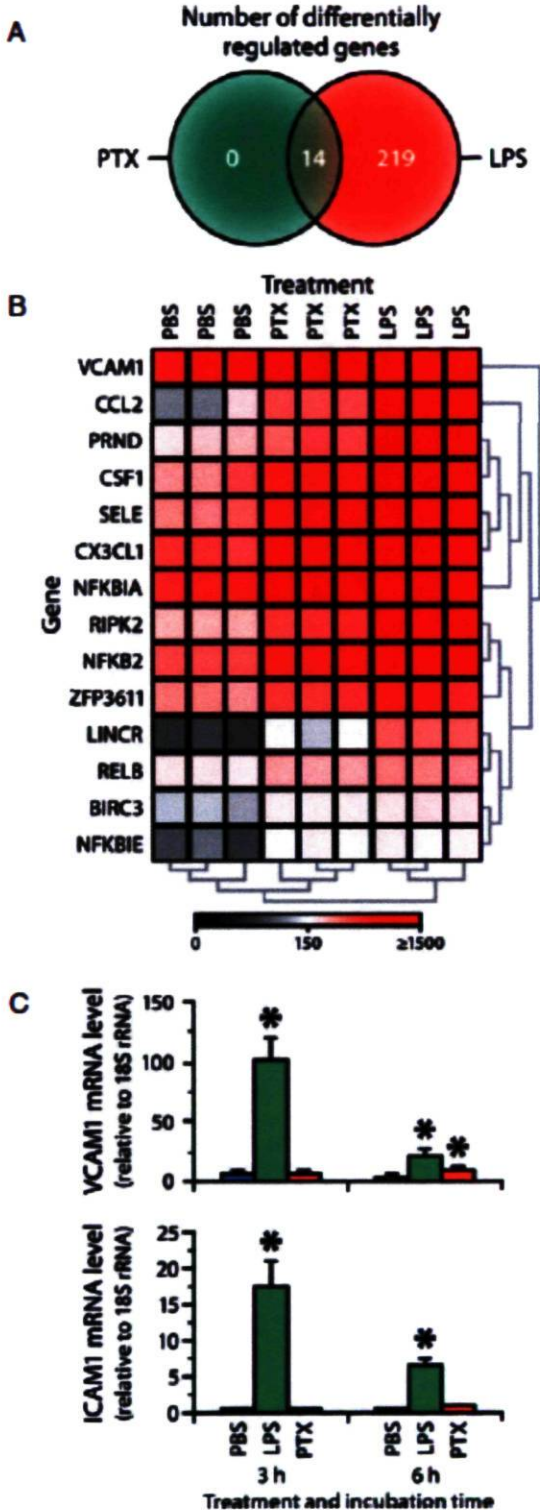


Figure 3 : PTX induces few transcriptional changes in cultured cerebral endothelial cells.

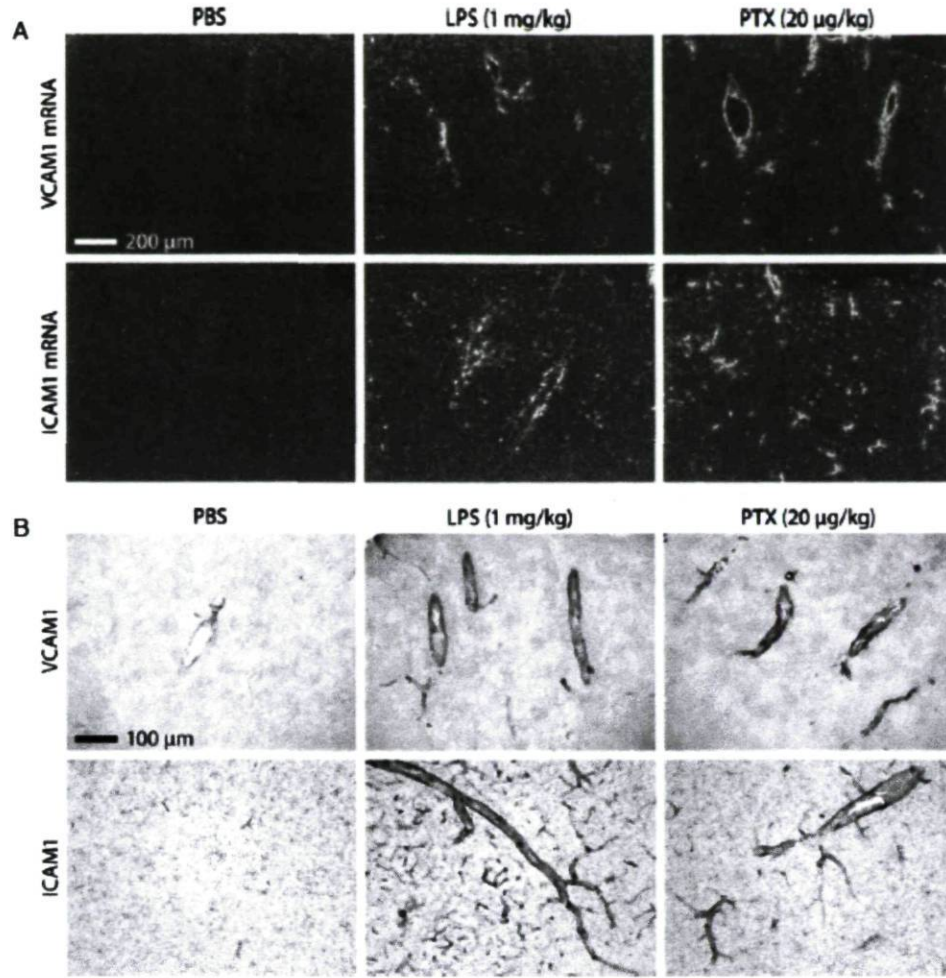


Figure 4 : *PTX induces VCAM1 and ICAM1 expression in cerebral blood vessels.*

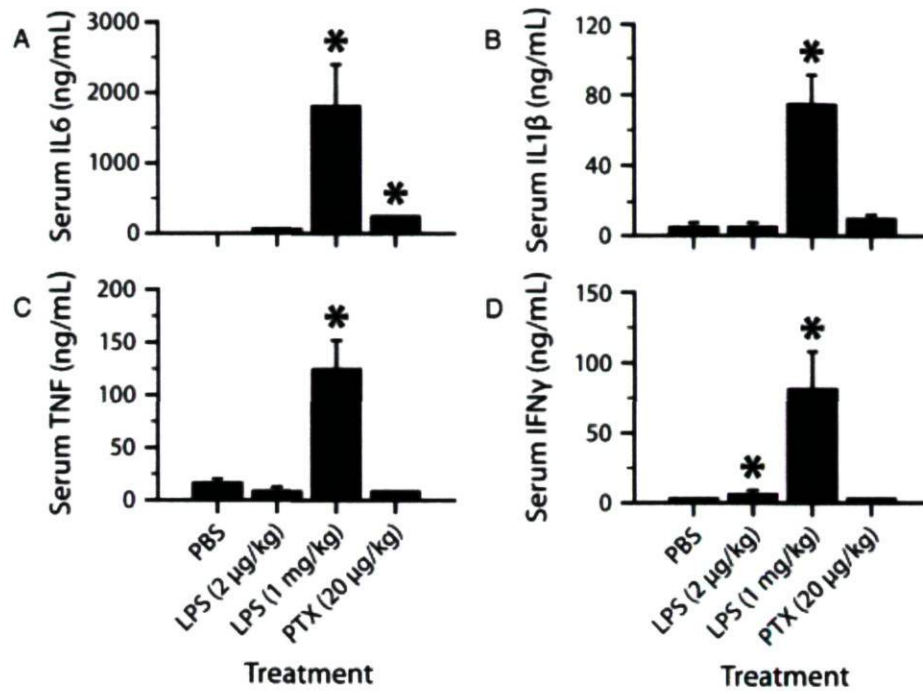


Figure 5 : PTX induces the expression of IL6 but not of IL1β, TNF and IFNγ.

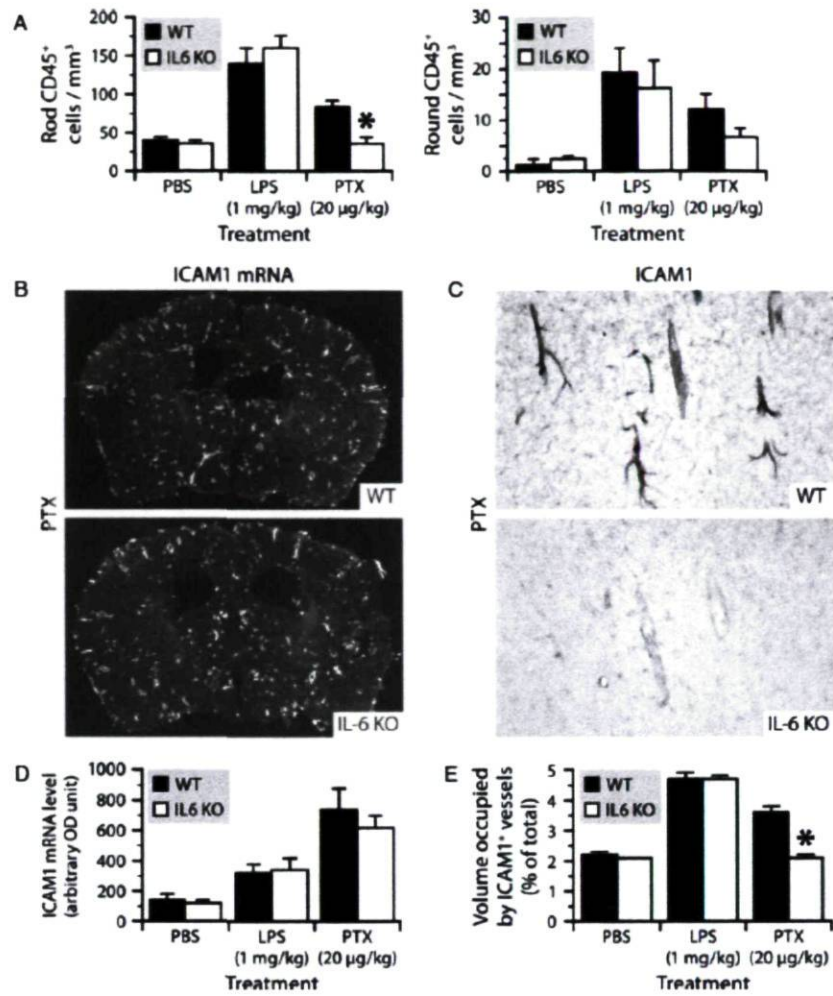


Figure 6 : *IL6* mediates the effects of PTX on the recruitment of crawling leukocytes and the post-transcriptional expression of ICAM1 in the brain vasculature.

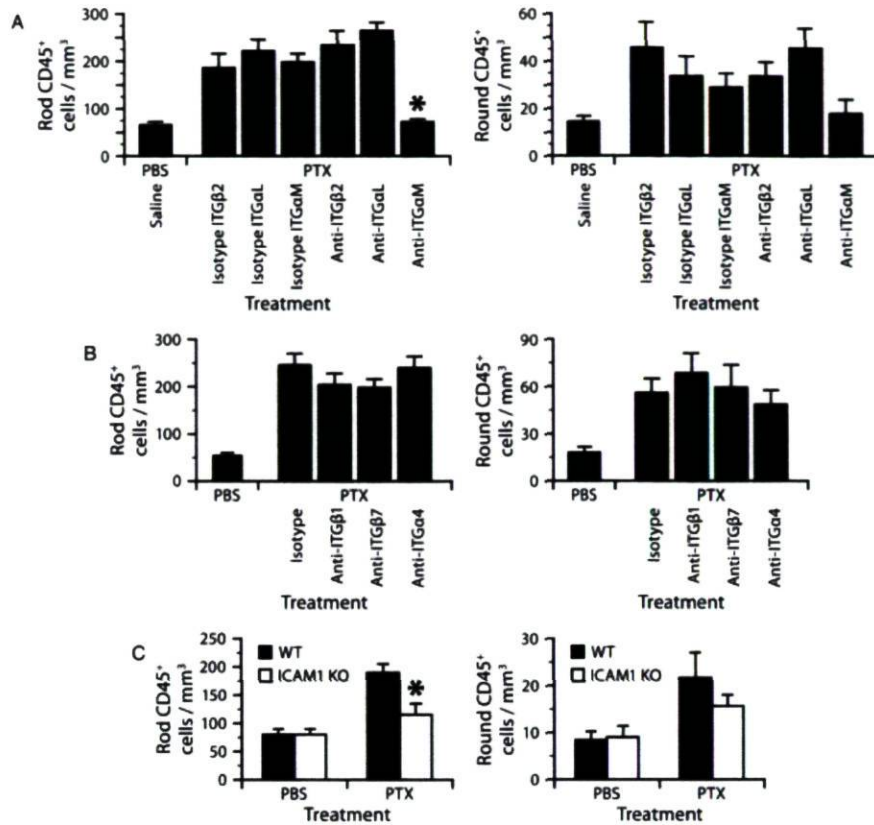


Figure 7 : Crawling leukocytes depend on *ITGαM* and *ICAM1* for adhesion to the cerebral vasculature in response to *PTX*.

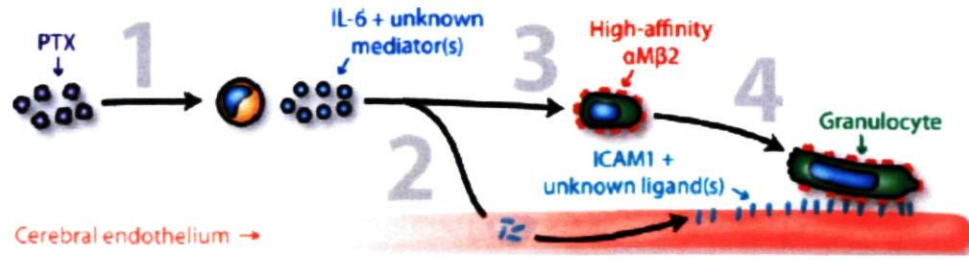


Figure 8 : *A proposed mechanism by which phagocytes are recruited at the blood-brain interface in response to PTX.*

**Chapitre 3 : CXCL1 peut être régulé par l'IL-6 et
promouvoir l'adhésion des granulocytes aux capillaires
cérébraux en réponse à des toxines bactériennes et
durant une encéphalomyélite**

CXCL1 can be regulated by IL-6 and promotes granulocyte adhesion to brain capillaries during bacterial toxin exposure and encephalomyelitis

Monica Roy*, Jean-François Richard*, Aline Dumas, and Luc Vallières

Department of Endocrinology and Genomics, Laval University Hospital Research Center, Quebec, QC,
Canada G1V 4G2

*These authors contributed equally to this work.

Correspondence:

Dr. Luc Vallières, Ph.D., Professor
Department of Endocrinology and Genomics
Laval University Hospital Research Center
2705 Laurier Boulevard, Quebec, QC, Canada G1V 4G2
Tel.: 418-654-2296
Fax: 418-654-2761
E-mail: Luc.Vallieres@crchul.ulaval.ca

Abbreviated title:

CXCL1 promotes granulocyte adhesion to brain capillaries.

Author contributions:

LV designed the experiments, supervised the project, and wrote the paper. MR and JFR performed most of the experiments with the assistance of AD.

3.1: Résumé

Les granulocytes peuvent jouer des rôles bénéfiques dans le SNC, mais des résultats récents suggèrent qu'ils peuvent aussi être néfastes dans l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), le modèle le plus populaire de la sclérose en plaques. L'étude des cytokines et des molécules d'adhésion impliquées dans l'adhésion des granulocytes à la vasculature cérébrale a déjà été amorcée. Cependant, l'identification de la chimiokine impliquée demeure à découvrir. Dans cette recherche, nous avons démontré que CXCL1 est le ligand de CXCR2 le plus exprimé dans le SNC de souris souffrant d'EAE ainsi que lors du traitement avec des toxines bactériennes, soit le lipopolysaccharide (LPS) ou la toxine pertussique (PTX), laquelle est utilisée pour potentialiser l'EAE. De plus, l'expression de CXCL1 peut être régulée au niveau transcriptionnel par l'IL-6 dans les cellules de l'endothélium cérébral tel que démontré chez les souris IL-6^{-/-} et *in vitro*. Également, l'utilisation d'un anticorps neutralisant pour CXCL1 révèle que cette chimiokine est essentielle pour l'adhésion des granulocytes aux capillaires cérébraux sous les trois conditions à l'étude. Finalement, la sévérité de l'EAE est diminuée chez les souris traitées quotidiennement durant la première semaine de la phase effectrice de la maladie. Alors, cette étude a non seulement identifié CXCL1 comme étant un élément clé du recrutement des granulocytes dans le SNC, mais aussi comme une cible thérapeutique potentiellement intéressante pour des maladies neuro-inflammatoires telles que la sclérose en plaques.

3.2 : *Abstract*

Background: Granulocytes generally exert protective roles in the central nervous system (CNS), but recent studies suggest that they can be detrimental in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), the most common model of multiple sclerosis. While the cytokines and adhesion molecules involved in granulocyte adhesion to the brain vasculature have started to be elucidated, the required chemokines remain undetermined.

Methods: CXCR2 ligand expression was examined in the CNS of mice suffering from EAE or exposed to bacterial toxins by quantitative RT-PCR and *in situ* hybridization. CXCL1 expression was analyzed in IL-6-treated endothelial cell cultures by quantitative RT-PCR and ELISA. Granulocytes were counted in the brain vasculature after treatment with a neutralizing anti-CXCL1 antibody using stereological techniques.

Results: CXCL1 was the most highly expressed ligand of the granulocyte receptor CXCR2 in the CNS of mice subjected to EAE or infused with lipopolysaccharide (LPS) or pertussis toxin (PTX), the latter being commonly used to induce EAE. IL-6 upregulated CXCL1 expression in brain endothelial cells by acting transcriptionally and mediated the stimulatory effect of PTX on CXCL1 expression. The anti-CXCL1 antibody reduced granulocyte adhesion to brain capillaries in the three conditions under study. Importantly, it attenuated EAE severity when given daily for a week during the effector phase of the disease.

Conclusions: This study identifies CXCL1 not only as a key regulator of granulocyte recruitment into the CNS, but also as a new potential target for the treatment of neuroinflammatory diseases such as multiple sclerosis.

3.3 : Introduction

Myelin-reactive CD4⁺ T lymphocytes play a critical role in the pathogenesis of multiple sclerosis and its animal model, EAE [1]. A basic principle in immunology states that these cells do not act alone, but rather in concert with different populations of myeloid phagocytes, which activate them by presenting antigens and producing proinflammatory molecules, and which execute effector functions. The phagocytes best known to be involved in EAE are monocyte-derived CD11c⁺ dendritic cells [2-5] and Ly6C⁺ macrophages originating from either microglia or monocytes [2,4,6,7]. In addition, mounting evidence suggests the involvement of a third population of phagocytes, namely granulocytes. Indeed, it has been reported that granulocytes massively infiltrate the CNS of EAE mice [8-17], and that EAE is markedly attenuated in mice either treated with antibodies against the granulocyte proteins CXCR2 and Ly6G, treated with a small molecule antagonist of CXCR2, or genetically manipulated to suppress CXCR2 [12,18-20]. Therefore, granulocytes and the extracellular signaling pathways that control them represent novel potential therapeutic targets for multiple sclerosis.

We have uncovered a population of rod-shaped granulocytes that patrol the CNS vasculature by crawling on the luminal endothelial surface [17,21,22]. These cells are recruited in greater number in mice suffering from EAE or exposed to bacterial products such as LPS and PTX [17,21]. According to the classical model, the mechanism underlying this recruitment includes the following steps: 1) proinflammatory cytokines induce the expression of chemokines and adhesion molecules on the endothelial surface; 2) these chemokines activate granulocytes by promoting the conversion of integrins from a low-affinity to a high-affinity state; and 3) the latter integrins allow the firm attachment of granulocytes to endothelial adhesion molecules [23]. So far, we have gathered evidence that PTX induces ICAM1 expression in brain capillaries indirectly through IL-6, and that granulocytes bind to these vessels through interaction between Mac1 (integrin α Mb2) and intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1) [17]. In contrast, granulocyte adhesion in response to LPS is independent of IL-6, but dependent on TNF and IL-1 β [17,21]. An important question that remains to be addressed is what chemokine(s) control granulocyte adhesion in the cerebral microvasculature.

The G-protein-coupled receptor CXCR2 is crucial for granulocyte infiltration into the brain parenchyma, as demonstrated using CXCR2-knockout mice exposed to LPS or *Staphylococcus aureus* [24,25]. However, it is still unclear whether CXCR2 intervenes during adhesion and/or transmigration. CXCR2 binds to chemokines of the CXC family containing the glutamate-leucine-arginine (ELR) motif (i.e., CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, and CXCL7 in mouse and human, in addition to CXCL6 and CXCL8 in human only) [26]. This family also comprises mouse CXCL15, which does not appear to bind CXCR2 [27]. Both CXCL1 and CXCL2 are upregulated in the CNS of mice suffering from endotoxemia [24] or EAE [13,14,16,28-30]. Such information is not available for the other CXCR2 ligands, leading to question the relative importance of these molecules in granulocyte recruitment into the CNS.

The primary objective of the present study was to identify the main CXCR2 ligand responsible for granulocyte adhesion to brain capillaries during EAE and after exposure to bacterial toxins, especially PTX, which is commonly used as an adjuvant to induce EAE [31], but whose mechanism of action is still not fully understood. The second objective was to examine whether the effect of PTX on CXCL1 expression is mediated by IL-6, a cytokine essential for EAE development [32-36] and previously identified as mediating the effect of PTX on endothelial ICAM1 expression [17].

3.4 : Methods

Mice

Experiments were performed on male mice aged 8-10 weeks with the approval of our institutional animal ethics committee. The animals were obtained from Charles River Laboratories (C57BL/6 mice) or The Jackson Laboratory (IL-6-knockout and wild-type mice with a C57BL/6 background). They were housed individually in ventilated cages and acclimated for at least 1 week before use.

Toxin injection

Mice were injected intraperitoneally with 20 µg/kg PTX (List Biological Laboratories) or 1 mg/kg LPS from *Escherichia coli* O55:B5 (Sigma-Aldrich) both diluted in PBS. Control mice were injected with PBS only.

EAE induction and clinical evaluation

Mice were injected subcutaneously on day 0 with 200 µl (100 µl/site) of emulsion containing 300 µg of myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide 35-55 (AnaSpec) dissolved in saline and mixed with an equal volume of complete Freund's adjuvant containing 500 µg of killed *Mycobacterium tuberculosis* H37 RA (Difco Laboratories). The animals were also injected intraperitoneally with PTX (20 µg/kg) immediately and 48 h after the first immunization. Clinical signs were monitored daily and scored as follows: 0, no detectable sign; 0.5, partially limp tail; 1, paralyzed tail; 2, loss in movement coordination and hind limb paresis; 2.5, one hind limb paralyzed; 3, both hind limbs paralyzed; 3.5, hind limbs paralyzed and weakness in forelimbs; 4, fore limbs paralyzed; 5, moribund or dead [31].

Treatment with neutralizing antibodies

Mice were injected via a tail vein with the following antibodies (all purchased from R&D Systems) at a concentration of 4 or 20 mg/kg in PBS: anti-CXCL1 (rat IgG_{2A}), anti-

CXCL2 (rat IgG_{2B}), anti-CXCR2 (rat IgG_{2A}), and isotype control antibodies (rat IgG_{2A}). A single injection of these antibodies was given 1 h before toxin injection, whereas daily injections were given from day 7 to day 13 after EAE induction

RNA isolation

Total RNA was isolated from tissues and cultured cells by homogenization in TRI-reagent (Sigma-Aldrich) followed by purification using the GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich). RNA integrity and quantity were assessed using the Bioanalyzer 2100 capillary electrophoresis system (Agilent Technologies) and the NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific), respectively.

Quantitative RT-PCR

First strand cDNA was generated from 2 µg of total RNA using Superscript III (Invitrogen) with random hexamer and 20-mer oligo-dT primers, then purified with the GenElute PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich). The product (20 ng) was analyzed using the LightCycler 480 system with the SYBR Green I Master mix according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems). The primers were as follows: CXCL1, 5'- ATCCAGAGCTTGAAGGTGTTG-3' and 5'-GTCT GTCTTCTTTCTCCGTTACTT-3'; CXCL2, 5'- ATGCC TGAAGACCCTGCCAAG-3' and 5'-GGTCAGTTAG CCTTGCCTTTG-3'; CXCL3, 5'-CATCCAGAGCTTGACGGTGAC- 3' and 5'-CTTGCCGCTCTTCAGTATCTTCTT- 3'; CXCL5, 5'-ACAGTGCCCTACGG TGGAAGT-3' and 5'-CGAGTGCATTCCGCTTAGC TT-3'; CXCL7, 5'-GGAAAATCTGATGGCATGGAC-3' and 5'-CAGGCACGTTTTTTGTCCATTCT-3'; SOCS3, 5'-GAGAAGATTCCGCTGGTACTG-3' and 5'-GCAGC TGGGTCACCTTCTCATA-3'; ICAM1, 5'- CCCAAGGAGATCACATTCACG- 3' and 5'-TTCCAGGGAGCAAAACA ACTTCT- 3'. The PCR conditions consisted of 45 cycles of 10 sec at 95°C (denaturation), 10 sec at 60°C (annealing), 12 sec at 72°C (elongation), and 5 sec at 78°C (reading). The number of cDNA copies was determined using the second derivative method as described previously [37].

Immunostaining

Immunohistochemistry was performed as described previously [21] using the following primary antibodies: rat anti-CD3 (1:500, Serotec), rat anti-CD31 (1:500, BD Biosciences), rat anti-CD45 (1:1000, BD Biosciences), rabbit anti-Iba1 (1:2000, Wako Chemicals), rabbit anti- GFAP (1:1000, Millipore), and rat anti-Ly6G (1:5000, BD Biosciences).

***In situ* hybridization**

Brain sections were analyzed by *in situ* hybridization as described previously [38]. Combined *in situ* hybridization and immunohistochemistry was performed according to a previously described protocol [39].

Stereology

Cells were counted using the optical fractionator methods as described previously [21].

Flow cytometry

Blood samples were blocked for 15 min with 5 µg/ml anti-CD16/CD32 antibody (BD Biosciences) and stained for 30 min on ice with the following antibodies (1 µl each per 10⁶ cells): rat anti-7/4-RPE (Serotec), rat anti- CD45-FITC (BD Pharmingen), rat anti-CD115-APC (eBioscience), and rat anti-Ly6G-PerCP-Cy5.5 (BD Pharmingen). After hemolysis and fixation with the Whole Blood Lysing Reagent Kit (Beckman Coulter), cells were analyzed with a BD FACSCanto II flow cytometer and FlowJo software (Tree Star).

Cell culture

bEnd.3 cerebral endothelial cells (American Type Culture Collection) were cultured in six-well plates in DMEM containing 10% FBS, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin (Sigma-Aldrich). At confluence, the medium was replaced with fresh medium supplemented or not with mouse IL-6 (10 ng/ml, R&D Systems), mouse IL-6 receptor a (IL-6Ra; 1 µg/ml, R&D Systems), and/or rat anti-mouse-IL-6 antibody (40 µg/

ml, R&D Systems). The cells were lysed 3 h later for RNA isolation. Supernatant was collected for quantification of CXCL1 using an ELISA kit (R&D Systems).

Statistical analyses

Data are expressed as mean \pm standard error. Means were compared using the unpaired Student's t test, oneway ANOVA, or two-way ANOVA. Alternatively, the Kruskal-Wallis test was used when the distribution was abnormal. Student's t tests or Wilcoxon tests were performed for *post hoc* multiple comparisons. All these analyses were performed using JMP (SAS Institute) with a significance level of 5%.

3.5 : Results

CXCL1 is the main CXCR2 ligand expressed in the inflamed CNS

To determine which CXCR2 ligands are expressed in the brain during inflammatory conditions, we first measured by quantitative RT-PCR the mRNA levels of these ligands in the brains of mice killed 6 h after intraperitoneal injection of PTX (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$), LPS (1 mg/kg), or control solution (PBS). As shown in Figure 1a, both toxins upregulated CXCL1 and CXCL2 mRNAs by ≥ 80 times compared to the basal levels. The transcripts of CXCL1 were ~ 4 times more abundant than those of CXCL2. In contrast, only LPS upregulated CXCL3, CXCL5, and CXCL7 mRNAs, albeit by no more than 8 times. These transcripts were respectively 108, 7, and 287 times less abundant than those of CXCL1 in LPS-treated mice.

To confirm the above results and examine the distribution of the cells expressing CXCR2 ligands, we next analyzed brain sections by *in situ* hybridization. Many cells positively labeled for CXCL1 mRNA were detected throughout the brains of mice exposed to either toxin (Figure 1b), whereas only a few positive cells were detected for CXCL2 mRNA (Figure 1b) and none for CXCL3, CXCL5, or CXCL7 mRNA (data not shown). In general, the labeled cells appeared to be distributed along blood vessels, especially those of large caliber. To confirm this observation, we double labeled brain sections for CXCL1 mRNA and cell type-specific markers. The hybridization signals colocalized with the endothelial marker CD31, but not with the microglial marker Iba1 or the astrocytic marker GFAP (Figure 1c). Similar observations were made for CXCL2 mRNA (data not shown).

To examine whether a comparable upregulation of CXCR2 ligands occurs in EAE, we repeated the experiments described above using RNA and tissue samples obtained from mice killed from 3 to 12 days after EAE induction. As observed in LPS-treated mice, all of the CXCR2 ligands were transcriptionally upregulated in the brains and spinal cords of EAE mice, the most highly expressed being CXCL1 (Figure 2a). With a marked increase noted from day 6, their expression at day 12 was still maximal in the spinal cord, but tended to decrease in the brain. In contrast to what we observed with the toxins, the signals

detected by *in situ* hybridization were mainly distributed in the choroid plexus and leptomeninges (Figure 2b), where they colocalized with CD31 staining and where numerous infiltrating T cells were present (Figure 2c). Overall, the results presented thus far indicate that CXCL1 is the main CXCR2 ligand expressed in the CNS in response to different inflammatory stimuli and originates from the vasculature.

IL-6 induces CXCL1 transcription in endothelial cells

We have previously shown that PTX increases ICAM1 expression in the cerebral endothelium indirectly through IL-6, which acts post-transcriptionally, but not transcriptionally [17]. To test whether IL-6 also regulates CXCL1 expression, we compared the levels of CXCL1 mRNA in the brains of IL-6-knockout and wild-type mice injected with PTX by *in situ* hybridization. Many strong hybridization signals were observed in the wild types, but no signal was detected in the knockouts (Figure 3a). To complement this experiment, we cultured cerebral endothelial cells in the presence of IL-6 for 3 h, and found an increased expression of CXCL1 both at the mRNA and protein levels (Figure 3b). Although this effect was not enhanced by the addition of soluble IL-6 receptor, it was totally inhibited by pre-incubation with an anti-IL-6 antibody, confirming the specificity of the results. The validity of this experiment is also supported by the observations that SOCS3 and ICAM1 mRNAs were respectively upregulated and unaffected by IL-6, as expected from previous studies [17,40]. Altogether, these findings demonstrate that IL-6 can regulate CXCL1 expression by acting at the transcriptional level.

CXCL1 promotes granulocyte adhesion to cerebral blood vessels

We have previously reported that the population of adherent intraluminal leukocytes (CD45^{high} cells with a round or rod-shape morphology) increases in the cerebral vasculature after exposure to bacterial toxins, and that this response is largely attributable to de novo recruitment of granulocytes [17]. To examine the importance of CXCL1 in this response, we pretreated mice with 4 mg/kg anti-CXCL1, anti-CXCR2 (positive control), or isotype antibody (negative control) before challenging them with PTX or LPS. Histological analysis revealed that the increase in rod-shaped leukocytes in the vasculature of the cerebral cortex was reduced by ~69% by the anti-CXCL1 and anti-CXCR2 antibodies in

mice exposed to PTX, but was reduced to a similar extent only by the anti-CXCR2 antibody in mice exposed to LPS (Figure 4a, b). In contrast, the number of round leukocytes was not affected by any treatment. To verify whether the lack of effect of the anti-CXCL1 antibody in LPS-treated mice was due to a compensatory effect of CXCL2 or the use of a suboptimal dose of anti-CXCL1 antibody, we repeated the analysis with LPS-challenged mice pre-treated with either a combination of anti-CXCL1 and anti-CXCL2 antibodies (both at 4 mg/kg) or a higher dose of anti-CXCL1 antibody (20 mg/kg). We observed a reduction in the recruitment of rod-shape leukocytes only with the latter treatment (Figure 4c), suggesting that LPS induces a higher increase in CXCL1 than PTX and that a higher dose of anti-CXCL1 antibody is required for effective pharmacological blockade. This is supported by the observation that increased serum levels of CXCL1 were detected by ELISA in LPS-treated mice, but not in PTX-treated mice (LPS, 1.3 ng/ml; PTX, 0.40 ng/ml; PBS, 0.33 ng/ml; ANOVA, $P = 0.019$). Finally, to exclude a possible effect of the antibodies on the circulating pool of granulocytes, we analyzed blood samples collected at the time of sacrifice by flow cytometry. No significant difference in the number of $CD45^{+7/4^{+}}Ly6G^{+}CD115^{-}$ cells was found among the animals that received the different antibodies (data not shown; ANOVA, $P = 0.5$), suggesting that the anti-CXCL1 and anti-CXCR2 antibodies blocked the adhesion of granulocytes, but not their mobilization or survival.

To assess whether CXCL1 contributes to EAE development by promoting granulocyte recruitment, we injected mice once daily with 4 mg/kg anti-CXCL1 antibody from day 7 to day 13 after EAE induction by active immunization. Blind evaluation of the clinical symptoms revealed a reduction in EAE severity in these mice compared to sham-treated animals (Figure 5a). All the mice were killed 4 h after the last injection to collect their brains for histological analyses. Because the populations of intravascular rod-shaped leukocytes found in the brains of EAE mice comprises not only granulocytes but also T lymphocytes [17], we distinguished these cells by using antibodies against the granulocyte marker Ly6G and the T cell marker CD3 (Figure 5b). Stereological cell counts showed a 38% reduction in the number of $Ly6G^{+}$ rod-shaped cells, but no significant change regarding the subpopulation of $CD3^{+}$ rod-shaped cells (Figure 5c) or the total population of $CD3^{+}$ cells (isotype antibody, $875 \pm 183/mm^3$; anti-CXCL1 antibody, $971 \pm 193/mm^3$).

Also reduced was the population of Ly6G⁺ rounded granulocytes (Figure 5c), which was > 4 times greater than that found in mice treated with bacterial toxins and included not only intraluminal, but also intraparenchymal cells (Figure 5d). Overall, this last series of experiments demonstrates that CXCL1 plays an important role in different neuroinflammatory conditions by promoting granulocyte adhesion to the cerebral microvasculature.

3.6 : Discussion

As growing evidence suggests that granulocytes contribute to EAE and perhaps multiple sclerosis, there is high interest in understanding how these cells are recruited in the CNS. While the cytokines and adhesion molecules involved in this recruitment have started to be identified (e.g., IL-6, IL-1 β , TNF, ICAM1, Mac1) [17,21], the required chemokine was undetermined prior to the present study. Our results reveal that CXCL1 is a major CXCR2 ligand upregulated in cerebral endothelial cells at least by IL-6 in different inflammatory conditions. They also show that CXCL1 plays an essential, non-redundant role in the recruitment of granulocytes by promoting their adhesion to capillaries. Finally, and as discussed below, our results not only help to understand the mechanism of action of PTX and the importance of granulocytes in EAE, but provide a pre-clinical validation for the use of CXCL1 inhibitors for the treatment of neuroinflammatory disorders.

Mechanism of action of PTX

To induce EAE, the most studied animal model of multiple sclerosis, mice immunized with myelin antigens or transplanted with myelin-reactive T cells are commonly injected with PTX, a multimeric protein produced by the bacteria causing whooping cough and used as an adjuvant to increase EAE incidence and severity [31,41]. The mechanism by which PTX promotes EAE is still not fully understood and seems paradoxical considering its ability to block leukocyte migration by interfering with G protein-coupled receptor signaling [42]. We have recently published evidence that PTX increases endothelial adhesiveness indirectly through circulating mediators such as IL-6 [17]. The latter induces ICAM1 expression in brain capillaries by acting post-transcriptionally, leading to the recruitment of leukocytes capable of patrolling the cerebrospinal vasculature by crawling on its luminal surface. As illustrated in Figure 6, the present study extends this concept by demonstrating that IL-6 is also responsible for the upregulation of a chemokine that promotes granulocyte adhesion and EAE development, this time by acting transcriptionally. To complete our model, it will now be interesting to identify the chemoattractant that informs granulocytes on where to penetrate the CNS

parenchyma, as well as to delineate the mechanism sensing PTX and initiating this entire inflammatory cascade.

Importance of granulocytes and the CXCL1–CXCR2 axis in EAE

Although a beneficial role of CXCL1 and granulocytes may be drawn from a study showing that forced overexpression of CXCL1 in astrocytes decreases the severity of EAE [43], many studies in which CXCR2 was neutralized or granulocytes were depleted actually suggest the opposite [12,18-20]. In agreement with the latter studies, we show here that the number of adherent granulocytes and the severity of EAE were reduced in mice treated with an anti-CXCL1 antibody during the effector phase of the disease, suggesting that CXCL1 significantly contributes to EAE by promoting granulocyte recruitment. As recently reviewed [44], granulocytes may play different roles in EAE, such as the secretion of immunoregulatory molecules that would sustain the activity/ recruitment of other immune cells and the execution of effector functions that would damage the myelin sheath. It will be important in future work to test these possibilities, but this will require the development of new granulocyte-specific genetic mouse models.

CXCL1 as a potential therapeutic target

Genetic deletion or pharmacological blockade of CXCR2 has been shown to inhibit EAE [12,19,20]. Considering that CXCR2 can bind to several ligands, one can predict that blocking this receptor would be less specific and more immunocompromising than blocking CXCL1. It may thus be advantageous to develop CXCL1 inhibitors that would allow the action of the other CXCR2 ligands, which might be significantly produced under various conditions. The present study supports the latter approach by showing that an anti-CXCL1 antibody can improve the clinical symptoms of EAE, although the improvement we observed was lower than that obtained in other laboratories by targeting CXCR2 [12,19]. Different reasons might explain the lower effectiveness of our anti-CXCL1 treatment, such as the use of a non-optimal dose or frequency of injection, and a loss of activity over time due to the establishment of an anti-drug immune response. Developmental research should be considered to optimize the therapeutic use of anti-CXCL1 antibodies and to determine whether other anti- CXCL1 inhibitors could be

advantageous. Furthermore, the importance of examining whether blocking CXCL1 would be safe in the long term and efficient in all types of EAE and multiple sclerosis is underscored by the observations that CXCL1 influences the biology of myelinating cells [45-48] and that both CXCL1 expression and neutrophil infiltration are higher during Th17 cell-mediated EAE compared to Th1 cell-mediated EAE [12,13].

3.7 : Conclusion

This study highlights the importance of the CXCL1- CXCR2 axis in the recruitment of granulocytes at the blood-brain interface and in the development of EAE. The challenges are now to determine whether other CXCR2 ligands exert a significant influence on these processes despite lower expression levels, to elucidate the precise functions of granulocytes in demyelinating diseases, and to translate this knowledge into new therapeutic strategies for multiple sclerosis.

3.8 : Acknowledgements

This work was supported by grants from the Multiple Sclerosis Society of Canada (MSSC) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). LV received a *Chercheur-Boursier Sénior* award from the *Fonds de la Recherche en Santé du Québec*. MR and JFR received doctoral fellowships from the NSERC and MSSC.

We thank Pierrot Tremblay, Marie-Josée Beaudet, and Nadia Fortin for technical assistance.

3.9 : References

1. Goverman J: Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat Rev Immunol* 2009, **9**:393-407.
2. King IL, Dickendesher TL, Segal BM: Circulating Ly-6C⁺ myeloid precursors migrate to the CNS and play a pathogenic role during autoimmune demyelinating disease. *Blood* 2009, **113**:3190-3197.
3. Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R, et al: Dendritic cells in multiple sclerosis lesions: maturation stage, myelin uptake, and interaction with proliferating T cells. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006, **65**:124-141.
4. Fischer HG, Reichmann G: Brain dendritic cells and macrophages/microglia in central nervous system inflammation. *J Immunol* 2001, **166**:2717-2726.
5. Serafini B, Columba-Cabezas S, Di Rosa F, Aloisi F: Intracerebral recruitment and maturation of dendritic cells in the onset and progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol* 2000, **157**:1991-2002.
6. Tran EH, Hoekstra K, van Rooijen N, Dijkstra CD, Owens T: Immune invasion of the central nervous system parenchyma and experimental allergic encephalomyelitis, but not leukocyte extravasation from blood, are prevented in macrophage-depleted mice. *J Immunol* 1998, **161**:3767-3775.
7. Heppner FL, Greter M, Marino D, et al: Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis. *Nat Med* 2005, **11**:146-152.
8. Maatta JA, Sjöholm UR, Nygardas PT, Salmi AA, Hinkkanen AE: Neutrophils secreting tumor necrosis factor alpha infiltrate the central nervous system of BALB/c mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 1998, **90**:162-175.
9. Reiserer BS, Miller GT, Happ MP, Kasaian MT: Treatment of murine experimental autoimmune encephalomyelitis with a myelin basic protein peptide analog alters the cellular composition of leukocytes infiltrating the cerebrospinal fluid. *J Neuroimmunol* 1998, **91**:156-170.
10. Tran EH, Prince EN, Owens T: IFN-gamma shapes immune invasion of the central nervous system via regulation of chemokines. *J Immunol* 2000, **164**:2759-2768.
11. Reddy J, Waldner H, Zhang X, et al: Cutting edge: CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells contribute to gender differences in susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2005, **175**:5591-5595.
12. Carlson T, Kroenke M, Rao P, Lane TE, Segal B: The Th17-ELR⁺ CXC chemokine pathway is essential for the development of central nervous system autoimmune disease. *J Exp Med* 2008, **205**:811-823.
13. Kroenke MA, Carlson TJ, Andjelkovic AV, Segal BM: IL-12- and IL-23-modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile, and response to cytokine inhibition. *J Exp Med* 2008, **205**:1535-1541.
14. Soulika AM, Lee E, McCauley E, Miers L, Bannerman P, Pleasure D: Initiation and progression of axonopathy in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci* 2009, **29**:14965-14979.
15. Wu F, Cao W, Yang Y, Liu A: Extensive infiltration of neutrophils in the acute

- phase of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Histochem Cell Biol* 2010, **133**:313-322.
16. Kang Z, Altuntas CZ, Gulen MF, et al: Astrocyte-restricted ablation of interleukin-17-induced Act1-mediated signaling ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *Immunity* 2010, **32**:414-425.
 17. Richard JF, Roy M, Audoy-Remus J, Tremblay P, Vallieres L: Crawling phagocytes recruited in the brain vasculature after pertussis toxin exposure through IL6, ICAM1, and ITGaM. *Brain Pathol* 2011, **21**:661-671.
 18. McColl SR, Staykova MA, Wozniak A, Fordham S, Bruce J, Willenborg DO: Treatment with anti-granulocyte antibodies inhibits the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 1998, **161**:6421-6426.
 19. Kerstetter AE, Padovani-Claudio DA, Bai L, Miller RH: Inhibition of CXCR2 signaling promotes recovery in models of multiple sclerosis. *Exp Neurol* 2009, **220**:44-56.
 20. Liu L, Darnall L, Hu T, Choi K, Lane TE, Ransohoff RM: Myelin repair is accelerated by inactivating CXCR2 on nonhematopoietic cells. *J Neurosci* 2010, **30**:9074-9083.
 21. Audoy-Remus J, Richard JF, Soulet D, Zhou H, Kubes P, Vallieres L: Rod- Shaped monocytes patrol the brain vasculature and give rise to perivascular macrophages under the influence of proinflammatory cytokines and angiopoietin-2. *J Neurosci* 2008, **28**:10187-10199.
 22. Vallieres L, Sawchenko PE: Bone marrow-derived cells that populate the adult mouse brain preserve their hematopoietic identity. *J Neurosci* 2003, **23**:5197-5207.
 23. Borregaard N: Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 2010, **33**:657-670.
 24. Zhou H, Andonegui G, Wong CH, Kubes P: Role of endothelial TLR4 for neutrophil recruitment into central nervous system microvessels in systemic inflammation. *J Immunol* 2009, **183**:5244-5250.
 25. Kielian T, Barry B, Hickey WF: CXC chemokine receptor-2 ligands are required for neutrophil-mediated host defense in experimental brain abscesses. *J Immunol* 2001, **166**:4634-4643.
 26. Rossi D, Zlotnik A: The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 2000, **18**:217-242.
 27. Rossi DL, Hurst SD, Xu Y, et al: Lungkine, a novel CXC chemokine, specifically expressed by lung bronchoepithelial cells. *J Immunol* 1999, **162**:5490-5497.
 28. Godiska R, Chantry D, Dietsch GN, Gray PW: Chemokine expression in murine experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 1995, **58**:167-176.
 29. Glabinski AR, Tani M, Strieter RM, Tuohy VK, Ransohoff RM: Synchronous synthesis of alpha- and beta-chemokines by cells of diverse lineage in the central nervous system of mice with relapses of chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol* 1997, **150**:617-630.
 30. Glabinski AR, Tuohy VK, Ransohoff RM: Expression of chemokines RANTES, MIP-1alpha and GRO-alpha correlates with inflammation in acute experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroimmunomodulation* 1998, **5**:166-171.
 31. Stromnes IM, Goverman JM: Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc* 2006, **1**:1810-1819.
 32. Gijbels K, Brocke S, Abrams JS, Steinman L: Administration of neutralizing antibodies to interleukin-6 (IL-6) reduces experimental autoimmune

- encephalomyelitis and is associated with elevated levels of IL-6 bioactivity in central nervous system and circulation. *Mol Med* 1995, **1**:795-805.
33. Samoilova EB, Horton JL, Hilliard B, Liu TS, Chen Y: IL-6-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: roles of IL-6 in the activation and differentiation of autoreactive T cells. *J Immunol* 1998, **161**:6480-6486.
 34. Okuda Y, Sakoda S, Bernard CC, et al: IL-6-deficient mice are resistant to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis provoked by myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Int Immunol* 1998, **10**:703-708.
 35. Eugster HP, Frei K, Kopf M, Lassmann H, Fontana A: IL-6-deficient mice resist myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 1998, **28**:2178-2187.
 36. Okuda Y, Sakoda S, Fujimura H, Saeki Y, Kishimoto T, Yanagihara T: IL-6 plays a crucial role in the induction phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein 35-55 induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 1999, **101**:188-196.
 37. Luu-The V, Paquet N, Calvo E, Cumps J: Improved real-time RT-PCR method for high-throughput measurements using second derivative calculation and double correction. *Biotechniques* 2005, **38**:287-293.
 38. Villeneuve J, Tremblay P, Vallieres L: Tumor necrosis factor reduces brain tumor growth by enhancing macrophage recruitment and microcyst formation. *Cancer Res* 2005, **65**:3928-3936.
 39. Bouchard C, Page J, Bedard A, Tremblay P, Vallieres L: G protein-coupled receptor 84, a microglia-associated protein expressed in neuroinflammatory conditions. *Glia* 2007, **55**:790-800.
 40. Starr R, Willson TA, Viney EM, et al: A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 1997, **387**:917-921.
 41. Stromnes IM, Goverman JM: Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc* 2006, **1**:1952-1960.
 42. Carbonetti NH: Pertussis toxin and adenylate cyclase toxin: key virulence factors of *Bordetella pertussis* and cell biology tools. *Future Microbiol* 2010, **5**:455-469.
 43. Omari KM, Lutz SE, Santambrogio L, Lira SA, Raine CS: Neuroprotection and remyelination after autoimmune demyelination in mice that inducibly overexpress CXCL1. *Am J Pathol* 2009, **174**:164-176.
 44. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S: Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2011, **11**:519-531.
 45. Robinson S, Tani M, Strieter RM, Ransohoff RM, Miller RH: The chemokine growth-regulated oncogene-alpha promotes spinal cord oligodendrocyte precursor proliferation. *J Neurosci* 1998, **18**:10457-10463.
 46. Tsai HH, Frost E, To V, et al: The chemokine receptor CXCR2 controls positioning of oligodendrocyte precursors in developing spinal cord by arresting their migration. *Cell* 2002, **110**:373-383.
 47. Filipovic R, Zecevic N: The effect of CXCL1 on human fetal oligodendrocyte progenitor cells. *Glia* 2008, **56**:1-15.
 48. Hosking MP, Tirota E, Ransohoff RM, Lane TE: CXCR2 signaling protects

oligodendrocytes and restricts demyelination in a mouse model of viral-induced demyelination. *PLoS One* 2010, **5**:e11340.

3.10 : *Figure legends*

Figure 1. *Upregulation of CXCR2 ligands in the brain after exposure to bacterial toxins.*

a, Quantification of the mRNAs encoding each of the CXCR2 ligands by quantitative RT-PCR using RNA samples prepared from the brains of mice killed 6 h after intraperitoneal injection of PBS, PTX (20 µg/kg), or LPS (1 mg/kg). The means were compared with the Kruskal-Wallis test (*P*-values as indicated) followed by *post hoc* Wilcoxon tests. For the weakly expressed genes, the means are indicated in parentheses. *Significantly different from the PBS group. Δ = fold change relative to PBS. *n* = 5 per group. **b**, Dark-field micrographs showing *in situ* hybridization signals for CXCL1 or CXCL2 mRNA in the cerebral cortex of mice treated with PTX or LPS. No signal was detected in control mice (PBS). Arrows show clusters of emulsion grains indicating the presence of cells expressing the transcripts. Scale bar = 100 µm. **c**, Double labeling for CXCL1 mRNA (black grains, *in situ* hybridization) and different cell type-specific markers (red-brown, immunohistochemistry) in brain sections from PTX-treated mice. Arrows indicate double labeled cells. Arrowheads show examples of immunostained cell bodies negative for CXCL1 mRNA. *Blood vessel lumen. Scale bar = 10 µm.

Figure 2. *Upregulation of CXCR2 ligands in the brain and spinal cord during EAE.* **a**, Quantification of the mRNAs encoding each of the CXCR2 ligands by quantitative RT-PCR using RNA samples prepared from the brains or spinal cords of mice killed at the indicated time intervals after EAE induction (as shown in Additional file 1: Figure S1, the first clinical symptoms were observed on day 8). The means were compared with the Kruskal-Wallis test (*P*-values as indicated) followed by *post hoc* Wilcoxon tests. *Significantly different from day 3. Δ = fold change relative to day 3. *n* = 6 (days 3, 6, and 10), 5 (day 8), or 3 (day 12). **b**, Dark-field and bright-field micrographs showing *in situ* hybridization signals for CXCL1, CXCL2, or CXCL5 mRNA in the leptomeninges of EAE mice killed 6 days after EAE induction. Arrows show clusters of emulsion grains indicating the presence of cells expressing the transcripts. Scale bar = 50 µm. **c**, Double labeling for

CXCL1 mRNA (black grains, *in situ* hybridization) and different cell type-specific markers (red-brown, immunohistochemistry) in brain sections from EAE mice. These images were taken at the level of the leptomeninges. Arrows indicate double-labeled cells. Arrowheads show examples of immunostained cell bodies negative for CXCL1 mRNA. Scale bar = 10 μ m.

Figure 3. Regulation of CXCL1 expression by IL-6 in cerebral endothelial cells *in vivo* and *in vitro*. **a**, Dark-field micrographs of brain sections collected from IL-6 knockout and wild-type mice killed 6 h after intraperitoneal injection of PTX (20 μ g/kg) and analyzed for CXCL1 mRNA by *in situ* hybridization. Positively labeled cells (arrows) are seen only in the wild-type mouse (representative of 6 mice per genotype). Scale bar = 50 μ m. **b**, Quantification of CXCL1 expression by quantitative RT-PCR or ELISA in cultures of bEnd.3 cerebral endothelial cells exposed for 3 h to IL-6 (10 ng/ml), soluble IL-6 receptor (IL-6R α , 1 μ g/ml), and/or neutralizing anti-IL-6 antibody (40 μ g/ml). SOCS3 and ICAM1 mRNAs were used as a positive or negative control, respectively. The PCR data were compared with the Kruskal-Wallis test (P-values as indicated) followed by post hoc Wilcoxon tests. The ELISA data were compared using ANOVA (P-value as indicated) followed by post hoc Student's t tests. The ELISA data were compared using ANOVA (P-value as indicated) followed by *post hoc* Student's t tests. *Significantly different from the control group. n = 6 per condition.

Figure 4. Contribution of the CXCL1–CXCR2 axis to leukocyte adhesion within the cerebral vasculature in response to bacterial toxins. **a**, Micrographs of intravascular leukocytes (arrows) with a rod-shaped or rounded morphology in mouse brain sections stained for CD45 by immunohistochemistry. Arrowheads = microglial processes. Scale bar = 5 μ m. **b**, Counts of CD45⁺ intravascular leukocytes (rod-shaped and round) in the cerebral cortex of mice treated with anti-CXCL1, anti-CXCR2, or isotype antibody (4 mg/kg), and killed 6 h after intraperitoneal injection of PBS, PTX (20 μ g/kg), or LPS (1 mg/kg). The means were compared using ANOVA (P-values as indicated) followed by *post hoc* Student's t tests. *Significantly different from the corresponding isotype group. n = 6–10 per group. **c**, Data from an experiment similar to the one shown in **b**, except that LPS-

challenged mice received a higher dose of anti-CXCL1 antibody (20 mg/kg instead of 4 mg/kg) or a combination of anti-CXCL1 and anti-CXCL2 antibodies (4 mg/kg each). $n = 7$ per group.

Figure 5. *Contribution of CXCL1 to the development of EAE.* **a**, Clinical scores of EAE mice injected intravenously once daily from day 7 with 4 mg/kg anti-CXCL1 antibody or isotypic control antibody. The means were compared by multivariate ANOVA with repeated measures (P -value as indicated) followed by *post hoc* Student's t tests. *Significantly different from the isotype group. $n = 9-11$ per group. **b**, Micrographs of different subsets of leukocytes stained for Ly6G or CD3 by immunohistochemistry in brain sections from mice killed 13 days after EAE induction. Scale bar = 5 μm . **c**, Counts of leukocytes in the cerebral cortex of EAE mice treated or not with anti-CXCL1 antibody and killed at day 13. The means were compared using the Student's t test. *Significantly different from the isotype group. $n = 9-11$ per group. **d**, Micrographs of granulocytes located inside (arrows) or outside (arrowheads) brain capillaries in a EAE mouse. Black = Ly6G immunoperoxidase staining using nickel-DAB as a substrate. Red-brown = CD31 immunoperoxidase staining using DAB as a substrate. Scale bar = 10 μm .

Figure 6. *Mechanism of granulocyte recruitment at the blood-brain interface during PTX exposure.* The present results, together with those from a previous study [17], allow us to propose the following mechanism: 1) PTX induces IL-6 expression in peripheral cells through a receptor that remains to be identified; 2) IL-6 travels in the blood and stimulates CXCL1 expression in endothelial cells by acting transcriptionally; 3) IL-6 also stimulates ICAM1 expression by acting post-transcriptionally and in synergy with a second mediator acting transcriptionally; 4) granulocytes are activated by the binding of CXCL1 to CXCR2 and adhere to the endothelium through interaction between Mac1 and ICAM1.

SUPPORTING INFORMATION

Additional file 1 may be found in the online version of this article at: <http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1742-2094-9-18-S1.TIFF>

Figure S1. Mean clinical scores of EAE mice used in the experiment shown in Figure 1 on the day of sacrifice. $n = 6$ (days 3, 6, and 10), 5 (day 8), or 3 (day 12).

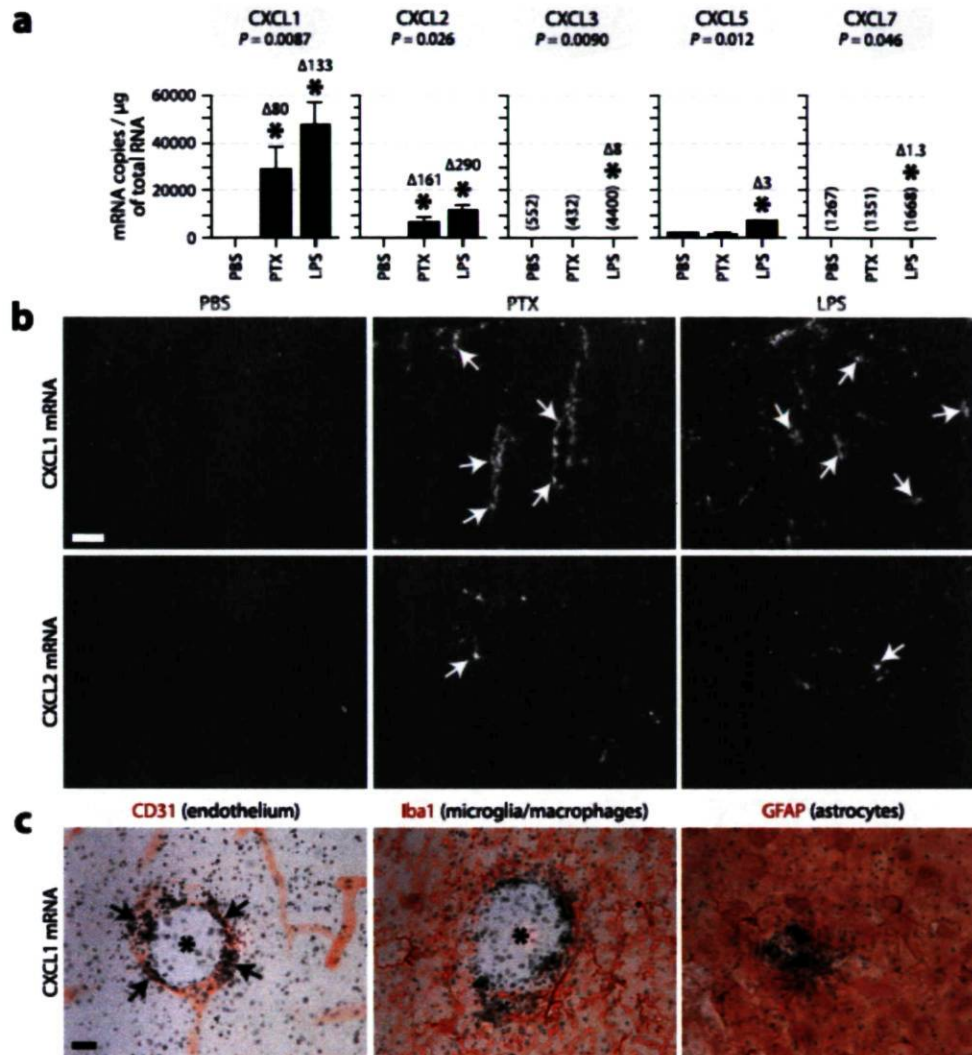


Figure 1 : *Upregulation of CXCR2 ligands in the brain after exposure to bacterial toxins.*

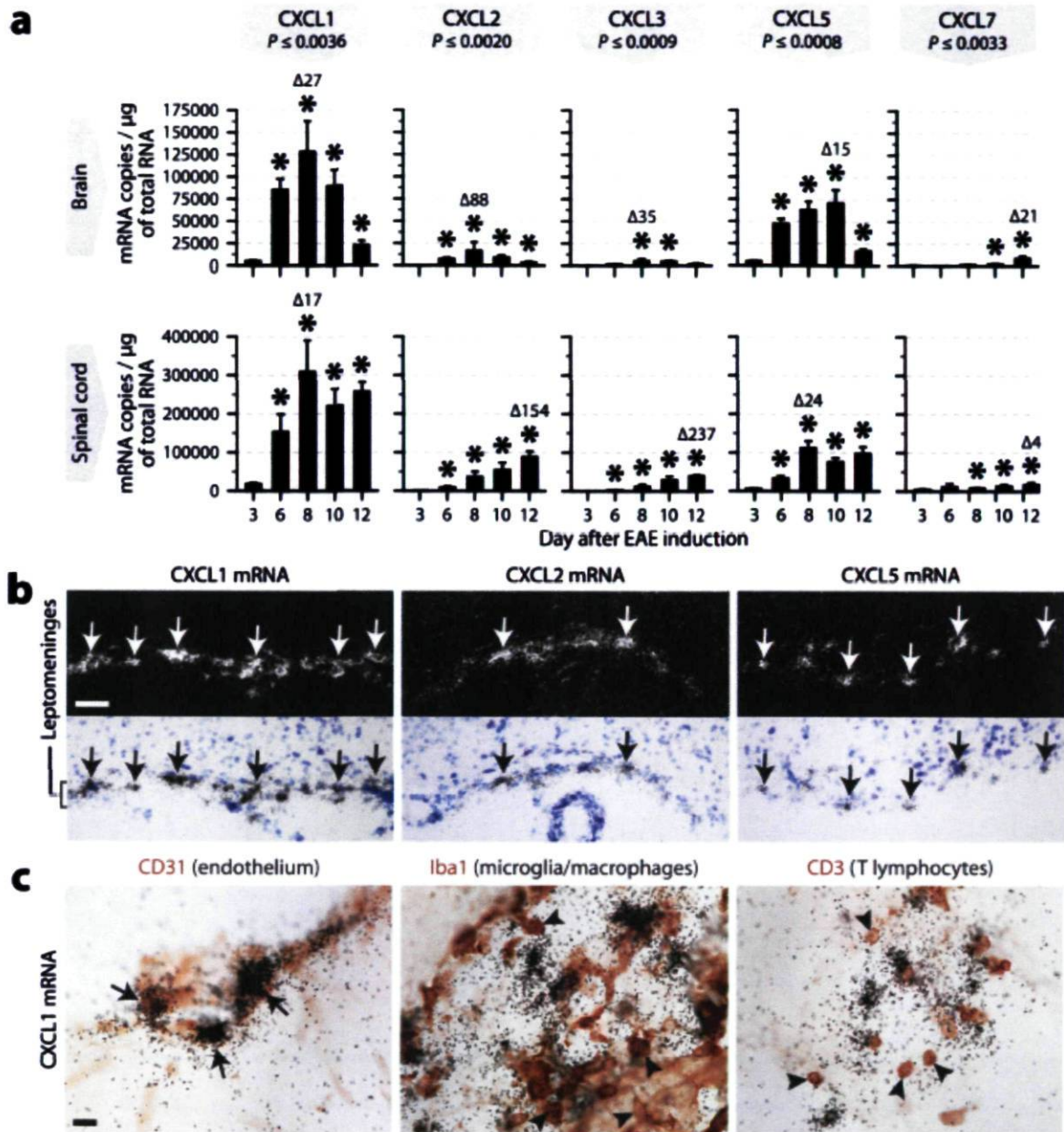


Figure 2 : Upregulation of CXCR2 ligands in the brain and spinal cord during EAE.

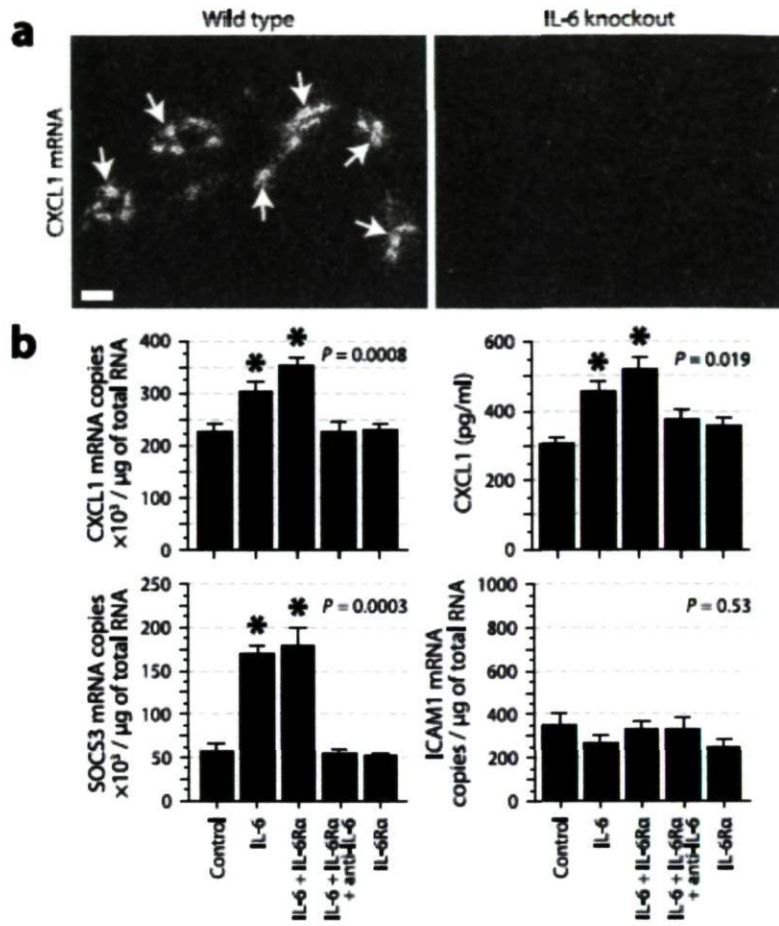


Figure 3 : Regulation of CXCL1 expression by IL-6 in cerebral endothelial cells in vivo and in vitro.

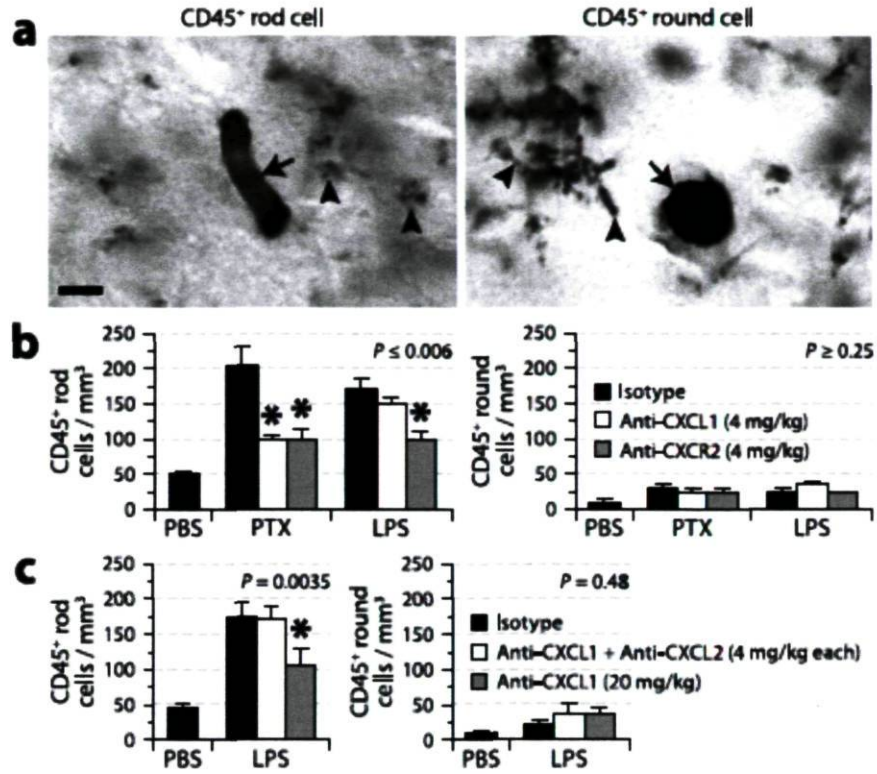


Figure 4 : *Contribution of the CXCL1–CXCR2 axis to leukocyte adhesion within the cerebral vasculature in response to bacterial toxins.*

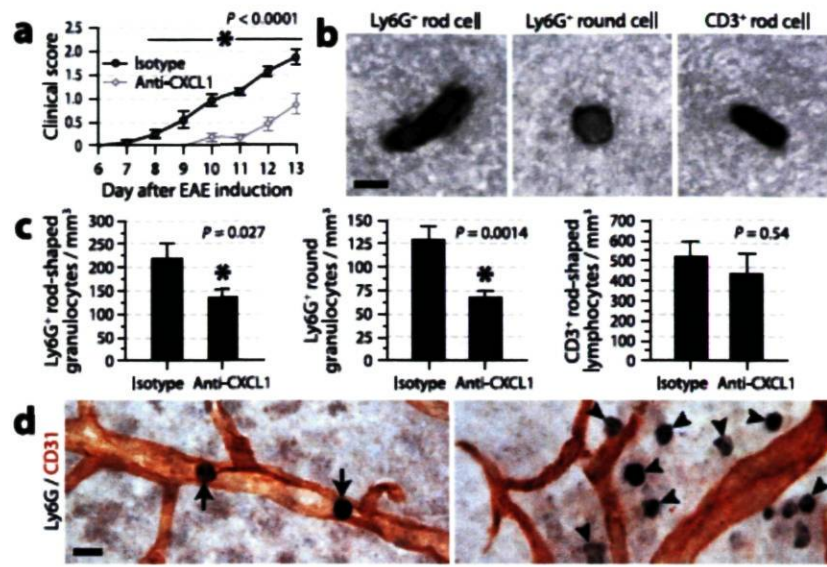


Figure 5 : Contribution of CXCL1 to the development of EAE.

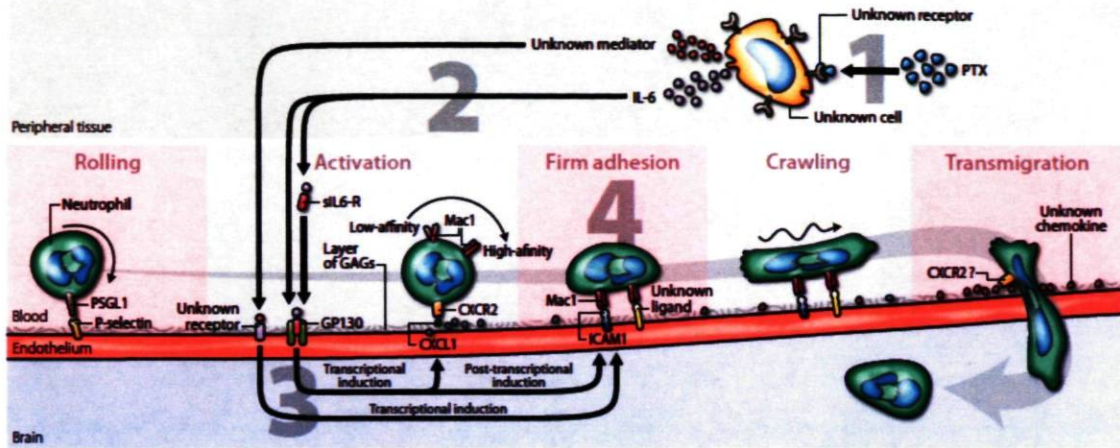


Figure 6 : *Mechanism of granulocyte recruitment at the blood-brain interface during PTX exposure.*

Chapitre 4 : Discussion et conclusion

Les causes menant au développement des maladies auto-immunes, telles que la SEP, sont encore aujourd'hui un mystère. L'une des rares certitudes, que nous avons au sujet de cette maladie est la participation de l'inflammation [6]. Par contre, même à ce niveau, beaucoup de connaissances demeurent à acquérir. En effet, le mécanisme d'initiation du processus inflammatoire ainsi que l'influence de l'environnement sur de ce dernier sont encore méconnus. La continuité des recherches est donc nécessaire à différents niveaux, soit tout d'abord, pour élucider la cause de la maladie, c'est-à-dire découvrir ce qui déclenche une telle inflammation, puis pour comprendre comment cette dernière progresse afin d'identifier des cibles thérapeutiques efficaces. Dans cette thèse de doctorat, nous avons donc voulu contribuer à mieux comprendre la mise en place de cette dite inflammation. À cette fin, nous avons étudié le mécanisme de recrutement des leucocytes bâtonnets, population principalement composée de granulocytes, sous notamment l'influence de la PTX et durant l'EAE. Les résultats obtenus ont non seulement amélioré notre compréhension de ce mécanisme de recrutement, mais ils ont aussi ajouté des informations sur le mode d'action de la PTX, lesquelles suggèrent l'importance de l'apport environnemental dans l'EAE. Finalement, ils ont mis en lumière l'importance d'effectuer de futures expérimentations sur le rôle potentiel des granulocytes dans la SEP.

À ce jour, aucune étude n'a démontré que la génétique peut, à elle seule, être responsable de la SEP. L'environnement joue donc également un rôle crucial dans l'étiologie de cette maladie. Les deux principales causes environnementales suspectées d'être impliquées sont l'ensoleillement et l'infection [47, 67]. Dans le cadre de cette recherche, nous nous sommes plutôt intéressé au deuxième candidat. En effet, nous croyons qu'un système immunitaire déjà stimulé par un signal d'alarme, tel qu'une infection, a plus de chance de déclencher un recrutement non nécessaire de cellules inflammatoires dans certains organes créant ainsi d'importants dommages à ces derniers. Dans l'EAE, la PTX potentialise la maladie et substitue cette infection. La mise en lumière de son mode d'action est donc idéale pour étudier l'influence environnementale d'une infection dans la maladie d'intérêt. C'est pourquoi, dans cette recherche, le LPS a surtout été utilisé à titre comparatif.

Tel que mentionné précédemment, le mécanisme d'action de la PTX dans l'EAE est encore méconnu. Lors d'études précédentes, il a été démontré que la PTX peut accentuer le recrutement de leucocytes dans le SNC. Pour y arriver, non seulement elle peut augmenter la perméabilité de la BHE, mais aussi favoriser l'interaction des leucocytes avec l'endothélium via l'augmentation de l'expression de la sélectine-P [99, 100]. Dans le cadre de ce travail, nous avons établi que son rôle ne s'arrête pas là, puisque nous avons mis en lumière que la PTX influence également l'adhésion forte des leucocytes, via l'expression de gènes importants pour celle-ci (chimiokines et molécules liant les intégrines) et que c'est par le déclenchement préalable d'un contexte pro-inflammatoire qu'elle médie cette action. Cette dernière information est de la première importance et peut expliquer comment une toxine, telle que la PTX, connue pour inhiber la signalisation des protéines G, peut induire le recrutement de granulocytes via une chimiokine telle que CXCL1. Ainsi, nous démontrons que l'apport environnemental, qui ici correspond à une infection mimée par la PTX, peut influencer l'expression de certains gènes et mener au recrutement de leucocytes dans le cerveau et ultimement au développement de l'EAE. En effet, en plus d'être importants dans l'adhésion leucocytaire, il a été démontré que les gènes influencés par la PTX sont exprimés et/ou jouent un rôle dans l'EAE [119, 428, 429, 447]. Alors, selon nos résultats, continuer d'étudier le mode d'action de la PTX dans l'inflammation du SNC pourrait apporter des informations supplémentaires permettant de mieux comprendre l'EAE et la SEP. Les différentes options qui peuvent être explorées sont d'étudier comment la PTX influence la suite du recrutement des leucocytes, c'est-à-dire quelle action elle peut avoir sur la régulation de gènes importants dans la transmigration, ou encore découvrir comment elle initie la mise en place du contexte inflammatoire. Concernant ce dernier point, élucider d'où provient cette IL-6 serait une idée intéressante à approfondir.

De plus en plus d'études tendent à démontrer que les granulocytes pourraient jouer un rôle important dans l'EAE et ultimement dans la SEP [74, 78, 119, 120, 498]. Alors, la compréhension de leur mécanisme de recrutement pourrait non seulement contribuer à développer des cibles thérapeutiques efficaces, mais également aider à caractériser leur fonctions exactes dans ces pathologies. C'est donc pour ces raisons que nous avons voulu caractériser leur mécanisme de recrutement, et plus précisément étudier l'étape de l'adhésion forte de ces cellules dans le cerveau en réponse à la PTX et dans l'EAE. Selon le

mécanisme général de recrutement des leucocytes, l'adhésion forte est possible grâce à l'interaction d'une intégrine, exprimée sur le leucocyte, avec son ligand, une molécule d'adhésion exprimée sur l'endothélium. Il existe deux principales molécules d'adhésion connues pour jouer ce rôle (ICAM-1 et VCAM-1) ainsi que quatre intégrines ($\alpha4\beta1$, $\alpha4\beta7$, $\alphaL\beta2$ et $\alphaM\beta2$) [123]. Par contre, d'autres molécules d'adhésion telles que MadCAM-1, qui lie préférentiellement $\alpha4\beta7$, peut également être importante dans le recrutement des lymphocytes et impliquée dans le développement de maladie telles que l'EAE [499]. Alors, la nature du leucocyte a une influence sur l'identité de l'intégrine impliquée. Alors, étant donné que les leucocytes bâtonnets sont principalement des granulocytes, il était logique de supposer que la principale intégrine responsable de l'adhésion des granulocytes, $\alphaM\beta2$, via sa liaison avec ICAM-1, est responsable de l'adhésion des leucocytes bâtonnets en réponse à la PTX. Par contre, tel que mentionné précédemment, les notions acquises en périphérie ne sont pas nécessairement transposables au SNC. Donc, afin de s'assurer d'acquérir le maximum d'informations quant aux intégrines et leur ligand dans l'adhésion des leucocytes bâtonnets, nous avons voulu déterminer quelle était l'implication réelle de chaque candidat potentiel. Pour ce faire, nous devons étudier l'expression des deux ligands et le rôle des quatre intégrines en réponse à la PTX. Concernant l'expression des molécules sur l'endothélium, nos résultats ont démontré que contrairement à VCAM-1, ICAM-1 pouvait également être exprimée sur les petits vaisseaux cérébraux. Cette expression différentielle est très intéressante, puisque c'est dans les capillaires que les leucocytes bâtonnets sont retrouvés [92]. Il est également intéressant de noter que dans l'EAE, ICAM-1 est aussi exprimée sur les petits vaisseaux cérébraux juste un peu avant le début de la maladie, moment qui précède l'infiltration massive des neutrophiles, alors que VCAM-1 montre cette expression un peu après l'apparition des signes cliniques [74, 187].

Considérant ce résultat, nous nous sommes concentré sur la régulation d'ICAM-1 en réponse à la PTX. Les principales cytokines connues pour réguler l'expression de cette molécule sont l'IL-1 β , le TNF et l'IFN- γ [384, 389]. Toutefois, telle que présenté dans le chapitre 2, dans le laboratoire, il a été démontré qu'aucune expression de ces cytokines n'est augmentée dans le cerveau en réponse à la PTX. En effet, l'IL-6 est la seule cytokine étudiée qui est régulée par la PTX et son absence diminue grandement le recrutement des

leucocytes bâtonnets [497]. Alors, nous avons voulu savoir si cette cytokine joue son rôle en contrôlant, entre autre, l'expression d'ICAM-1. Au niveau transcriptionnel, l'IL-6 n'est pas le médiateur inflammatoire impliqué dans la régulation d'ICAM-1. Par contre, elle est bien importante dans la traduction de cette molécule d'adhésion. Ce résultat est très intéressant, car bien que la régulation de l'ARNm peut apporter des informations très importantes, d'un point de vue physiologique, c'est la protéine qui joue le rôle de se lier avec l'intégrine, soit le rôle qui nous intéresse dans la présente recherche. Toutefois, il serait pertinent de trouver quel médiateur inflammatoire régule la transcription afin d'éclaircir le mécanisme d'action de la PTX au complet. De plus, tel que mentionné, l'IL-6 n'est pas connue comme l'un des principaux régulateurs d'ICAM-1. En effet, très peu d'études ont démontré un tel effet [500-502]. Il y a même une étude *in vitro* qui a fait la preuve que, dans les astrocytes et les microglies en culture, l'IL-6 empêche l'induction de l'expression d'ICAM-1 par d'autres cytokines (TNF, IL-1 β ou IFN- γ) [502]. Nos résultats apportent donc des connaissances de premier ordre sur la régulation d'ICAM-1 dans le cerveau *in vivo* et démontre bien l'importance des études *in vivo* pour arriver à bien comprendre un système donné.

Par la suite, grâce à l'utilisation d'anticorps neutralisants pour chacune des sous-unités α et β des quatre intégrines importantes dans l'adhésion des leucocytes ainsi que celles d'animaux déficients pour ICAM-1, nous avons validé qu' α M β 2 et ICAM-1 sont bien importantes dans l'adhésion des granulocytes à la vasculature cérébrale en réponse à la PTX. Par contre, l'importance de ces deux molécules n'est pas entièrement la même. En effet, α M β 2 semble être la seule intégrine responsable de l'adhésion des granulocytes dans le cerveau sous l'effet de la PTX, puisque chez les animaux où α M est neutralisée, le nombre de leucocytes bâtonnets adhérents dans le cerveau est aussi bas que chez les souris contrôles. Alors que, chez les animaux déficients pour ICAM-1, la baisse du recrutement n'est que partielle. De plus, étant donné que ce résultat a été généré à partir de souris ICAM-1^{-/-}, il n'est pas possible que l'incapacité à bloquer complètement l'adhésion soit due à une activité résiduelle d'ICAM-1, tel que cela aurait pu être le cas avec un anticorps neutralisant. Alors, en réponse à la PTX, un autre ligand d' α M β 2 semble coopérer avec ICAM-1. En périphérie, une telle complicité a déjà été démontrée avec RAGE [377]. Nous

avons donc voulu savoir si cette coopération peut également exister dans le cerveau sous la condition à l'étude. Les résultats obtenus supportent encore une fois l'importance d'étudier chaque système pour mieux comprendre le recrutement des leucocytes, car dans le cerveau, RAGE n'est pas exprimée en réponse à la PTX ou au LPS (annexe II). L'implication de d'autres ligands d' α M β 2 demeure donc à investiguer. Outre RAGE et ICAM-1, de nombreux autres ligands d' α M β 2 sont connus. Parmi les candidats potentiels on retrouve ICAM-2 [381, 503]. En effet, tout comme ICAM-1, cette molécule d'adhésion est connue comme pouvant être exprimée sur l'endothélium et, bien qu'elle ait longtemps été reconnue comme peu régulée [504], il a été démontré que certaines souches de bactéries, telles que la souche *GeHo* de la *Borrelia*, peuvent augmenter son expression [505]. Alors, l'étude de l'expression d'ICAM-2 et éventuellement de son rôle en réponse à la PTX serait intéressante à réaliser. Si ICAM-2 n'est pas l'autre ligand d' α M β 2 pour l'adhésion des leucocytes bâtonnets, les héparanes sulfates pourraient alors être considérés. Cependant, étant donné que le groupe d'héparanes sulfates comprend plusieurs membres [506-508], il serait judicieux de commencer l'étude par l'utilisation d'une héparinase [509, 510]. En effet, ce type d'enzyme peut cliver les héparanes sulfates et ainsi empêcher toute liaison possible avec leurs récepteurs. Si un tel bris génère une baisse du recrutement des leucocytes bâtonnets, il serait ensuite possible de rechercher le meilleur candidat de ce groupe avec la même approche expérimentale utilisée dans ce doctorat.

L'étude fonctionnelle que nous avons effectuée, portant sur les intégrines et leurs ligands, a été réalisée uniquement au niveau de la PTX, car l'importance d' α M β 2 et d'ICAM-1 dans l'EAE était déjà connue. En effet, il a été établi que l'absence ou la neutralisation de l'une ou l'autre de ces molécules peut retarder ou diminuer la maladie [195, 447, 449, 455]. Par contre, d'un point de vue thérapeutique, on peut supposer que cibler ces molécules ne serait pas un outil stratégiquement parfait. En effet, leur absence ou la neutralisation peut affecter d'autres leucocytes tels que les lymphocytes T [428, 447, 455]. Alors, bloquer α M β 2 ou d'ICAM-1 dans l'EAE ne serait pas spécifique aux granulocytes et pourrait avoir des effets indésirables. De plus, par leur non spécificité pour les granulocytes, il ne nous est pas non plus possible de les utiliser pour étudier le rôle des granulocytes dans l'EAE. Également, dans un autre modèle animal de la SEP mentionné

précédemment, le virus de Theiler, l'expression d' α M β 2 et d'ICAM-1 est augmentée durant la maladie et la neutralisation d' α M β 2 augmente la capacité au virus de se répliquer, ce qui démontre bien le rôle important d'une telle intégrine dans la défense de l'organisme lors d'une infection [511, 512]. Toutes ces constatations peuvent mener à la question : quelle était l'intérêt d'identifier α M β 2 et ICAM-1 comme étant responsable de l'adhésion des granulocytes en réponse à la PTX si l'on ne peut les utiliser pour étudier le rôle des granulocytes ou pour développer des cibles thérapeutiques? En fait, tel que mentionné précédemment, les molécules impliquées dans le mécanisme de recrutement des leucocytes peuvent varier selon le type de leucocytes, le stimulus et le tissu. Alors, même si les leucocytes bâtonnets sont majoritairement des granulocytes, il s'avérait nécessaire de confirmer qu' α M β 2 est l'intégrine responsable de l'adhésion des leucocytes bâtonnets. En effet, s'il s'était avéré que ce soit une autre intégrine moins caractérisée dans l'EAE, on aurait pu l'utiliser aux fins mentionnées précédemment. De plus, son identification ainsi que celle d'ICAM-1 a permis d'identifier l'une des fonctions de l'IL-6, soit de réguler l'ICAM-1 uniquement au niveau post-transcriptionnel et aussi d'éclaircir le mode d'action de la PTX. Finalement, grâce à la mise en lumière de l'importance du rôle d' α M β 2 dans cette adhésion, nous avons démontré qu'elle peut interagir avec un ligand autre qu'ICAM-1 ou RAGE pour médier l'adhésion des granulocytes. La découverte de ce ligand pourrait donc s'avérer être important pour étudier le rôle de ces cellules dans l'EAE ou encore développer une cible thérapeutique, car celui-ci pourrait peut-être avoir une plus grande spécificité leucocytaire. De plus, si l'on se concentre davantage sur le mécanisme d'action de la PTX, on pourrait faire d'autres analyses avec cet autre ligand. Par exemple, on pourrait déterminer si en réponse à la PTX, ce ligand et/ou ICAM-1 influence la perméabilité de la BHE, tel que cela a déjà été démontré avec une autre molécule impliquée dans le recrutement des leucocytes, la sélectine-P [100]. Alors, bien qu'on ne peut directement utiliser α M β 2 ou ICAM-1 pour guérir ou mieux comprendre l'EAE et la SEP, leur identification permet d'orienter de futures recherches qui elles pourraient mener à ces développements. Il s'agit donc de contributions très importantes.

Concernant les chimiokines, nous avons justement voulu orienter nos travaux envers une molécule qui serait non seulement plus spécifique aux granulocytes, mais en plus

qu'elle ne bloquerait pas l'adhésion de toutes ces cellules. En effet, bien que récemment il a été démontré que le récepteur des chimiokines responsable de l'adhésion des granulocytes, CXCR2, est important dans le développement de l'EAE [119, 356], nous croyons que par l'importance des granulocytes dans la réponse immunitaire innée, cibler ce récepteur à des fins thérapeutiques pourrait avoir des conséquences indésirables importantes. C'est pourquoi nous avons émis l'hypothèse que bloquer uniquement l'une des chimiokines liant CXCR2 pourrait empêcher l'adhésion non désirable des granulocytes dans certaines circonstances sans toutefois compromettre leur recrutement dans d'autres situations ou par d'autres ligands de CXCR2 lorsque nécessaire. L'expression de CXCL1 et CXCL2 avait déjà été étudiée dans l'EAE et il avait été démontré qu'elle semble corrélérer avec les signes cliniques de la maladie [265, 266, 299, 300]. Pour notre part, l'étude de l'expression de tous les ligands murins de CXCR2, nous a démontré que CXCL1 est la candidate idéale pour être responsable de l'adhésion des granulocytes en réponse à la PTX et dans l'EAE. En effet, en plus d'être la chimiokine la plus exprimée dans ces conditions, elle est exprimée sur l'endothélium, ce qui concorde avec l'idée qu'elle est importante dans l'activation du leucocyte préalablement capturé. De plus, son expression temporelle aussi supporte son rôle dans l'adhésion des granulocytes. En effet, bien que celle-ci ait été analysée selon les jours post-immunisations et non en fonction du score des animaux, nous pouvons quand même suggérer qu'elle semble précéder un peu l'infiltration des granulocytes. En effet, son expression augmente significativement à partir du jour 6, moment où normalement nous n'avons pas de signes cliniques et où le nombre de granulocytes infiltrés est très faible, surtout à comparer au pic de la maladie [74, 119]. À la lumière de tous ces résultats, nous avons poursuivi nos analyses en nous concentrant sur cette chimiokine.

Considérant les résultats précédents concernant l'implication de l'IL-6 dans le recrutement des leucocytes bâtonnets et dans la régulation d'ICAM-1, nous avons vérifié si cette cytokine influence aussi CXCL1. Notre étude a démontré pour la première fois, particulièrement dans le cerveau et *in vivo*, que l'IL-6 peut réguler positivement l'expression de CXCL1. De plus, cette stimulation de CXCL1 par l'IL-6 ne se situe pas uniquement au niveau de la traduction comme pour ICAM-1, mais bien au niveau de la transcription. Nos travaux nous ont aussi montré que c'est par son effet direct sur

l'endothélium que l'IL-6 régule CXCL1. Ce résultat est de la première importance et peut expliquer, tel que mentionné précédemment, comment la toxine PTX, connue pour interférer avec la signalisation des protéines G, peut accroître le recrutement de granulocytes en stimulant une chimiokine au lieu de bloquer son signal. En effet, la PTX induit l'expression de CXCL1 via la stimulation d'un autre médiateur, qui lui agit sur l'endothélium, et dans ce cas ci, il s'agit de l'IL-6.

Concernant les études fonctionnelles, nous avons, grâce à l'utilisation d'anticorps neutralisants, démontré que CXCL1 et CXCR2 sont tous deux importants dans l'adhésion des granulocytes à la vasculature cérébrale en réponse à la PTX et au LPS. Par la suite, nous avons entrepris de caractériser le rôle de CXCL1 dans l'EAE. Le suivi quotidien des animaux a permis de démontrer que CXCL1 est importante dans l'initiation et dans le développement de la maladie, puisque les animaux où CXCL1 est neutralisée sont moins malades que les animaux contrôles. D'un point de vue histologique, tel qu'attendu, le nombre de granulocytes adhérents à la vasculature cérébrale est diminué chez les animaux où CXCL1 est bloquée. On note également une baisse des granulocytes ayant une morphologie ronde, lesquels représentent des granulocytes infiltrés et intra-vasculaires. Étant donné que nous avons déjà démontré que dans l'EAE certains leucocytes bâtonnets sont des cellules T, nous avons vérifié si CXCL1 influence l'adhésion de ces dernières. Nos résultats indiquent que CXCL1 a un effet uniquement sur l'adhésion des granulocytes. Cette dernière information est primordiale et révèle deux notions importantes. Tout d'abord, on assure, contrairement à d'autres molécules impliquées dans l'adhésion, une spécificité leucocytaire de CXCL1. De plus, on démontre qu'il est très important de caractériser le mécanisme de recrutement de chaque type de leucocyte dans chaque système. Cette dernière idée est d'ailleurs supportée par une autre étude effectuée sur des leucocytes patrouillant la vasculature du derme et où la population ciblée est cette fois-ci des monocytes. En effet, c'est le récepteur de CX3CL1 et l'intégrine $\alpha L\beta 2$ qui sont impliqués dans le recrutement de ces cellules, et non pas CXCL1 et $\alpha M\beta 2$ [513]. D'ailleurs, le rôle du récepteur de CX3CL1 a été analysé dans le cadre de ce doctorat, au moment où la nature des leucocytes bâtonnets cérébraux recrutés en conditions inflammatoires était incertaine, et CX3CR1 n'a aucun effet sur l'adhésion de ces cellules, tant en réponse au LPS qu'à la PTX (annexe I).

Nos résultats ont mis en lumière l'importance d'étudier chaque système et chaque type de leucocytes, apporté de nouvelles connaissances sur le mécanisme d'action de la PTX et finalement corrèlent avec le rôle du récepteur CXCR2 dans l'EAE. De plus, ils amorcent notre compréhension du rôle des chimiokines recrutant les granulocytes lors d'infections. En effet, leur rôle en réponse à l'agent substituant l'infection dans l'EAE et utilisé dans cette étude n'était pas connu. De plus, dans l'autre modèle animal de la SEP étudiant le rôle des infections, le virus de Theiler, il avait seulement été démontré que CXCL2 peut être exprimée sur les astrocytes sans y avoir encore approfondie le rôle [514, 515]. Cependant, malgré toutes ces nouvelles informations, ils soulèvent également des questionnements. Par exemple, dans l'EAE, est-ce que le rôle de CXCL1 dans le cerveau est également observé dans la moelle épinière? En effet, dans l'EAE, la moelle épinière est bien reconnue comme étant une cible importante de l'inflammation [80, 516, 517]. Alors, il serait intéressant de vérifier si CXCL1 et les granulocytes sont importants à ce niveau, car nous avons également démontré que CXCL1 est aussi exprimée dans la moelle durant l'EAE. Bien entendu, cela n'enlève pas l'importance d'avoir étudié le rôle de CXCL1 et des granulocytes dans le cerveau. En effet, dans certaines conditions, telles que lorsque le récepteur de IFN- γ est absent, ou encore chez certaines espèces animales, le cerveau est également très touché par l'inflammation. De plus, et encore plus important, dans la SEP, c'est une région pouvant être très affectée [6, 517, 518]. Il ne faut donc pas négliger les études à ce niveau.

Afin de déterminer si CXCL1 peut être une bonne cible thérapeutique, d'autres points sont importants à considérer, tels que la possibilité qu'un autre ligand de CXCR2 vienne à compenser l'absence de CXCL1. En effet, nous avons démontré que ses autres ligands peuvent être exprimés dans l'EAE. Alors, afin de s'assurer que notre traitement n'est pas compensé, il faudrait soit continuer le traitement plus longtemps et comparer l'expression des autres chimiokines liants CXCR2 à celle obtenue chez des animaux contrôles ou encore étudier si leur expression varie à comparer à celles d'animaux déficients pour CXCL1. De plus, nous avons effectué la neutralisation de CXCL1 au début de la maladie. Alors, afin de savoir si CXCL1 peut être utilisée pour un traitement, il faudrait s'assurer que l'effet protecteur obtenu dans cette recherche est également observé lorsqu'on bloque CXCL1 à d'autres moments de la maladie. En effet, il a été suggéré que

CXCL1 est importante dans la remyélinisation, mais durant l'étude en question, ils ont démontré un effet bénéfique de CXCL1 lorsque surexprimé sur les astrocytes, alors que durant mes travaux, j'ai démontré que dans l'EAE cela n'est pas le cas [303, 519]. D'ailleurs, concernant le sujet de la remyélinisation ou encore de la démyélinisation, il serait très intéressant d'approfondir le rôle des différents ligands de CXCR2 dans ce processus. En effet, il a été démontré que dans divers modèles de démyélinisation, soit par l'utilisation de la cuprizone, de la lysophosphatidylcholine ou encore durant l'EAE, la neutralisation de CXCR2 diminue la démyélinisation et favorise la remyélinisation [356, 519]. De plus, il a été montré que cet effet est observé lorsque CXCR2 est absent des cellules non-hématopoïétiques. Alors, il serait important de vérifier si CXCL1 est importante uniquement pour l'adhésion des granulocytes au début de la maladie et si plus tard c'est un autre ligand de CXCR2 qui joue un rôle néfaste dans la démyélinisation [520]. Afin d'arriver à répondre à cette interrogation, il faudrait neutraliser CXCL1 après le début des signes cliniques et regarder, surtout dans le moelle, lieu de prédilection de la démyélinisation dans l'EAE, si on note une diminution de démyélinisation. Si tel est le cas, il faudrait également vérifier si c'est dû à une baisse du recrutement des granulocytes. Si l'on ne note pas d'effet de CXCL1, il faudrait vérifier le rôle de CXCL2.

Tel que mentionné dans le premier chapitre de cette thèse, il a longtemps été reconnu que les lymphocytes Th1 sont importants dans l'EAE et la SEP. Cependant, d'autres découvertes démontrent que les lymphocytes Th17 sont également cruciaux dans ces pathologies [113, 114]. L'importance de cette population dans l'EAE corrèle d'ailleurs avec nos résultats. En effet, non seulement la cytokine que nous avons démontré importante lors du recrutement des granulocytes sous le traitement à la PTX, l'IL-6, est importante dans le développement des lymphocytes Th17 [75], mais la cytokine produite par les Th17, l'IL-17, est un régulateur important de CXCL1 [521]. De plus, lors de l'induction de l'EAE par transfert adoptif avec des cellules Th17, une forte expression de CXCL1 et une grande quantité de granulocyte sont notées dans le SNC de ces souris. Finalement, lorsque l'élastase, protéase contenue dans les granules des neutrophiles, est bloquée, une diminution de la sévérité de la maladie est observée [498]. Ainsi, ces résultats concordent donc avec le rôle des granulocytes dans l'EAE. À noter également que les auteurs de cet article ont démontré que l'EAE induit avec le transfert de lymphocytes Th17 a une forte

similitude avec la NMO, maladie démyélinisante humaine décrite précédemment et où les granulocytes sont fortement recrutés dans le SNC [498].

Finalement, nous avons effectué notre étude chez la souris. Alors, il importe de se demander si les résultats obtenus chez l'animal sont intéressants pour les humains. En effet, cette chimiokine est très peu caractérisée chez les gens atteints de la SEP. Donc, afin de savoir si CXCL1 peut être la cible d'un outil thérapeutique, son expression et son rôle devrait être approfondie chez l'humain. Par exemple, il serait pertinent d'effectuer une étude similaire à celle de Battistini et coll., 2005, mais pour les granulocytes et CXCL1. En effet, transférer les granulocytes périphériques de patients atteints de la SEP chez des souris et neutraliser CXCL1 nous informeraient si CXCL1 est importante uniquement chez la souris ou aussi chez l'humain et dans la SEP.

La diminution de l'adhésion des granulocytes par CXCL1 diminue la sévérité de la maladie. Alors, puisque le rôle des granulocytes dans l'EAE et la SEP est méconnu, il serait intéressant d'approfondir nos connaissances à ce sujet, puisque nos résultats soulèvent l'idée que les granulocytes sont importants dans cette maladie. CXCL1 pourrait d'ailleurs être un outil intéressant pour étudier ce rôle. En effet, cette chimiokine diminue l'adhésion des granulocytes sans totalement l'éliminer. Ainsi, on peut dépléter efficacement le recrutement des granulocytes pour en étudier leur fonction sans mettre en danger la survie des animaux via une incapacité de se défendre contre des infections secondaires. Concernant ce rôle potentiel des granulocytes dans l'EAE et la SEP, certaines observations suggèrent qu'ils pourraient avoir une fonction effectrice ou régulatrice. Tout d'abord, concernant la possibilité d'un rôle effecteur, il a été démontré que lors du traitement avec l'anti-CXCR2, la perméabilité de la BHE est diminuée [119]. Alors, peut-être que les granulocytes via, entre autre, leurs enzymes libérées lors d'une potentielle dégranulation, peuvent détruire la BHE. Cette idée est d'ailleurs supportée par le fait que les granulocytes dans l'EAE sont responsables de la production de la MMP-8 [522]. Alors, il serait intéressant de vérifier si lorsqu'on diminue l'adhésion d'un assez grand nombre de granulocytes pour réduire la sévérité de la maladie sans compromettre la défense de l'organisme, tel qu'avec un anti-CXCL1, on note une diminution de sécrétion de différentes protéinases telles que des MMP. Si c'est le cas, il faudrait vérifier si l'intégrité de la BHE

est également changée. Ainsi, on pourrait savoir si les granulocytes affectent la BHE par la sécrétion d'enzymes. Aussi, il est possible qu'ils exercent leur rôle un peu comme les monocytes, soit en phagocytant la myéline. Au sujet d'une fonction plutôt régulatrice, il est probable que les granulocytes influencent le recrutement de d'autres leucocytes tels que les monocytes, car bien que dans notre modèle, le recrutement des lymphocytes n'est pas affecté, celui des monocytes peut peut-être l'être. En effet, chez les souris BALB/c souffrant d'EAE, les granulocytes peuvent exprimer des chimiokines importantes dans le recrutement des monocytes telles que CCL2 et CCL3 [265]. De plus, lors de traitement au LPS, les granulocytes peuvent exprimer dans le cerveau l'IL-1 β , la CCL2 et l' α M β 2 [523]. La neutralisation de CXCL1 serait, dans ce cas-ci, probablement un bon outil pour tester cette hypothèse, puisque l'on pourrait vérifier si l'expression de chimiokines importantes dans le recrutement des monocytes, telles que CCL2, est diminuée lors d'une baisse d'adhésion des granulocytes. De plus, le compte des monocytes serait également une façon de tester cette hypothèse. Plusieurs rôles sont donc envisageables et il reste à découvrir lequel est réel.

En conclusion, dans cette étude, nous avons contribué à comprendre l'influence de la PTX et démontré que, dans l'EAE, sa stimulation de l'inflammation y joue un rôle important. De plus, nous avons identifié quelle chimiokine et intégrine médient l'adhésion des granulocytes patrouillant la vasculature cérébrale. Des études supplémentaires sont par contre nécessaires afin d'identifier tous les ligands d' α M β 2 impliqués dans cette adhésion. Finalement, nos résultats supportent les autres études démontrant un rôle potentiellement important des granulocytes dans l'EAE et la SEP. Identifier ce rôle et finir d'éclaircir le mode d'action de la PTX sont les enjeux à poursuivre afin de mieux comprendre la SEP.

Bibliographie

1. Charcot J: *Comptes rendus des séances et mémoires lus à la société de Biologie*. 1868.
2. Frohman EM, Racke MK, Raine CS: *Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis*. N Engl J Med 2006, **354**:942-955.
3. Bjartmar C, Wujek JR, Trapp BD: *Axonal loss in the pathology of MS: consequences for understanding the progressive phase of the disease*. J Neurol Sci 2003, **206**:165-171.
4. Milo R, Kahana E: *Multiple sclerosis: geoeidemiology, genetics and the environment*. Autoimmun Rev 2010, **9**:A387-394.
5. [<http://mssociety.ca/qc/faq.htm>]
6. Compston A, Coles A: *Multiple sclerosis*. Lancet 2008, **372**:1502-1517.
7. Coebergh JA, Roosendaal SD, Polman CH, Geurts JJ, van Woerkom TC: *Acute severe memory impairment as a presenting symptom of multiple sclerosis: a clinical case study with 3D double inversion recovery MR imaging*. Mult Scler 2010, **16**:1521-1524.
8. Betts CD, D'Mellow MT, Fowler CJ: *Urinary symptoms and the neurological features of bladder dysfunction in multiple sclerosis*. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1993, **56**:245-250.
9. Betts CD, Jones SJ, Fowler CG, Fowler CJ: *Erectile dysfunction in multiple sclerosis. Associated neurological and neurophysiological deficits, and treatment of the condition*. Brain 1994, **117 (Pt 6)**:1303-1310.
10. DasGupta R, Fowler CJ: *Bladder, bowel and sexual dysfunction in multiple sclerosis: management strategies*. Drugs 2003, **63**:153-166.
11. Feinstein A, Feinstein K: *Depression associated with multiple sclerosis. Looking beyond diagnosis to symptom expression*. J Affect Disord 2001, **66**:193-198.
12. Freedman MS, Gray TA: *Vascular headache: a presenting symptom of multiple sclerosis*. Can J Neurol Sci 1989, **16**:63-66.
13. Gulick EE: *Symptom and activities of daily living trajectory in multiple sclerosis: a 10-year study*. Nurs Res 1998, **47**:137-146.
14. Higginson IJ, Hart S, Silber E, Burman R, Edmonds P: *Symptom prevalence and severity in people severely affected by multiple sclerosis*. J Palliat Care 2006, **22**:158-165.
15. Minden SL, Frankel D, Hadden L, Perloff J, Srinath KP, Hoaglin DC: *The Sonya Slifka Longitudinal Multiple Sclerosis Study: methods and sample characteristics*. Mult Scler 2006, **12**:24-38.
16. Molteni RA: *Vertigo as a presenting symptom of multiple sclerosis in childhood*. Am J Dis Child 1977, **131**:553-554.
17. Motl RW, Suh Y, Weikert M: *Symptom cluster and quality of life in multiple sclerosis*. J Pain Symptom Manage 2010, **39**:1025-1032.
18. Constantinescu CS, Raps EC, Cohen JA, West SE, Doty RL: *Olfactory disturbances as the initial or most prominent symptom of multiple sclerosis*. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1994, **57**:1011-1012.
19. Azzimondi G, Rinaldi R, Liguori R, Tonon C, Martini E, D'Alessandro R: *Dystonia as an isolated symptom of multiple sclerosis?* Ital J Neurol Sci 1997, **18**:301-302.

20. Herderschee D, Stam J, Derix MM: *Aphemia as a first symptom of multiple sclerosis*. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1987, **50**:499-500.
21. Rodriguez-Casero MV, Mandelstam S, Kornberg AJ, Berkowitz RG: *Acute tinnitus and hearing loss as the initial symptom of multiple sclerosis in a child*. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 2005, **69**:123-126.
22. Striano P, Striano S, Carrieri PB, Boccella P: *Epilepsia partialis continua as a first symptom of multiple sclerosis: electrophysiological study of one case*. Mult Scler 2003, **9**:199-203.
23. Castaigne P, Lhermitte F, Escourolle R, Hauw JJ, Gray F, Lyon-Caen O: *[Asymptomatic multiple sclerosis - 3 cases (author's transl)]*. Rev Neurol (Paris) 1981, **137**:729-739.
24. Rostasy K: *Multiple sclerosis in children: clinical, diagnostic, and therapeutic aspects*. Int Rev Neurobiol 2007, **79**:269-279.
25. Bjartmar C, Trapp BD: *Axonal and neuronal degeneration in multiple sclerosis: mechanisms and functional consequences*. Curr Opin Neurol 2001, **14**:271-278.
26. Sospedra M, Martin R: *Immunology of multiple sclerosis*. Annu Rev Immunol 2005, **23**:683-747.
27. Lublin FD, Reingold SC: *Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis*. Neurology 1996, **46**:907-911.
28. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, et al: *Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis*. Ann Neurol 2001, **50**:121-127.
29. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, et al: *Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria*. Ann Neurol 2010, **69**:292-302.
30. Olek MJ: *Multiple sclerosis--Part I. Overview, pathophysiology, diagnostic evaluation, and clinical parameters*. J Am Osteopath Assoc 1999, **99**:574-588.
31. Stuve O, Gold R, Chan A, Mix E, Zettl U, Kieseier BC: *alpha4-Integrin antagonism with natalizumab: effects and adverse effects*. J Neurol 2008, **255 Suppl 6**:58-65.
32. Dyment DA, Ebers GC, Sadovnick AD: *Genetics of multiple sclerosis*. Lancet Neurol 2004, **3**:104-110.
33. Sadovnick AD, Baird PA: *The familial nature of multiple sclerosis: age-corrected empiric recurrence risks for children and siblings of patients*. Neurology 1988, **38**:990-991.
34. Sadovnick AD, Ebers GC: *Epidemiology of multiple sclerosis: a critical overview*. Can J Neurol Sci 1993, **20**:17-29.
35. Jersild C, Svejgaard A, Fog T: *HL-A antigens and multiple sclerosis*. Lancet 1972, **1**:1240-1241.
36. Hillert J, Olerup O: *Multiple sclerosis is associated with genes within or close to the HLA-DR-DQ subregion on a normal DR15,DQ6,Dw2 haplotype*. Neurology 1993, **43**:163-168.

37. Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CC, Patsopoulos NA, Moutsianas L, Dilthey A, Su Z, Freeman C, Hunt SE, et al: *Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis*. Nature 2011, **476**:214-219.
38. Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ, De Jager PL, de Bakker PI, Gabriel SB, Mirel DB, Ivinson AJ, et al: *Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study*. N Engl J Med 2007, **357**:851-862.
39. Boppana S, Huang H, Ito K, Dhib-Jalbut S: *Immunologic aspects of multiple sclerosis*. Mt Sinai J Med 2011, **78**:207-220.
40. Kaimen-Maciel DR, Reiche EM, Brum Souza DG, Frota Comini ER, Bobroff F, Morimoto HK, Ehara Watanabe MA, Carvalho De Oliveira J, Matsuo T, Lopes J, Donadi EA: *CCR5-Delta32 genetic polymorphism associated with benign clinical course and magnetic resonance imaging findings in Brazilian patients with multiple sclerosis*. Int J Mol Med 2007, **20**:337-344.
41. Gade-Andavolu R, Comings DE, MacMurray J, Vuthoori RK, Tourtellotte WW, Nagra RM, Cone LA: *RANTES: a genetic risk marker for multiple sclerosis*. Mult Scler 2004, **10**:536-539.
42. Hashimoto LL, Walter MA, Cox DW, Ebers GC: *Immunoglobulin heavy chain variable region polymorphisms and multiple sclerosis susceptibility*. J Neuroimmunol 1993, **44**:77-83.
43. Ligiers A, Xu C, Saarinen S, Hillert J, Olerup O: *The CTLA-4 gene is associated with multiple sclerosis*. J Neuroimmunol 1999, **97**:182-190.
44. He B, Xu C, Yang B, Landtblom AM, Fredrikson S, Hillert J: *Linkage and association analysis of genes encoding cytokines and myelin proteins in multiple sclerosis*. J Neuroimmunol 1998, **86**:13-19.
45. Reboul J, Mertens C, Levillayer F, Eichenbaum-Voline S, Vilkoren T, Cournu I, Babron MC, Lyon-Caen O, Clerget-Darpoux F, Edan G, et al: *Cytokines in genetic susceptibility to multiple sclerosis: a candidate gene approach. French Multiple Sclerosis Genetics Group*. J Neuroimmunol 2000, **102**:107-112.
46. Patsopoulos NA, Esposito F, Reischl J, Lehr S, Bauer D, Heubach J, Sandbrink R, Pohl C, Edan G, Kappos L, et al: *Genome-wide meta-analysis identifies novel multiple sclerosis susceptibility loci*. Ann Neurol 2011, **70**:897-912.
47. Ascherio A, Munger KL: *Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Noninfectious factors*. Ann Neurol 2007, **61**:504-513.
48. Leibowitz U, Sharon D, Alter M: *Geographical considerations in multiple sclerosis*. Brain 1967, **90**:871-886.
49. Marrie RA: *Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology*. Lancet Neurol 2004, **3**:709-718.
50. Acheson ED, Bachrach CA, Wright FM: *Some comments on the relationship of the distribution of multiple sclerosis to latitude, solar radiation, and other variables*. Acta Psychiatr Scand Suppl 1960, **35**:132-147.
51. Gale CR, Martyn CN: *Migrant studies in multiple sclerosis*. Prog Neurobiol 1995, **47**:425-448.
52. van der Mei IA, Ponsonby AL, Blizzard L, Dwyer T: *Regional variation in multiple sclerosis prevalence in Australia and its association with ambient ultraviolet radiation*. Neuroepidemiology 2001, **20**:168-174.

53. Holick MF: *Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease*. Am J Clin Nutr 2004, **80**:1678S-1688S.
54. Hayes CE, Cantorna MT, DeLuca HF: *Vitamin D and multiple sclerosis*. Proc Soc Exp Biol Med 1997, **216**:21-27.
55. Nashold FE, Miller DJ, Hayes CE: *1,25-dihydroxyvitamin D3 treatment decreases macrophage accumulation in the CNS of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Neuroimmunol 2000, **103**:171-179.
56. Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A: *Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis*. JAMA 2006, **296**:2832-2838.
57. Cantorna MT, Hayes CE, DeLuca HF: *1,25-Dihydroxyvitamin D3 reversibly blocks the progression of relapsing encephalomyelitis, a model of multiple sclerosis*. Proc Natl Acad Sci U S A 1996, **93**:7861-7864.
58. Cantorna MT, Woodward WD, Hayes CE, DeLuca HF: *1,25-dihydroxyvitamin D3 is a positive regulator for the two anti-encephalitogenic cytokines TGF-beta 1 and IL-4*. J Immunol 1998, **160**:5314-5319.
59. Pedersen LB, Nashold FE, Spach KM, Hayes CE: *1,25-dihydroxyvitamin D3 reverses experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting chemokine synthesis and monocyte trafficking*. J Neurosci Res 2007, **85**:2480-2490.
60. Mattner F, Smiroldo S, Galbiati F, Muller M, Di Lucia P, Poliani PL, Martino G, Panina-Bordignon P, Adorini L: *Inhibition of Th1 development and treatment of chronic-relapsing experimental allergic encephalomyelitis by a non-hypercalcemic analogue of 1,25-dihydroxyvitamin D(3)*. Eur J Immunol 2000, **30**:498-508.
61. Willer CJ, Dyment DA, Sadovnick AD, Rothwell PM, Murray TJ, Ebers GC: *Timing of birth and risk of multiple sclerosis: population based study*. BMJ 2005, **330**:120.
62. Gildeen DH: *Infectious causes of multiple sclerosis*. Lancet Neurol 2005, **4**:195-202.
63. Andersen O, Lygner PE, Bergstrom T, Andersson M, Vahlne A: *Viral infections trigger multiple sclerosis relapses: a prospective seroepidemiological study*. J Neurol 1993, **240**:417-422.
64. Buljevac D, Flach HZ, Hop WC, Hijdra D, Laman JD, Savelkoul HF, van Der Meche FG, van Doorn PA, Hintzen RQ: *Prospective study on the relationship between infections and multiple sclerosis exacerbations*. Brain 2002, **125**:952-960.
65. Marrie RA, Wolfson C, Sturkenboom MC, Gout O, Heinzlef O, Rouillet E, Abenheim L: *Multiple sclerosis and antecedent infections: a case-control study*. Neurology 2000, **54**:2307-2310.
66. Goverman J, Woods A, Larson L, Weiner LP, Hood L, Zaller DM: *Transgenic mice that express a myelin basic protein-specific T cell receptor develop spontaneous autoimmunity*. Cell 1993, **72**:551-560.
67. Ascherio A, Munger KL: *Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection*. Ann Neurol 2007, **61**:288-299.
68. Thacker EL, Mirzaei F, Ascherio A: *Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: a meta-analysis*. Ann Neurol 2006, **59**:499-503.
69. Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen D: *The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: the need for effective antioxidant therapy*. J Neurol 2004, **251**:261-268.

70. Hernan MA, Jick SS, Logroscino G, Olek MJ, Ascherio A, Jick H: *Cigarette smoking and the progression of multiple sclerosis*. Brain 2005, **128**:1461-1465.
71. Lassmann H, Ransohoff RM: *The CD4-Th1 model for multiple sclerosis: a critical [correction of crucial] re-appraisal*. Trends Immunol 2004, **25**:132-137.
72. Hafler DA: *Multiple sclerosis*. J Clin Invest 2004, **113**:788-794.
73. Brown A, McFarlin DE, Raine CS: *Chronologic neuropathology of relapsing experimental allergic encephalomyelitis in the mouse*. Lab Invest 1982, **46**:171-185.
74. Wu F, Cao W, Yang Y, Liu A: *Extensive infiltration of neutrophils in the acute phase of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice*. Histochem Cell Biol 2010, **133**:313-322.
75. Serada S, Fujimoto M, Mihara M, Koike N, Ohsugi Y, Nomura S, Yoshida H, Nishikawa T, Terabe F, Ohkawara T, et al: *IL-6 blockade inhibits the induction of myelin antigen-specific Th17 cells and Th1 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis*. Proc Natl Acad Sci U S A 2008, **105**:9041-9046.
76. Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T, et al: *Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain*. Nature 2003, **421**:744-748.
77. Rivers TM, Sprunt DH, Berry GP: *Observations on Attempts to Produce Acute Disseminated Encephalomyelitis in Monkeys*. J Exp Med 1933, **58**:39-53.
78. Maatta JA, Sjöholm UR, Nygardas PT, Salmi AA, Hinkkanen AE: *Neutrophils secreting tumor necrosis factor alpha infiltrate the central nervous system of BALB/c mice with experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Neuroimmunol 1998, **90**:162-175.
79. Stromnes IM, Goverman JM: *Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis*. Nat Protoc 2006, **1**:1952-1960.
80. Stromnes IM, Goverman JM: *Active induction of experimental allergic encephalomyelitis*. Nat Protoc 2006, **1**:1810-1819.
81. Hofstetter HH, Shive CL, Forsthuber TG: *Pertussis toxin modulates the immune response to neuroantigens injected in incomplete Freund's adjuvant: induction of Th1 cells and experimental autoimmune encephalomyelitis in the presence of high frequencies of Th2 cells*. J Immunol 2002, **169**:117-125.
82. Tsunoda I, Fujinami RS: *Two models for multiple sclerosis: experimental allergic encephalomyelitis and Theiler's murine encephalomyelitis virus*. J Neuropathol Exp Neurol 1996, **55**:673-686.
83. Krishnamoorthy G, Wekerle H: *EAE: an immunologist's magic eye*. Eur J Immunol 2009, **39**:2031-2035.
84. Ulevitch RJ, Tobias PS: *Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system*. Curr Opin Immunol 1999, **11**:19-22.
85. Trent MS, Stead CM, Tran AX, Hankins JV: *Diversity of endotoxin and its impact on pathogenesis*. J Endotoxin Res 2006, **12**:205-223.
86. Rivest S: *Molecular insights on the cerebral innate immune system*. Brain Behav Immun 2003, **17**:13-19.
87. Buer J, Balling R: *Mice, microbes and models of infection*. Nat Rev Genet 2003, **4**:195-205.
88. Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS: *LPS/TLR4 signal transduction pathway*. Cytokine 2008, **42**:145-151.

89. Beutler B: *Endotoxin, toll-like receptor 4, and the afferent limb of innate immunity*. *Curr Opin Microbiol* 2000, **3**:23-28.
90. Bierhaus A, Chen J, Liliensiek B, Nawroth PP: *LPS and cytokine-activated endothelium*. *Semin Thromb Hemost* 2000, **26**:571-587.
91. Vallieres L, Rivest S: *Regulation of the genes encoding interleukin-6, its receptor, and gp130 in the rat brain in response to the immune activator lipopolysaccharide and the proinflammatory cytokine interleukin-1beta*. *J Neurochem* 1997, **69**:1668-1683.
92. Audoy-Remus J, Richard JF, Soulet D, Zhou H, Kubes P, Vallieres L: *Rod-Shaped monocytes patrol the brain vasculature and give rise to perivascular macrophages under the influence of proinflammatory cytokines and angiopoietin-2*. *J Neurosci* 2008, **28**:10187-10199.
93. Tamura M, Nogimori K, Murai S, Yajima M, Ito K, Katada T, Ui M, Ishii S: *Subunit structure of islet-activating protein, pertussis toxin, in conformity with the A-B model*. *Biochemistry* 1982, **21**:5516-5522.
94. Carbonetti NH: *Pertussis toxin and adenylate cyclase toxin: key virulence factors of Bordetella pertussis and cell biology tools*. *Future Microbiol* 2010, **5**:455-469.
95. Burnette WN: *Bacterial ADP-ribosylating toxins: form, function, and recombinant vaccine development*. *Behring Inst Mitt* 1997:434-441.
96. Hepler JR, Gilman AG: *G proteins*. *Trends Biochem Sci* 1992, **17**:383-387.
97. Plaut RD, Carbonetti NH: *Retrograde transport of pertussis toxin in the mammalian cell*. *Cell Microbiol* 2008, **10**:1130-1139.
98. Lee JM, Olitsky PK: *Simple method for enhancing development of acute disseminated encephalomyelitis in mice*. *Proc Soc Exp Biol Med* 1955, **89**:263-266.
99. Linthicum DS, Munoz JJ, Blaskett A: *Acute experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. I. Adjuvant action of Bordetella pertussis is due to vasoactive amine sensitization and increased vascular permeability of the central nervous system*. *Cell Immunol* 1982, **73**:299-310.
100. Kerfoot SM, Long EM, Hickey MJ, Andonegui G, Lapointe BM, Zanardo RC, Bonder C, James WG, Robbins SM, Kubes P: *TLR4 contributes to disease-inducing mechanisms resulting in central nervous system autoimmune disease*. *J Immunol* 2004, **173**:7070-7077.
101. Hofstetter HH, Forsthuber TG: *Kinetics of IL-17- and interferon-gamma-producing PLPp-specific CD4 T cells in EAE induced by coinjection of PLPp/IFA with pertussis toxin in SJL mice*. *Neurosci Lett* 2010, **476**:150-155.
102. Hofstetter HH, Grau C, Buttmann M, Forsthuber TG, Gaupp S, Toyka KV, Gold R: *The PLPp-specific T-cell population promoted by pertussis toxin is characterized by high frequencies of IL-17-producing cells*. *Cytokine* 2007, **40**:35-43.
103. Toft-Hansen H, Buist R, Sun XJ, Schellenberg A, Peeling J, Owens T: *Metalloproteinases control brain inflammation induced by pertussis toxin in mice overexpressing the chemokine CCL2 in the central nervous system*. *J Immunol* 2006, **177**:7242-7249.
104. Platten M, Steinman L: *Multiple sclerosis: trapped in deadly glue*. *Nat Med* 2005, **11**:252-253.
105. Holmoy T, Harbo H, Vartdal F, Spurkland A: *Genetic and molecular approaches to the immunopathogenesis of multiple sclerosis: an update*. *Curr Mol Med* 2009, **9**:591-611.

106. Dhib-Jalbut S, Arnold DL, Cleveland DW, Fisher M, Friedlander RM, Mouradian MM, Przedborski S, Trapp BD, Wyss-Coray T, Yong VW: *Neurodegeneration and neuroprotection in multiple sclerosis and other neurodegenerative diseases*. J Neuroimmunol 2006, **176**:198-215.
107. Nikic I, Merkler D, Sorbara C, Brinkoetter M, Kreutzfeldt M, Bareyre FM, Bruck W, Bishop D, Misgeld T, Kerschensteiner M: *A reversible form of axon damage in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis*. Nat Med 2011, **17**:495-499.
108. Fontoura P, Garren H: *Multiple sclerosis therapies: molecular mechanisms and future*. Results Probl Cell Differ 2010, **51**:259-285.
109. Fontoura P, Garren H: *Multiple sclerosis therapies: molecular mechanisms and future*. Results Probl Cell Differ, **51**:259-285.
110. Berger T, Weerth S, Kojima K, Linington C, Wekerle H, Lassmann H: *Experimental autoimmune encephalomyelitis: the antigen specificity of T lymphocytes determines the topography of lesions in the central and peripheral nervous system*. Lab Invest 1997, **76**:355-364.
111. Kaye JF, Kerlero de Rosbo N, Mendel I, Flechter S, Hoffman M, Yust I, Ben-Nun A: *The central nervous system-specific myelin oligodendrocytic basic protein (MOBP) is encephalitogenic and a potential target antigen in multiple sclerosis (MS)*. J Neuroimmunol 2000, **102**:189-198.
112. Morris-Downes MM, McCormack K, Baker D, Sivaprasad D, Natkunarajah J, Amor S: *Encephalitogenic and immunogenic potential of myelin-associated glycoprotein (MAG), oligodendrocyte-specific glycoprotein (OSP) and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase) in ABH and SJL mice*. J Neuroimmunol 2002, **122**:20-33.
113. Murphy AC, Lalor SJ, Lynch MA, Mills KH: *Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis*. Brain Behav Immun 2010, **24**:641-651.
114. McFarland HF, Martin R: *Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity*. Nat Immunol 2007, **8**:913-919.
115. Paz A, Fiszer U, Zaborski J, Korlak J, Czlonkowski A, Czlonkowska A: *Phenotyping analysis of peripheral blood leukocytes in patients with multiple sclerosis*. Eur J Neurol 1999, **6**:347-352.
116. Lund BT, Ashikian N, Ta HQ, Chakryan Y, Manoukian K, Groshen S, Gilmore W, Cheema GS, Stohl W, Burnett ME, et al: *Increased CXCL8 (IL-8) expression in Multiple Sclerosis*. J Neuroimmunol 2004, **155**:161-171.
117. Naegele M, Tillack K, Reinhardt S, Schippling S, Martin R, Sospedra M: *Neutrophils in multiple sclerosis are characterized by a primed phenotype*. J Neuroimmunol 2012, **242**:60-71.
118. Lucchinetti CF, Mandler RN, McGavern D, Bruck W, Gleich G, Ransohoff RM, Trebst C, Weinshenker B, Wingerchuk D, Parisi JE, Lassmann H: *A role for humoral mechanisms in the pathogenesis of Devic's neuromyelitis optica*. Brain 2002, **125**:1450-1461.
119. Carlson T, Kroenke M, Rao P, Lane TE, Segal B: *The Th17-ELR+ CXC chemokine pathway is essential for the development of central nervous system autoimmune disease*. J Exp Med 2008, **205**:811-823.

120. McColl SR, Staykova MA, Wozniak A, Fordham S, Bruce J, Willenborg DO: *Treatment with anti-granulocyte antibodies inhibits the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Immunol 1998, **161**:6421-6426.
121. Persidsky Y: *Model systems for studies of leukocyte migration across the blood-brain barrier*. J Neurovirol 1999, **5**:579-590.
122. Imhof BA, Aurrand-Lions M: *Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes*. Nat Rev Immunol 2004, **4**:432-444.
123. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S: *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. Nat Rev Immunol 2007, **7**:678-689.
124. Chavakis E, Choi EY, Chavakis T: *Novel aspects in the regulation of the leukocyte adhesion cascade*. Thromb Haemost 2009, **102**:191-197.
125. Ulrich F, Heisenberg CP: *Trafficking and cell migration*. Traffic 2009, **10**:811-818.
126. Zarbock A, Ley K: *New insights into leukocyte recruitment by intravital microscopy*. Curr Top Microbiol Immunol 2009, **334**:129-152.
127. Bernacki J, Dobrowolska A, Nierwinska K, Malecki A: *Physiology and pharmacological role of the blood-brain barrier*. Pharmacol Rep 2008, **60**:600-622.
128. Alvarez JI, Cayrol R, Prat A: *Disruption of central nervous system barriers in multiple sclerosis*. Biochim Biophys Acta 2011, **1812**:252-264.
129. Ley K: *Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process*. Cardiovasc Res 1996, **32**:733-742.
130. McEver RP: *Role of selectins in leukocyte adhesion to platelets and endothelium*. Ann N Y Acad Sci 1994, **714**:185-189.
131. Proost P, Wuyts A, van Damme J: *The role of chemokines in inflammation*. Int J Clin Lab Res 1996, **26**:211-223.
132. Ley K, Reutershan J: *Leucocyte-endothelial interactions in health and disease*. Handb Exp Pharmacol 2006:97-133.
133. Bevilacqua MP: *Endothelial-leukocyte adhesion molecules*. Annu Rev Immunol 1993, **11**:767-804.
134. Jones DA, Abbassi O, McIntire LV, McEver RP, Smith CW: *P-selectin mediates neutrophil rolling on histamine-stimulated endothelial cells*. Biophys J 1993, **65**:1560-1569.
135. Kaplanski G, Fabrigoule M, Boulay V, Dinarello CA, Bongrand P, Kaplanski S, Farnarier C: *Thrombin induces endothelial type II activation in vitro: IL-1 and TNF-alpha-independent IL-8 secretion and E-selectin expression*. J Immunol 1997, **158**:5435-5441.
136. Kubes P, Kanwar S: *Histamine induces leukocyte rolling in post-capillary venules. A P-selectin-mediated event*. J Immunol 1994, **152**:3570-3577.
137. Kanwar S, Johnston B, Kubes P: *Leukotriene C4/D4 induces P-selectin and sialyl Lewis(x)-dependent alterations in leukocyte kinetics in vivo*. Circ Res 1995, **77**:879-887.
138. Kubes P, Ward PA: *Leukocyte recruitment and the acute inflammatory response*. Brain Pathol 2000, **10**:127-135.
139. Bernardes-Silva M, Anthony DC, Issekutz AC, Perry VH: *Recruitment of neutrophils across the blood-brain barrier: the role of E- and P-selectins*. J Cereb Blood Flow Metab 2001, **21**:1115-1124.

140. Easton AS, Dorovini-Zis K: *The kinetics, function, and regulation of P-selectin expressed by human brain microvessel endothelial cells in primary culture*. *Microvasc Res* 2001, **62**:335-345.
141. Piccio L, Rossi B, Scarpini E, Laudanna C, Giagulli C, Issekutz AC, Vestweber D, Butcher EC, Constantini G: *Molecular mechanisms involved in lymphocyte recruitment in inflamed brain microvessels: critical roles for P-selectin glycoprotein ligand-1 and heterotrimeric G(i)-linked receptors*. *J Immunol* 2002, **168**:1940-1949.
142. Suo Z, Citron BA, Festoff BW: *Thrombin: a potential proinflammatory mediator in neurotrauma and neurodegenerative disorders*. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2004, **3**:105-114.
143. Weiser S, Miu J, Ball HJ, Hunt NH: *Interferon-gamma synergises with tumour necrosis factor and lymphotoxin-alpha to enhance the mRNA and protein expression of adhesion molecules in mouse brain endothelial cells*. *Cytokine* 2007, **37**:84-91.
144. Yong T, Zheng MQ, Linthicum DS: *Local histamine release increases leukocyte rolling in the cerebral microcirculation of the mouse*. *Brain Inj* 1997, **11**:765-774.
145. Marin V, Montero-Julian FA, Gres S, Boulay V, Bongrand P, Farnarier C, Kaplanski G: *The IL-6-soluble IL-6/Ralpha autocrine loop of endothelial activation as an intermediate between acute and chronic inflammation: an experimental model involving thrombin*. *J Immunol* 2001, **167**:3435-3442.
146. Rott D, Zhu J, Zhou YF, Burnett MS, Zalles-Ganley A, Epstein SE: *IL-6 is produced by splenocytes derived from CMV-infected mice in response to CMV antigens, and induces MCP-1 production by endothelial cells: a new mechanistic paradigm for infection-induced atherogenesis*. *Atherosclerosis* 2003, **170**:223-228.
147. Eugster HP, Frei K, Winkler F, Koedel U, Pfister W, Lassmann H, Fontana A: *Superantigen overcomes resistance of IL-6-deficient mice towards MOG-induced EAE by a TNFR1 controlled pathway*. *Eur J Immunol* 2001, **31**:2302-2312.
148. Okuda Y, Sakoda S, Fujimura H, Saeki Y, Kishimoto T, Yanagihara T: *IL-6 plays a crucial role in the induction phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein 35-55 induced experimental autoimmune encephalomyelitis*. *J Neuroimmunol* 1999, **101**:188-196.
149. Navikas V, Matusevicius D, Soderstrom M, Fredrikson S, Kivisakk P, Ljungdahl A, Hojeborg B, Link H: *Increased interleukin-6 mRNA expression in blood and cerebrospinal fluid mononuclear cells in multiple sclerosis*. *J Neuroimmunol* 1996, **64**:63-69.
150. Maimone D, Guazzi GC, Annunziata P: *IL-6 detection in multiple sclerosis brain*. *J Neurol Sci* 1997, **146**:59-65.
151. Schonrock LM, Gawlowski G, Bruck W: *Interleukin-6 expression in human multiple sclerosis lesions*. *Neurosci Lett* 2000, **294**:45-48.
152. Adams DH, Shaw S: *Leucocyte-endothelial interactions and regulation of leucocyte migration*. *Lancet* 1994, **343**:831-836.
153. Lasky LA: *Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation*. *Science* 1992, **258**:964-969.
154. Ley K: *The role of selectins in inflammation and disease*. *Trends Mol Med* 2003, **9**:263-268.

155. Kansas GS: *Selectins and their ligands: current concepts and controversies*. Blood 1996, **88**:3259-3287.
156. Barthel SR, Gavino JD, Descheny L, Dimitroff CJ: *Targeting selectins and selectin ligands in inflammation and cancer*. Expert Opin Ther Targets 2007, **11**:1473-1491.
157. Xia L, Sperandio M, Yago T, McDaniel JM, Cummings RD, Pearson-White S, Ley K, McEver RP: *P-selectin glycoprotein ligand-1-deficient mice have impaired leukocyte tethering to E-selectin under flow*. J Clin Invest 2002, **109**:939-950.
158. Sperandio M, Smith ML, Forlow SB, Olson TS, Xia L, McEver RP, Ley K: *P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates L-selectin-dependent leukocyte rolling in venules*. J Exp Med 2003, **197**:1355-1363.
159. da Costa Martins P, Garcia-Vallejo JJ, van Thienen JV, Fernandez-Borja M, van Gils JM, Beckers C, Horrevoets AJ, Hordijk PL, Zwaginga JJ: *P-selectin glycoprotein ligand-1 is expressed on endothelial cells and mediates monocyte adhesion to activated endothelium*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2007, **27**:1023-1029.
160. Patel KD, Cuvelier SL, Wiehler S: *Selectins: critical mediators of leukocyte recruitment*. Semin Immunol 2002, **14**:73-81.
161. Hidalgo A, Peired AJ, Wild MK, Vestweber D, Frenette PS: *Complete identification of E-selectin ligands on neutrophils reveals distinct functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44*. Immunity 2007, **26**:477-489.
162. Collins RG, Jung U, Ramirez M, Bullard DC, Hicks MJ, Smith CW, Ley K, Beaudet AL: *Dermal and pulmonary inflammatory disease in E-selectin and P-selectin double-null mice is reduced in triple-selectin-null mice*. Blood 2001, **98**:727-735.
163. Kerfoot SM, D'Mello C, Nguyen H, Ajuebor MN, Kubes P, Le T, Swain MG: *TNF- α -secreting monocytes are recruited into the brain of cholestatic mice*. Hepatology 2006, **43**:154-162.
164. Kerfoot SM, Kubes P: *Overlapping roles of P-selectin and alpha 4 integrin to recruit leukocytes to the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Immunol 2002, **169**:1000-1006.
165. Stolen CM, Marttila-Ichihara F, Koskinen K, Yegutkin GG, Turja R, Bono P, Skurnik M, Hanninen A, Jalkanen S, Salmi M: *Absence of the endothelial oxidase AOC3 leads to abnormal leukocyte traffic in vivo*. Immunity 2005, **22**:105-115.
166. James WG, Bullard DC, Hickey MJ: *Critical role of the alpha 4 integrin/VCAM-1 pathway in cerebral leukocyte trafficking in lupus-prone MRL/fas(lpr) mice*. J Immunol 2003, **170**:520-527.
167. Vajkoczy P, Laschinger M, Engelhardt B: *Alpha4-integrin-VCAM-1 binding mediates G protein-independent capture of encephalitogenic T cell blasts to CNS white matter microvessels*. J Clin Invest 2001, **108**:557-565.
168. Barkalow FJ, Goodman MJ, Gerritsen ME, Mayadas TN: *Brain endothelium lack one of two pathways of P-selectin-mediated neutrophil adhesion*. Blood 1996, **88**:4585-4593.
169. Battistini L, Piccio L, Rossi B, Bach S, Galgani S, Gasperini C, Ottoboni L, Ciabini D, Caramia MD, Bernardi G, et al: *CD8+ T cells from patients with acute multiple sclerosis display selective increase of adhesiveness in brain venules: a critical role for P-selectin glycoprotein ligand-1*. Blood 2003, **101**:4775-4782.

170. Carvalho-Tavares J, Hickey MJ, Hutchison J, Michaud J, Sutcliffe IT, Kubes P: *A role for platelets and endothelial selectins in tumor necrosis factor-alpha-induced leukocyte recruitment in the brain microvasculature*. *Circ Res* 2000, **87**:1141-1148.
171. Hess DC, Thompson Y, Sprinkle A, Carroll J, Smith J: *E-selectin expression on human brain microvascular endothelial cells*. *Neurosci Lett* 1996, **213**:37-40.
172. Yilmaz G, Vital S, Yilmaz CE, Stokes KY, Alexander JS, Granger DN: *Selectin-mediated recruitment of bone marrow stromal cells in the postischemic cerebral microvasculature*. *Stroke*, **42**:806-811.
173. Okada Y, Copeland BR, Mori E, Tung MM, Thomas WS, del Zoppo GJ: *P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 expression after focal brain ischemia and reperfusion*. *Stroke* 1994, **25**:202-211.
174. Combes V, Rosenkranz AR, Redard M, Pizzolato G, Lepidi H, Vestweber D, Mayadas TN, Grau GE: *Pathogenic role of P-selectin in experimental cerebral malaria: importance of the endothelial compartment*. *Am J Pathol* 2004, **164**:781-786.
175. Sibson NR, Blamire AM, Bernades-Silva M, Laurent S, Boutry S, Muller RN, Styles P, Anthony DC: *MRI detection of early endothelial activation in brain inflammation*. *Magn Reson Med* 2004, **51**:248-252.
176. Piccio L, Rossi B, Colantonio L, Grenningloh R, Gho A, Ottoboni L, Homeister JW, Scarpini E, Martinello M, Laudanna C, et al: *Efficient recruitment of lymphocytes in inflamed brain venules requires expression of cutaneous lymphocyte antigen and fucosyltransferase-VII*. *J Immunol* 2005, **174**:5805-5813.
177. Gavins F, Yilmaz G, Granger DN: *The evolving paradigm for blood cell-endothelial cell interactions in the cerebral microcirculation*. *Microcirculation* 2007, **14**:667-681.
178. Baraczka K, Nekam K, Pozsonyi T, Jakab L, Szongoth M, Sesztak M: *Concentration of soluble adhesion molecules (sVCAM-1, sICAM-1 and sL-selectin) in the cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus with central nervous involvement*. *Neuroimmunomodulation* 2001, **9**:49-54.
179. Correale J, Bassani Molinas Mde L: *Temporal variations of adhesion molecules and matrix metalloproteinases in the course of MS*. *J Neuroimmunol* 2003, **140**:198-209.
180. Dore-Duffy P, Newman W, Balabanov R, Lisak RP, Mainolfi E, Rothlein R, Peterson M: *Circulating, soluble adhesion proteins in cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis: correlation with clinical activity*. *Ann Neurol* 1995, **37**:55-62.
181. Giovannoni G, Thorpe JW, Kidd D, Kendall BE, Moseley IF, Thompson AJ, Keir G, Miller DH, Feldmann M, Thompson EJ: *Soluble E-selectin in multiple sclerosis: raised concentrations in patients with primary progressive disease*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996, **60**:20-26.
182. Jy W, Minagar A, Jimenez JJ, Sheremata WA, Mauro LM, Horstman LL, Bidot C, Ahn YS: *Endothelial microparticles (EMP) bind and activate monocytes: elevated EMP-monocyte conjugates in multiple sclerosis*. *Front Biosci* 2004, **9**:3137-3144.
183. Kuenz B, Lutterotti A, Khalil M, Ehling R, Gneiss C, Deisenhammer F, Reindl M, Berger T: *Plasma levels of soluble adhesion molecules sPECAM-1, sP-selectin and*

- sE-selectin are associated with relapsing-remitting disease course of multiple sclerosis.* J Neuroimmunol 2005, **167**:143-149.
184. Mossner R, Fassbender K, Kuhnen J, Schwartz A, Hennerici M: *Circulating L-selectin in multiple sclerosis patients with active, gadolinium-enhancing brain plaques.* J Neuroimmunol 1996, **65**:61-65.
 185. Bahbouhi B, Berthelot L, Pettre S, Michel L, Wiertlewski S, Weksler B, Romero IA, Miller F, Couraud PO, Brouard S, et al: *Peripheral blood CD4+ T lymphocytes from multiple sclerosis patients are characterized by higher PSGL-1 expression and transmigration capacity across a human blood-brain barrier-derived endothelial cell line.* J Leukoc Biol 2009, **86**:1049-1063.
 186. Kivisakk P, Mahad DJ, Callahan MK, Trebst C, Tucky B, Wei T, Wu L, Baekkevold ES, Lassmann H, Staugaitis SM, et al: *Human cerebrospinal fluid central memory CD4+ T cells: evidence for trafficking through choroid plexus and meninges via P-selectin.* Proc Natl Acad Sci U S A 2003, **100**:8389-8394.
 187. Dopp JM, Breneman SM, Olschowka JA: *Expression of ICAM-1, VCAM-1, L-selectin, and leukosialin in the mouse central nervous system during the induction and remission stages of experimental allergic encephalomyelitis.* J Neuroimmunol 1994, **54**:129-144.
 188. Doring A, Wild M, Vestweber D, Deutsch U, Engelhardt B: *E- and P-selectin are not required for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 and SJL mice.* J Immunol 2007, **179**:8470-8479.
 189. Engelhardt B, Kempe B, Merfeld-Clauss S, Laschinger M, Furie B, Wild MK, Vestweber D: *P-selectin glycoprotein ligand 1 is not required for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL and C57BL/6 mice.* J Immunol 2005, **175**:1267-1275.
 190. Archelos JJ, Jung S, Rinner W, Lassmann H, Miyasaka M, Hartung HP: *Role of the leukocyte-adhesion molecule L-selectin in experimental autoimmune encephalomyelitis.* J Neurol Sci 1998, **159**:127-134.
 191. Grewal IS, Foellmer HG, Grewal KD, Wang H, Lee WP, Tumas D, Janeway CA, Jr., Flavell RA: *CD62L is required on effector cells for local interactions in the CNS to cause myelin damage in experimental allergic encephalomyelitis.* Immunity 2001, **14**:291-302.
 192. Li O, Liu JQ, Zhang H, Zheng P, Liu Y, Bai XF: *CD62L is required for the priming of encephalitogenic T cells but does not play a major role in the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis.* Scand J Immunol 2006, **64**:117-124.
 193. Uboldi C, Doring A, Alt C, Estess P, Siegelman M, Engelhardt B: *L-Selectin-deficient SJL and C57BL/6 mice are not resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis.* Eur J Immunol 2008, **38**:2156-2167.
 194. Bill R, Doring A, Deutsch U, Engelhardt B: *PSGL-1 is dispensible for the development of active experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL/J mice.* J Neuroimmunol, **232**:207-208.
 195. Brocke S, Piercy C, Steinman L, Weissman IL, Veromaa T: *Antibodies to CD44 and integrin alpha4, but not L-selectin, prevent central nervous system inflammation and experimental encephalomyelitis by blocking secondary leukocyte recruitment.* Proc Natl Acad Sci U S A 1999, **96**:6896-6901.

196. Engelhardt B, Vestweber D, Hallmann R, Schulz M: *E- and P-selectin are not involved in the recruitment of inflammatory cells across the blood-brain barrier in experimental autoimmune encephalomyelitis*. Blood 1997, **90**:4459-4472.
197. Osmers I, Bullard DC, Barnum SR: *PSGL-1 is not required for development of experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Neuroimmunol 2005, **166**:193-196.
198. Kerfoot SM, Norman MU, Lapointe BM, Bonder CS, Zbytnuik L, Kubes P: *Reevaluation of P-selectin and alpha 4 integrin as targets for the treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Immunol 2006, **176**:6225-6234.
199. O'Rourke AM, Wang EY, Salter-Cid L, Huang L, Miller A, Podar E, Gao HF, Jones DS, Linnik MD: *Benefit of inhibiting SSAO in relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Neural Transm 2007, **114**:845-849.
200. Coisne C, Mao W, Engelhardt B: *Cutting edge: Natalizumab blocks adhesion but not initial contact of human T cells to the blood-brain barrier in vivo in an animal model of multiple sclerosis*. J Immunol 2009, **182**:5909-5913.
201. Elovaara I, Ukkonen M, Leppakynnas M, Lehtimaki T, Luomala M, Peltola J, Dastidar P: *Adhesion molecules in multiple sclerosis: relation to subtypes of disease and methylprednisolone therapy*. Arch Neurol 2000, **57**:546-551.
202. Bauer M, Brakebusch C, Coisne C, Sixt M, Wekerle H, Engelhardt B, Fassler R: *Beta1 integrins differentially control extravasation of inflammatory cell subsets into the CNS during autoimmunity*. Proc Natl Acad Sci U S A 2009, **106**:1920-1925.
203. Liu L, Kubes P: *Molecular mechanisms of leukocyte recruitment: organ-specific mechanisms of action*. Thromb Haemost 2003, **89**:213-220.
204. Engelhardt B: *Immune cell entry into the central nervous system: involvement of adhesion molecules and chemokines*. J Neurol Sci 2008, **274**:23-26.
205. Conti P, Barbacane RC, Reale M: *Chemokines in inflammatory states*. Allergy Asthma Proc 1999, **20**:205-208.
206. Moser B, Wolf M, Walz A, Loetscher P: *Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control*. Trends Immunol 2004, **25**:75-84.
207. Bajetto A, Bonavia R, Barbero S, Florio T, Schettini G: *Chemokines and their receptors in the central nervous system*. Front Neuroendocrinol 2001, **22**:147-184.
208. Savarin-Vuaillet C, Ransohoff RM: *Chemokines and chemokine receptors in neurological disease: raise, retain, or reduce?* Neurotherapeutics 2007, **4**:590-601.
209. Rossi DL, Hurst SD, Xu Y, Wang W, Menon S, Coffman RL, Zlotnik A: *Lungkine, a novel CXC chemokine, specifically expressed by lung bronchoepithelial cells*. J Immunol 1999, **162**:5490-5497.
210. Mellado M, Rodriguez-Frade JM, Manes S, Martinez AC: *Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation*. Annu Rev Immunol 2001, **19**:397-421.
211. Wong MM, Fish EN: *Chemokines: attractive mediators of the immune response*. Semin Immunol 2003, **15**:5-14.
212. Liu QH, Williams DA, McManus C, Baribaud F, Doms RW, Schols D, De Clercq E, Kotlikoff MI, Collman RG, Freedman BD: *HIV-1 gp120 and chemokines activate ion channels in primary macrophages through CCR5 and CXCR4 stimulation*. Proc Natl Acad Sci U S A 2000, **97**:4832-4837.
213. Thelen M: *Dancing to the tune of chemokines*. Nat Immunol 2001, **2**:129-134.

214. Domanska UM, Kruizinga RC, den Dunnen WF, Timmer-Bosscha H, de Vries EG, Walenkamp AM: *The chemokine network, a newly discovered target in high grade gliomas*. Crit Rev Oncol Hematol 2010.
215. Wu Y, Yoder A: *Chemokine coreceptor signaling in HIV-1 infection and pathogenesis*. PLoS Pathog 2009, **5**:e1000520.
216. Ma YC, Huang J, Ali S, Lowry W, Huang XY: *Src tyrosine kinase is a novel direct effector of G proteins*. Cell 2000, **102**:635-646.
217. Wan Y, Kurosaki T, Huang XY: *Tyrosine kinases in activation of the MAP kinase cascade by G-protein-coupled receptors*. Nature 1996, **380**:541-544.
218. Murdoch C, Finn A: *Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases*. Blood 2000, **95**:3032-3043.
219. Cartier L, Hartley O, Dubois-Dauphin M, Krause KH: *Chemokine receptors in the central nervous system: role in brain inflammation and neurodegenerative diseases*. Brain Res Brain Res Rev 2005, **48**:16-42.
220. Lim JK, Murphy PM: *Chemokine control of West Nile virus infection*. Exp Cell Res 2011, **317**:569-574.
221. Sorce S, Myburgh R, Krause KH: *The chemokine receptor CCR5 in the central nervous system*. Prog Neurobiol 2011, **93**:297-311.
222. Gabuzda D, He J, Ohagen A, Vallat AV: *Chemokine receptors in HIV-1 infection of the central nervous system*. Semin Immunol 1998, **10**:203-213.
223. Hesselgesser J, Horuk R: *Chemokine and chemokine receptor expression in the central nervous system*. J Neurovirol 1999, **5**:13-26.
224. Mennicken F, Maki R, de Souza EB, Quirion R: *Chemokines and chemokine receptors in the CNS: a possible role in neuroinflammation and patterning*. Trends Pharmacol Sci 1999, **20**:73-78.
225. Xia MQ, Hyman BT: *Chemokines/chemokine receptors in the central nervous system and Alzheimer's disease*. J Neurovirol 1999, **5**:32-41.
226. Bacon KB, Harrison JK: *Chemokines and their receptors in neurobiology: perspectives in physiology and homeostasis*. J Neuroimmunol 2000, **104**:92-97.
227. Anthony DC, Blond D, Dempster R, Perry VH: *Chemokine targets in acute brain injury and disease*. Prog Brain Res 2001, **132**:507-524.
228. Liu MT, Lane TE: *Chemokine expression and viral infection of the central nervous system: regulation of host defense and neuropathology*. Immunol Res 2001, **24**:111-119.
229. Trebst C, Ransohoff RM: *Investigating chemokines and chemokine receptors in patients with multiple sclerosis: opportunities and challenges*. Arch Neurol 2001, **58**:1975-1980.
230. Cotter R, Williams C, Ryan L, Erichsen D, Lopez A, Peng H, Zheng J: *Fractalkine (CX3CL1) and brain inflammation: Implications for HIV-1-associated dementia*. J Neurovirol 2002, **8**:585-598.
231. Elhofy A, Kennedy KJ, Fife BT, Karpus WJ: *Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by chemokines and chemokine receptors*. Immunol Res 2002, **25**:167-175.

232. Glass WG, Chen BP, Liu MT, Lane TE: *Mouse hepatitis virus infection of the central nervous system: chemokine-mediated regulation of host defense and disease*. *Viral Immunol* 2002, **15**:261-272.
233. Owens T, Babcock AA, Millward JM, Toft-Hansen H: *Cytokine and chemokine inter-regulation in the inflamed or injured CNS*. *Brain Res Brain Res Rev* 2005, **48**:178-184.
234. Hamann I, Zipp F, Infante-Duarte C: *Therapeutic targeting of chemokine signaling in Multiple Sclerosis*. *J Neurol Sci* 2008, **274**:31-38.
235. Erickson MA, Banks WA: *Cytokine and chemokine responses in serum and brain after single and repeated injections of lipopolysaccharide: Multiplex quantification with path analysis*. *Brain Behav Immun* 2011.
236. Kim HY, Kim HK, Kim JR, Kim HS: *Upregulation of LPS-induced chemokine KC expression by 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 in mouse peritoneal macrophages*. *Immunol Cell Biol* 2005, **83**:286-293.
237. Gunsolly C, Nicholson JD, Listwak SJ, Ledee D, Zelenka P, Verthelyi D, Chapoval S, Keegan A, Tonelli LH: *Expression and regulation in the brain of the chemokine CCL27 gene locus*. *J Neuroimmunol* 2010, **225**:82-90.
238. Kallankari H, Kaukola T, Ojaniemi M, Herva R, Perhomaa M, Vuolteenaho R, Kingsmore SF, Hallman M: *Chemokine CCL18 predicts intraventricular hemorrhage in very preterm infants*. *Ann Med* 2010, **42**:416-425.
239. Fukumoto N, Shimaoka T, Fujimura H, Sakoda S, Tanaka M, Kita T, Yonehara S: *Critical roles of CXC chemokine ligand 16/scavenger receptor that binds phosphatidylserine and oxidized lipoprotein in the pathogenesis of both acute and adoptive transfer experimental autoimmune encephalomyelitis*. *J Immunol* 2004, **173**:1620-1627.
240. Yamamoto T, Yamashita A, Yamada K, Hata R: *Immunohistochemical localization of chemokine CXCL14 in rat hypothalamic neurons*. *Neurosci Lett* 2011, **487**:335-340.
241. Kim BO, Liu Y, Zhou BY, He JJ: *Induction of C chemokine XCL1 (lymphotactin/single C motif-1 alpha/activation-induced, T cell-derived and chemokine-related cytokine) expression by HIV-1 Tat protein*. *J Immunol* 2004, **172**:1888-1895.
242. Szczucinski A, Losy J: *Chemokines and chemokine receptors in multiple sclerosis. Potential targets for new therapies*. *Acta Neurol Scand* 2007, **115**:137-146.
243. Kalinowska-Lyszczarz A, Szczucinski A, Pawlak MA, Losy J: *Clinical study on CXCL13, CCL17, CCL20 and IL-17 as immune cell migration navigators in relapsing-remitting multiple sclerosis patients*. *J Neurol Sci* 2011, **300**:81-85.
244. Graber JJ, McGraw CA, Kimbrough D, Dhib-Jalbut S: *Overlapping and distinct mechanisms of action of multiple sclerosis therapies*. *Clin Neurol Neurosurg* 2010, **112**:583-591.
245. Reuss R, Schreiber V, Klein A, Infante-Duarte C, Filippi M, Pabst W, Pohl C, Oschmann P: *No significant effect of orally administered chemokine receptor 1 antagonist on intercellular adhesion molecule-3 expression in relapsing--remitting multiple sclerosis patients*. *Mult Scler* 2010, **16**:366-369.
246. Ifergan I, Kebir H, Alvarez JI, Marceau G, Bernard M, Bourbonniere L, Poirier J, Duquette P, Talbot PJ, Arbour N, Prat A: *Central nervous system recruitment of*

- effector memory CD8+ T lymphocytes during neuroinflammation is dependent on alpha4 integrin.* Brain, **134**:3560-3577.
247. Cardona AE, Sasse ME, Liu L, Cardona SM, Mizutani M, Savarin C, Hu T, Ransohoff RM: *Scavenging roles of chemokine receptors: chemokine receptor deficiency is associated with increased levels of ligand in circulation and tissues.* Blood 2008, **112**:256-263.
248. Subileau EA, Rezaie P, Davies HA, Colyer FM, Greenwood J, Male DK, Romero IA: *Expression of chemokines and their receptors by human brain endothelium: implications for multiple sclerosis.* J Neuropathol Exp Neurol 2009, **68**:227-240.
249. Brini E, Ruffini F, Bergami A, Brambilla E, Dati G, Greco B, Cirillo R, Proudfoot AE, Comi G, Furlan R, et al: *Administration of a monomeric CCL2 variant to EAE mice inhibits inflammatory cell recruitment and protects from demyelination and axonal loss.* J Neuroimmunol 2009, **209**:33-39.
250. Dos Santos AC, Roffe E, Arantes RM, Juliano L, Pesquero JL, Pesquero JB, Bader M, Teixeira MM, Carvalho-Tavares J: *Kinin B2 receptor regulates chemokines CCL2 and CCL5 expression and modulates leukocyte recruitment and pathology in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in mice.* J Neuroinflammation 2008, **5**:49.
251. Muzio L, Cavasinni F, Marinaro C, Bergamaschi A, Bergami A, Porcheri C, Cerri F, Dina G, Quattrini A, Comi G, et al: *Cxcl10 enhances blood cells migration in the sub-ventricular zone of mice affected by experimental autoimmune encephalomyelitis.* Mol Cell Neurosci 2010, **43**:268-280.
252. Dogan RN, Elhofy A, Karpus WJ: *Production of CCL2 by central nervous system cells regulates development of murine experimental autoimmune encephalomyelitis through the recruitment of TNF- and iNOS-expressing macrophages and myeloid dendritic cells.* J Immunol 2008, **180**:7376-7384.
253. Ukkonen M, Wu K, Reipert B, Dastidar P, Elovaara I: *Cell surface adhesion molecules and cytokine profiles in primary progressive multiple sclerosis.* Mult Scler 2007, **13**:701-707.
254. Tanuma N, Sakuma H, Sasaki A, Matsumoto Y: *Chemokine expression by astrocytes plays a role in microglia/macrophage activation and subsequent neurodegeneration in secondary progressive multiple sclerosis.* Acta Neuropathol 2006, **112**:195-204.
255. Malmstrom C, Andersson BA, Haghighi S, Lycke J: *IL-6 and CCL2 levels in CSF are associated with the clinical course of MS: implications for their possible immunopathogenic roles.* J Neuroimmunol 2006, **175**:176-182.
256. Matsumo Y, Sakuma H, Miyakoshi A, Tsukada Y, Kohyama K, Park IK, Tanuma N: *Characterization of relapsing autoimmune encephalomyelitis and its treatment with decoy chemokine receptor genes.* J Neuroimmunol 2005, **170**:49-61.
257. dos Santos AC, Barsante MM, Arantes RM, Bernard CC, Teixeira MM, Carvalho-Tavares J: *CCL2 and CCL5 mediate leukocyte adhesion in experimental autoimmune encephalomyelitis--an intravital microscopy study.* J Neuroimmunol 2005, **162**:122-129.
258. Sorensen TL, Ransohoff RM, Strieter RM, Sellebjerg F: *Chemokine CCL2 and chemokine receptor CCR2 in early active multiple sclerosis.* Eur J Neurol 2004, **11**:445-449.

259. Nakajima H, Sugino M, Kimura F, Hanafusa T, Ikemoto T, Shimizu A: *Decreased CD14+CCR2+ monocytes in active multiple sclerosis*. *Neurosci Lett* 2004, **363**:187-189.
260. Mahad DJ, Ransohoff RM: *The role of MCP-1 (CCL2) and CCR2 in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)*. *Semin Immunol* 2003, **15**:23-32.
261. Alt C, Laschinger M, Engelhardt B: *Functional expression of the lymphoid chemokines CCL19 (ELC) and CCL 21 (SLC) at the blood-brain barrier suggests their involvement in G-protein-dependent lymphocyte recruitment into the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis*. *Eur J Immunol* 2002, **32**:2133-2144.
262. Huang DR, Wang J, Kivisakk P, Rollins BJ, Ransohoff RM: *Absence of monocyte chemoattractant protein 1 in mice leads to decreased local macrophage recruitment and antigen-specific T helper cell type 1 immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis*. *J Exp Med* 2001, **193**:713-726.
263. Franciotta D, Martino G, Zardini E, Furlan R, Bergamaschi R, Andreoni L, Cosi V: *Serum and CSF levels of MCP-1 and IP-10 in multiple sclerosis patients with acute and stable disease and undergoing immunomodulatory therapies*. *J Neuroimmunol* 2001, **115**:192-198.
264. Simpson J, Rezaie P, Newcombe J, Cuzner ML, Male D, Woodroffe MN: *Expression of the beta-chemokine receptors CCR2, CCR3 and CCR5 in multiple sclerosis central nervous system tissue*. *J Neuroimmunol* 2000, **108**:192-200.
265. Nygardas PT, Maatta JA, Hinkkanen AE: *Chemokine expression by central nervous system resident cells and infiltrating neutrophils during experimental autoimmune encephalomyelitis in the BALB/c mouse*. *Eur J Immunol* 2000, **30**:1911-1918.
266. Fischer FR, Santambrogio L, Luo Y, Berman MA, Hancock WW, Dorf ME: *Modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis: effect of altered peptide ligand on chemokine and chemokine receptor expression*. *J Neuroimmunol* 2000, **110**:195-208.
267. Fife BT, Huffnagle GB, Kuziel WA, Karpus WJ: *CC chemokine receptor 2 is critical for induction of experimental autoimmune encephalomyelitis*. *J Exp Med* 2000, **192**:899-905.
268. Youssef S, Wildbaum G, Karin N: *Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by MIP-1alpha and MCP-1 naked DNA vaccines*. *J Autoimmun* 1999, **13**:21-29.
269. Van Der Voorn P, Tekstra J, Beelen RH, Tensen CP, Van Der Valk P, De Groot CJ: *Expression of MCP-1 by reactive astrocytes in demyelinating multiple sclerosis lesions*. *Am J Pathol* 1999, **154**:45-51.
270. Youssef S, Wildbaum G, Maor G, Lanir N, Gour-Lavie A, Grabie N, Karin N: *Long-lasting protective immunity to experimental autoimmune encephalomyelitis following vaccination with naked DNA encoding C-C chemokines*. *J Immunol* 1998, **161**:3870-3879.
271. Karpus WJ, Lukacs NW, McRae BL, Strieter RM, Kunkel SL, Miller SD: *An important role for the chemokine macrophage inflammatory protein-1 alpha in the pathogenesis of the T cell-mediated autoimmune disease, experimental autoimmune encephalomyelitis*. *J Immunol* 1995, **155**:5003-5010.

272. Glabinski AR, Tani M, Tuohy VK, Tuthill RJ, Ransohoff RM: *Central nervous system chemokine mRNA accumulation follows initial leukocyte entry at the onset of acute murine experimental autoimmune encephalomyelitis*. Brain Behav Immun 1995, **9**:315-330.
273. Franciotta D, Zardini E, Ravaglia S, Piccolo G, Andreoni L, Bergamaschi R, Romani A, Tavazzi E, Naldi P, Ceroni M, Marchioni E: *Cytokines and chemokines in cerebrospinal fluid and serum of adult patients with acute disseminated encephalomyelitis*. J Neurol Sci 2006, **247**:202-207.
274. Nakajima H, Fukuda K, Doi Y, Sugino M, Kimura F, Hanafusa T, Ikemoto T, Shimizu A: *Expression of TH1/TH2-related chemokine receptors on peripheral T cells and correlation with clinical disease activity in patients with multiple sclerosis*. Eur Neurol 2004, **52**:162-168.
275. Hofmann N, Lachnit N, Streppel M, Witter B, Neiss WF, Guntinas-Lichius O, Angelov DN: *Increased expression of ICAM-1, VCAM-1, MCP-1, and MIP-1 alpha by spinal perivascular macrophages during experimental allergic encephalomyelitis in rats*. BMC Immunol 2002, **3**:11.
276. Tran EH, Kuziel WA, Owens T: *Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice deficient in either the chemokine macrophage inflammatory protein-1alpha or its CCR5 receptor*. Eur J Immunol 2000, **30**:1410-1415.
277. Kennedy KJ, Strieter RM, Kunkel SL, Lukacs NW, Karpus WJ: *Acute and relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis are regulated by differential expression of the CC chemokines macrophage inflammatory protein-1alpha and monocyte chemoattractant protein-1*. J Neuroimmunol 1998, **92**:98-108.
278. Miyagishi R, Kikuchi S, Takayama C, Inoue Y, Tashiro K: *Identification of cell types producing RANTES, MIP-1 alpha and MIP-1 beta in rat experimental autoimmune encephalomyelitis by in situ hybridization*. J Neuroimmunol 1997, **77**:17-26.
279. Boven LA, Montagne L, Nottet HS, De Groot CJ: *Macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha), MIP-1beta, and RANTES mRNA semiquantification and protein expression in active demyelinating multiple sclerosis (MS) lesions*. Clin Exp Immunol 2000, **122**:257-263.
280. Szczucinski A, Losy J: *CCL5, CXCL10 and CXCL11 chemokines in patients with active and stable relapsing-remitting multiple sclerosis*. Neuroimmunomodulation 2011, **18**:67-72.
281. Rentzos M, Nikolaou C, Rombos A, Evangelopoulos ME, Dimitrakopoulos A, Kararizou E, Koutsis G, Zoga M, Tsoutsou A, Sfingos K: *Circulating interleukin-15 and RANTES chemokine in MS patients: effect of treatment with methylprednisolone in patients with relapse*. Neurol Res 2010, **32**:684-689.
282. Jia Y, Li H, Chen W, Li M, Lv M, Feng P, Hu H, Zhang L: *Prevention of murine experimental autoimmune encephalomyelitis by in vivo expression of a novel recombinant immunotoxin DT390-RANTES*. Gene Ther 2006, **13**:1351-1359.
283. Matsui M, Weaver J, Proudfoot AE, Wujek JR, Wei T, Richer E, Trapp BD, Rao A, Ransohoff RM: *Treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis with the chemokine receptor antagonist Met-RANTES*. J Neuroimmunol 2002, **128**:16-22.

284. Martinez-Caceres EM, Espejo C, Brieva L, Pericot I, Tintore M, Saez-Torres I, Montalban X: *Expression of chemokine receptors in the different clinical forms of multiple sclerosis*. *Mult Scler* 2002, **8**:390-395.
285. Kuwabara T, Ishikawa F, Yasuda T, Aritomi K, Nakano H, Tanaka Y, Okada Y, Lipp M, Kakiuchi T: *CCR7 ligands are required for development of experimental autoimmune encephalomyelitis through generating IL-23-dependent Th17 cells*. *J Immunol* 2009, **183**:2513-2521.
286. Krumbholz M, Theil D, Steinmeyer F, Cepok S, Hemmer B, Hofbauer M, Farina C, Derfuss T, Junker A, Arzberger T, et al: *CCL19 is constitutively expressed in the CNS, up-regulated in neuroinflammation, active and also inactive multiple sclerosis lesions*. *J Neuroimmunol* 2007, **190**:72-79.
287. Bagaeva LV, Rao P, Powers JM, Segal BM: *CXC chemokine ligand 13 plays a role in experimental autoimmune encephalomyelitis*. *J Immunol* 2006, **176**:7676-7685.
288. Columba-Cabezas S, Serafini B, Ambrosini E, Aloisi F: *Lymphoid chemokines CCL19 and CCL21 are expressed in the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for the maintenance of chronic neuroinflammation*. *Brain Pathol* 2003, **13**:38-51.
289. Villares R, Cadenas V, Lozano M, Almonacid L, Zaballos A, Martinez AC, Varona R: *CCR6 regulates EAE pathogenesis by controlling regulatory CD4+ T-cell recruitment to target tissues*. *Eur J Immunol* 2009, **39**:1671-1681.
290. Liston A, Kohler RE, Townley S, Haylock-Jacobs S, Comerford I, Caon AC, Webster J, Harrison JM, Swann J, Clark-Lewis I, et al: *Inhibition of CCR6 function reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis via effects on the priming phase of the immune response*. *J Immunol* 2009, **182**:3121-3130.
291. Kalinowska A, Losy J: *Investigational C-C chemokine receptor 2 antagonists for the treatment of autoimmune diseases*. *Expert Opin Investig Drugs* 2008, **17**:1267-1279.
292. Ambrosini E, Remoli ME, Giacomini E, Rosicarelli B, Serafini B, Lande R, Aloisi F, Coccia EM: *Astrocytes produce dendritic cell-attracting chemokines in vitro and in multiple sclerosis lesions*. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005, **64**:706-715.
293. Kohler RE, Caon AC, Willenborg DO, Clark-Lewis I, McColl SR: *A role for macrophage inflammatory protein-3 alpha/CC chemokine ligand 20 in immune priming during T cell-mediated inflammation of the central nervous system*. *J Immunol* 2003, **170**:6298-6306.
294. Ambrosini E, Columba-Cabezas S, Serafini B, Muscella A, Aloisi F: *Astrocytes are the major intracerebral source of macrophage inflammatory protein-3alpha/CCL20 in relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis and in vitro*. *Glia* 2003, **41**:290-300.
295. Forde EA, Dogan RN, Karpus WJ: *CCR4 contributes to the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis by regulating inflammatory macrophage function*. *J Neuroimmunol* 2011.
296. Dogan RN, Long N, Forde E, Dennis K, Kohm AP, Miller SD, Karpus WJ: *CCL22 regulates experimental autoimmune encephalomyelitis by controlling inflammatory macrophage accumulation and effector function*. *J Leukoc Biol* 2011, **89**:93-104.
297. Filipovic R, Jakovcevski I, Zecevic N: *GRO-alpha and CXCR2 in the human fetal brain and multiple sclerosis lesions*. *Dev Neurosci* 2003, **25**:279-290.

298. Glabinski AR, Tuohy VK, Ransohoff RM: *Expression of chemokines RANTES, MIP-1alpha and GRO-alpha correlates with inflammation in acute experimental autoimmune encephalomyelitis*. Neuroimmunomodulation 1998, **5**:166-171.
299. Glabinski AR, Tani M, Strieter RM, Tuohy VK, Ransohoff RM: *Synchronous synthesis of alpha- and beta-chemokines by cells of diverse lineage in the central nervous system of mice with relapses of chronic experimental autoimmune encephalomyelitis*. Am J Pathol 1997, **150**:617-630.
300. Godiska R, Chantry D, Dietsch GN, Gray PW: *Chemokine expression in murine experimental allergic encephalomyelitis*. J Neuroimmunol 1995, **58**:167-176.
301. Omari KM, John G, Lango R, Raine CS: *Role for CXCR2 and CXCL1 on glia in multiple sclerosis*. Glia 2006, **53**:24-31.
302. Luo Y, Fischer FR, Hancock WW, Dorf ME: *Macrophage inflammatory protein-2 and KC induce chemokine production by mouse astrocytes*. J Immunol 2000, **165**:4015-4023.
303. Omari KM, Lutz SE, Santambrogio L, Lira SA, Raine CS: *Neuroprotection and remyelination after autoimmune demyelination in mice that inducibly overexpress CXCL1*. Am J Pathol 2009, **174**:164-176.
304. Archambault AS, Sim J, McCandless EE, Klein RS, Russell JH: *Region-specific regulation of inflammation and pathogenesis in experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Neuroimmunol 2006, **181**:122-132.
305. Carter SL, Muller M, Manders PM, Campbell IL: *Induction of the genes for Cxcl9 and Cxcl10 is dependent on IFN-gamma but shows differential cellular expression in experimental autoimmune encephalomyelitis and by astrocytes and microglia in vitro*. Glia 2007, **55**:1728-1739.
306. McColl SR, Mahalingam S, Staykova M, Tylaska LA, Fisher KE, Strick CA, Gladue RP, Neote KS, Willenborg DO: *Expression of rat I-TAC/CXCL11/SCYA11 during central nervous system inflammation: comparison with other CXCR3 ligands*. Lab Invest 2004, **84**:1418-1429.
307. Klein RS, Izikson L, Means T, Gibson HD, Lin E, Sobel RA, Weiner HL, Luster AD: *IFN-inducible protein 10/CXC chemokine ligand 10-independent induction of experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Immunol 2004, **172**:550-559.
308. Karpus WJ, Fife BT, Kennedy KJ: *Immunoneutralization of chemokines for the prevention and treatment of central nervous system autoimmune disease*. Methods 2003, **29**:362-368.
309. Scarpini E, Galimberti D, Baron P, Clerici R, Ronzoni M, Conti G, Scarlato G: *IP-10 and MCP-1 levels in CSF and serum from multiple sclerosis patients with different clinical subtypes of the disease*. J Neurol Sci 2002, **195**:41-46.
310. Mahad DJ, Howell SJ, Woodroffe MN: *Expression of chemokines in the CSF and correlation with clinical disease activity in patients with multiple sclerosis*. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2002, **72**:498-502.
311. Fife BT, Kennedy KJ, Paniagua MC, Lukacs NW, Kunkel SL, Luster AD, Karpus WJ: *CXCL10 (IFN-gamma-inducible protein-10) control of encephalitogenic CD4+ T cell accumulation in the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Immunol 2001, **166**:7617-7624.
312. Sorensen TL, Tani M, Jensen J, Pierce V, Lucchinetti C, Folcik VA, Qin S, Rottman J, Sellebjerg F, Strieter RM, et al: *Expression of specific chemokines and*

- chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. J Clin Invest* 1999, **103**:807-815.
313. Byrne FR, Winters A, Brankow D, Hu S, Juan T, Steavenson S, Doellgast G, Kuchimanchi K, Brown H, Anderson S, et al: *An antibody to IP-10 is a potent antagonist of cell migration in vitro and in vivo and does not affect disease in several animal models of inflammation. Autoimmunity* 2009, **42**:171-182.
 314. Narumi S, Kaburaki T, Yoneyama H, Iwamura H, Kobayashi Y, Matsushima K: *Neutralization of IFN-inducible protein 10/CXCL10 exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis. Eur J Immunol* 2002, **32**:1784-1791.
 315. Miljkovic D, Stanojevic Z, Momcilovic M, Odoardi F, Flugel A, Mostarica-Stojkovic M: *CXCL12 expression within the CNS contributes to the resistance against experimental autoimmune encephalomyelitis in Albino Oxford rats. Immunobiology* 2011.
 316. Meiron M, Zohar Y, Anunu R, Wildbaum G, Karin N: *CXCL12 (SDF-1alpha) suppresses ongoing experimental autoimmune encephalomyelitis by selecting antigen-specific regulatory T cells. J Exp Med* 2008, **205**:2643-2655.
 317. McCandless EE, Piccio L, Woerner BM, Schmidt RE, Rubin JB, Cross AH, Klein RS: *Pathological expression of CXCL12 at the blood-brain barrier correlates with severity of multiple sclerosis. Am J Pathol* 2008, **172**:799-808.
 318. Krumbholz M, Theil D, Cepok S, Hemmer B, Kivisakk P, Ransohoff RM, Hofbauer M, Farina C, Derfuss T, Hartle C, et al: *Chemokines in multiple sclerosis: CXCL12 and CXCL13 up-regulation is differentially linked to CNS immune cell recruitment. Brain* 2006, **129**:200-211.
 319. Ragheb S, Li Y, Simon K, Vanhaerents S, Galimberti D, De Riz M, Fenoglio C, Scarpini E, Lisak R: *Multiple sclerosis: BAFF and CXCL13 in cerebrospinal fluid. Mult Scler* 2011, **17**:819-829.
 320. Khademi M, Kockum I, Andersson ML, Iacobaeus E, Brundin L, Sellebjerg F, Hillert J, Piehl F, Olsson T: *Cerebrospinal fluid CXCL13 in multiple sclerosis: a suggestive prognostic marker for the disease course. Mult Scler* 2011, **17**:335-343.
 321. Sellebjerg F, Bornsen L, Khademi M, Krakauer M, Olsson T, Frederiksen JL, Sorensen PS: *Increased cerebrospinal fluid concentrations of the chemokine CXCL13 in active MS. Neurology* 2009, **73**:2003-2010.
 322. Magliozzi R, Columba-Cabezas S, Serafini B, Aloisi F: *Intracerebral expression of CXCL13 and BAFF is accompanied by formation of lymphoid follicle-like structures in the meninges of mice with relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. J Neuroimmunol* 2004, **148**:11-23.
 323. Kastenbauer S, Koedel U, Wick M, Kieseier BC, Hartung HP, Pfister HW: *CSF and serum levels of soluble fractalkine (CX3CL1) in inflammatory diseases of the nervous system. J Neuroimmunol* 2003, **137**:210-217.
 324. Eltayeb S, Berg AL, Lassmann H, Wallstrom E, Nilsson M, Olsson T, Ericsson-Dahlstrand A, Sunnemark D: *Temporal expression and cellular origin of CC chemokine receptors CCR1, CCR2 and CCR5 in the central nervous system: insight into mechanisms of MOG-induced EAE. J Neuroinflammation* 2007, **4**:14.
 325. Zipp F, Hartung HP, Hillert J, Schimrigk S, Trebst C, Stangel M, Infante-Duarte C, Jakobs P, Wolf C, Sandbrink R, et al: *Blockade of chemokine signaling in patients with multiple sclerosis. Neurology* 2006, **67**:1880-1883.

326. Mahad D, Trebst C, Staugaitis SM, Kivisakk P, Tucky B, Wei T, Horuk R, Ransohoff RM: *Preliminary observations on CC chemokine receptor expression by mononuclear phagocytes in multiple sclerosis lesions: effect of lesion heterogeneity.* Ernst Schering Res Found Workshop 2004;59-68.
327. Sunnemark D, Eltayeb S, Wallstrom E, Appelsved L, Malmberg A, Lassmann H, Ericsson-Dahlstrand A, Piehl F, Olsson T: *Differential expression of the chemokine receptors CX3CR1 and CCR1 by microglia and macrophages in myelin-oligodendrocyte-glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis.* Brain Pathol 2003, **13**:617-629.
328. Putheti P, Morris M, Stawiarz L, Teleshova N, Kivisakk P, Pashenkov M, Kouwenhoven M, Wiberg MK, Bronge L, Huang YM, et al: *Multiple sclerosis: a study of chemokine receptors and regulatory T cells in relation to MRI variables.* Eur J Neurol 2003, **10**:529-535.
329. Eltayeb S, Sunnemark D, Berg AL, Nordvall G, Malmberg A, Lassmann H, Wallstrom E, Olsson T, Ericsson-Dahlstrand A: *Effector stage CC chemokine receptor-1 selective antagonism reduces multiple sclerosis-like rat disease.* J Neuroimmunol 2003, **142**:75-85.
330. Glabinski AR, Bielecki B, O'Bryant S, Selmaj K, Ransohoff RM: *Experimental autoimmune encephalomyelitis: CC chemokine receptor expression by trafficking cells.* J Autoimmun 2002, **19**:175-181.
331. Trebst C, Sorensen TL, Kivisakk P, Cathcart MK, Hesselgesser J, Horuk R, Sellebjerg F, Lassmann H, Ransohoff RM: *CCR1+/CCR5+ mononuclear phagocytes accumulate in the central nervous system of patients with multiple sclerosis.* Am J Pathol 2001, **159**:1701-1710.
332. Misu T, Onodera H, Fujihara K, Matsushima K, Yoshie O, Okita N, Takase S, Itoyama Y: *Chemokine receptor expression on T cells in blood and cerebrospinal fluid at relapse and remission of multiple sclerosis: imbalance of Th1/Th2-associated chemokine signaling.* J Neuroimmunol 2001, **114**:207-212.
333. Rottman JB, Slavin AJ, Silva R, Weiner HL, Gerard CG, Hancock WW: *Leukocyte recruitment during onset of experimental allergic encephalomyelitis is CCR1 dependent.* Eur J Immunol 2000, **30**:2372-2377.
334. Park IK, Hiraki K, Kohyama K, Matsumoto Y: *Differential effects of decoy chemokine (7ND) gene therapy on acute, biphasic and chronic autoimmune encephalomyelitis: implication for pathomechanisms of lesion formation.* J Neuroimmunol 2008, **194**:34-43.
335. Nakajima H, Sugino M, Kimura F, Hanafusa T, Ikemoto T, Shimizu A: *Increased Intrathecal Chemokine Receptor CCR2 Expression in Multiple Sclerosis.* Biomark Insights 2007, **2**:463-468.
336. Gaupp S, Pitt D, Kuziel WA, Cannella B, Raine CS: *Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in CCR2(-/-) mice: susceptibility in multiple strains.* Am J Pathol 2003, **162**:139-150.
337. Sorensen TL, Sellebjerg F, Jensen CV, Strieter RM, Ransohoff RM: *Chemokines CXCL10 and CCL2: differential involvement in intrathecal inflammation in multiple sclerosis.* Eur J Neurol 2001, **8**:665-672.
338. Izikson L, Klein RS, Charo IF, Weiner HL, Luster AD: *Resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis in mice lacking the CC chemokine receptor (CCR)2.* J Exp Med 2000, **192**:1075-1080.

339. Fife BT, Paniagua MC, Lukacs NW, Kunkel SL, Karpus WJ: *Selective CC chemokine receptor expression by central nervous system-infiltrating encephalitogenic T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Neurosci Res 2001, **66**:705-714.
340. Andalib A, Doulabi H, Najafi M, Tazhibi M, Rezaie A: *Expression of Chemokine Receptors on Th1/Th2 CD4+ Lymphocytes in Patients with Multiple Sclerosis*. Iran J Immunol 2011, **8**:1-10.
341. Zheng HM, Jiang Y, Wang JR, Gong XL, Guo BY: *Mimic peptides bonding specifically with the first and second extracellular loops of the CC chemokine receptor 5 derived from a phage display peptide library are potent inhibitors of experimental autoimmune encephalomyelitis*. Inflamm Res 2011, **60**:759-767.
342. Ni J, Zhu YN, Zhong XG, Ding Y, Hou LF, Tong XK, Tang W, Ono S, Yang YF, Zuo JP: *The chemokine receptor antagonist, TAK-779, decreased experimental autoimmune encephalomyelitis by reducing inflammatory cell migration into the central nervous system, without affecting T cell function*. Br J Pharmacol 2009, **158**:2046-2056.
343. Sellebjerg F, Kristiansen TB, Wittenhagen P, Garred P, Eugen-Olsen J, Frederiksen JL, Sorensen TL: *Chemokine receptor CCR5 in interferon-treated multiple sclerosis*. Acta Neurol Scand 2007, **115**:413-418.
344. Mahad DJ, Trebst C, Kivisakk P, Staugaitis SM, Tucky B, Wei T, Lucchinetti CF, Lassmann H, Ransohoff RM: *Expression of chemokine receptors CCR1 and CCR5 reflects differential activation of mononuclear phagocytes in pattern II and pattern III multiple sclerosis lesions*. J Neuropathol Exp Neurol 2004, **63**:262-273.
345. Sorensen TL, Sellebjerg F: *Distinct chemokine receptor and cytokine expression profile in secondary progressive MS*. Neurology 2001, **57**:1371-1376.
346. Reboldi A, Coisne C, Baumjohann D, Benvenuto F, Bottinelli D, Lira S, Uccelli A, Lanzavecchia A, Engelhardt B, Sallusto F: *C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE*. Nat Immunol 2009, **10**:514-523.
347. Kivisakk P, Trebst C, Liu Z, Tucky BH, Sorensen TL, Rudick RA, Mack M, Ransohoff RM: *T-cells in the cerebrospinal fluid express a similar repertoire of inflammatory chemokine receptors in the absence or presence of CNS inflammation: implications for CNS trafficking*. Clin Exp Immunol 2002, **129**:510-518.
348. Elhofy A, Depaolo RW, Lira SA, Lukacs NW, Karpus WJ: *Mice deficient for CCR6 fail to control chronic experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Neuroimmunol 2009, **213**:91-99.
349. Liu GZ, Fang LB, Hjelmstrom P, Gao XG: *Increased CD8+ central memory T cells in patients with multiple sclerosis*. Mult Scler 2007, **13**:149-155.
350. Bielecki B, Mazurek A, Wolinski P, Glabinski A: *Expression of chemokine receptors CCR7 and CCR8 in the CNS during ChREAE*. Scand J Immunol 2007, **66**:383-392.
351. Pahuja A, Maki RA, Hevezi PA, Chen A, Verge GM, Lechner SM, Roth RB, Zlotnik A, Alleva DG: *Experimental autoimmune encephalomyelitis develops in CC chemokine receptor 7-deficient mice with altered T-cell responses*. Scand J Immunol 2006, **64**:361-369.

352. Kivisakk P, Mahad DJ, Callahan MK, Sikora K, Trebst C, Tucky B, Wujek J, Ravid R, Staugaitis SM, Lassmann H, Ransohoff RM: *Expression of CCR7 in multiple sclerosis: implications for CNS immunity*. Ann Neurol 2004, **55**:627-638.
353. Trebst C, Staugaitis SM, Kivisakk P, Mahad D, Cathcart MK, Tucky B, Wei T, Rani MR, Horuk R, Aldape KD, et al: *CC chemokine receptor 8 in the central nervous system is associated with phagocytic macrophages*. Am J Pathol 2003, **162**:427-438.
354. Bielecki B, Mazurek A, Wolinski P, Glabinski A: *Treatment of multiple sclerosis with methylprednisolone and mitoxantrone modulates the expression of CXC chemokine receptors in PBMC*. J Clin Immunol 2008, **28**:122-130.
355. Glabinski AR, O'Bryant S, Selmaj K, Ransohoff RM: *CXC chemokine receptors expression during chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis*. Ann N Y Acad Sci 2000, **917**:135-144.
356. Kerstetter AE, Padovani-Claudio DA, Bai L, Miller RH: *Inhibition of CXCR2 signaling promotes recovery in models of multiple sclerosis*. Exp Neurol 2009, **220**:44-56.
357. Sporici R, Issekutz TB: *CXCR3 blockade inhibits T-cell migration into the CNS during EAE and prevents development of adoptively transferred, but not actively induced, disease*. Eur J Immunol 2010, **40**:2751-2761.
358. Kohler RE, Comerford I, Townley S, Haylock-Jacobs S, Clark-Lewis I, McColl SR: *Antagonism of the chemokine receptors CXCR3 and CXCR4 reduces the pathology of experimental autoimmune encephalomyelitis*. Brain Pathol 2008, **18**:504-516.
359. Fox RJ, Kivisakk P, Fisher E, Tucky B, Lee JC, Rudick RA, Ransohoff RM: *Multiple sclerosis: chemokine receptor expression on circulating lymphocytes in correlation with radiographic measures of tissue injury*. Mult Scler 2008, **14**:1036-1043.
360. Muller M, Carter SL, Hofer MJ, Manders P, Getts DR, Getts MT, Dreykluft A, Lu B, Gerard C, King NJ, Campbell IL: *CXCR3 signaling reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis by controlling the parenchymal distribution of effector and regulatory T cells in the central nervous system*. J Immunol 2007, **179**:2774-2786.
361. Chen W, Li H, Jia Y, Lv M, Li M, Feng P, Hu H, Zhang L: *In vivo administration of plasmid DNA encoding recombinant immunotoxin DT390-IP-10 attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Autoimmun 2007, **28**:30-40.
362. Liu L, Huang D, Matsui M, He TT, Hu T, Demartino J, Lu B, Gerard C, Ransohoff RM: *Severe disease, unaltered leukocyte migration, and reduced IFN-gamma production in CXCR3^{-/-} mice with experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Immunol 2006, **176**:4399-4409.
363. Mahad DJ, Lawry J, Howell SJ, Woodroffe MN: *Longitudinal study of chemokine receptor expression on peripheral lymphocytes in multiple sclerosis: CXCR3 upregulation is associated with relapse*. Mult Scler 2003, **9**:189-198.
364. Wang HY, Matsui M, Araya S, Onai N, Matsushima K, Saida T: *Chemokine receptors associated with immunity within and outside the central nervous system in early relapsing-remitting multiple sclerosis*. J Neuroimmunol 2002, **133**:184-192.
365. Sorensen TL, Trebst C, Kivisakk P, Klaege KL, Majmudar A, Ravid R, Lassmann H, Olsen DB, Strieter RM, Ransohoff RM, Sellebjerg F: *Multiple sclerosis: a study*

- of *CXCL10* and *CXCR3* co-localization in the inflamed central nervous system. *J Neuroimmunol* 2002, **127**:59-68.
366. Sorensen TL, Sellebjerg F: *Selective suppression of chemokine receptor CXCR3 expression by interferon-beta1a in multiple sclerosis*. *Mult Scler* 2002, **8**:104-107.
367. Moll NM, Cossoy MB, Fisher E, Staugaitis SM, Tucky BH, Rietsch AM, Chang A, Fox RJ, Trapp BD, Ransohoff RM: *Imaging correlates of leukocyte accumulation and CXCR4/CXCL12 in multiple sclerosis*. *Arch Neurol* 2009, **66**:44-53.
368. Cruz-Orengo L, Holman DW, Dorsey D, Zhou L, Zhang P, Wright M, McCandless EE, Patel JR, Luker GD, Littman DR, et al: *CXCR7 influences leukocyte entry into the CNS parenchyma by controlling abluminal CXCL12 abundance during autoimmunity*. *J Exp Med* 2011, **208**:327-339.
369. Huang D, Shi FD, Jung S, Pien GC, Wang J, Salazar-Mather TP, He TT, Weaver JT, Ljunggren HG, Biron CA, et al: *The neuronal chemokine CX3CL1/fractalkine selectively recruits NK cells that modify experimental autoimmune encephalomyelitis within the central nervous system*. *FASEB J* 2006, **20**:896-905.
370. Infante-Duarte C, Weber A, Kratzschmar J, Prozorovski T, Pikol S, Hamann I, Bellmann-Strobl J, Aktas O, Dorr J, Wuerfel J, et al: *Frequency of blood CX3CR1-positive natural killer cells correlates with disease activity in multiple sclerosis patients*. *FASEB J* 2005, **19**:1902-1904.
371. Gahmberg CG, Fagerholm SC, Nurmi SM, Chavakis T, Marchesan S, Gronholm M: *Regulation of integrin activity and signalling*. *Biochim Biophys Acta* 2009, **1790**:431-444.
372. Rose DM, Alon R, Ginsberg MH: *Integrin modulation and signaling in leukocyte adhesion and migration*. *Immunol Rev* 2007, **218**:126-134.
373. Baker EL, Zaman MH: *The biomechanical integrin*. *J Biomech* 2010, **43**:38-44.
374. Hogg N, Patzak I, Willenbrock F: *The insider's guide to leukocyte integrin signalling and function*. *Nat Rev Immunol* 2011, **11**:416-426.
375. Abram CL, Lowell CA: *The ins and outs of leukocyte integrin signaling*. *Annu Rev Immunol* 2009, **27**:339-362.
376. Alon R: *Chemokine arrest signals to leukocyte integrins trigger bi-directional-occupancy of individual heterodimers by extracellular and cytoplasmic ligands*. *Cell Adh Migr* 2010, **4**:211-214.
377. Frommhold D, Kamphues A, Hepper I, Pruenster M, Lukic IK, Socher I, Zablotskaya V, Buschmann K, Lange-Sperandio B, Schymeinsky J, et al: *RAGE and ICAM-1 cooperate in mediating leukocyte recruitment during acute inflammation in vivo*. *Blood* 2010, **116**:841-849.
378. Rice GP, Hartung HP, Calabresi PA: *Anti-alpha4 integrin therapy for multiple sclerosis: mechanisms and rationale*. *Neurology* 2005, **64**:1336-1342.
379. Hyun YM, Lefort CT, Kim M: *Leukocyte integrins and their ligand interactions*. *Immunol Res* 2009.
380. Kummer C, Ginsberg MH: *New approaches to blockade of alpha4-integrins, proven therapeutic targets in chronic inflammation*. *Biochem Pharmacol* 2006, **72**:1460-1468.
381. Ross GD: *Role of the lectin domain of Mac-1/CR3 (CD11b/CD18) in regulating intercellular adhesion*. *Immunol Res* 2002, **25**:219-227.
382. Constantin G: *Chemokine signaling and integrin activation in lymphocyte migration into the inflamed brain*. *J Neuroimmunol* 2008, **198**:20-26.

383. Greenwood J, Heasman SJ, Alvarez JI, Prat A, Lyck R, Engelhardt B: *Review: leucocyte-endothelial cell crosstalk at the blood-brain barrier: a prerequisite for successful immune cell entry to the brain*. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2011, **37**:24-39.
384. Lee SJ, Benveniste EN: *Adhesion molecule expression and regulation on cells of the central nervous system*. *J Neuroimmunol* 1999, **98**:77-88.
385. Archelos JJ, Previtali SC, Hartung HP: *The role of integrins in immune-mediated diseases of the nervous system*. *Trends Neurosci* 1999, **22**:30-38.
386. Akiyama H: *Inflammatory response in Alzheimer's disease*. *Tohoku J Exp Med* 1994, **174**:295-303.
387. McGeer PL, McGeer EG, Kawamata T, Yamada T, Akiyama H: *Reactions of the immune system in chronic degenerative neurological diseases*. *Can J Neurol Sci* 1991, **18**:376-379.
388. Miklossy J, Doudet DD, Schwab C, Yu S, McGeer EG, McGeer PL: *Role of ICAM-1 in persisting inflammation in Parkinson disease and MPTP monkeys*. *Exp Neurol* 2006, **197**:275-283.
389. Dietrich JB: *The adhesion molecule ICAM-1 and its regulation in relation with the blood-brain barrier*. *J Neuroimmunol* 2002, **128**:58-68.
390. Pleines UE, Stover JF, Kossmann T, Trentz O, Morganti-Kossmann MC: *Soluble ICAM-1 in CSF coincides with the extent of cerebral damage in patients with severe traumatic brain injury*. *J Neurotrauma* 1998, **15**:399-409.
391. Deckert-Schluter M, Schluter D, Hof H, Wiestler OD, Lassmann H: *Differential expression of ICAM-1, VCAM-1 and their ligands LFA-1, Mac-1, CD43, VLA-4, and MHC class II antigens in murine Toxoplasma encephalitis: a light microscopic and ultrastructural immunohistochemical study*. *J Neuropathol Exp Neurol* 1994, **53**:457-468.
392. Berger JR: *Progressive multifocal leukoencephalopathy and newer biological agents*. *Drug Saf* 2010, **33**:969-983.
393. Clegg DO, Wingerd KL, Hikita ST, Tolhurst EC: *Integrins in the development, function and dysfunction of the nervous system*. *Front Biosci* 2003, **8**:d723-750.
394. Huang J, Upadhyay UM, Tamargo RJ: *Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia*. *Surg Neurol* 2006, **66**:232-245.
395. Isaksson J, Farooque M, Holtz A, Hillered L, Olsson Y: *Expression of ICAM-1 and CD11b after experimental spinal cord injury in rats*. *J Neurotrauma* 1999, **16**:165-173.
396. Kierdorf K, Wang Y, Neumann H: *Immune-mediated CNS damage*. *Results Probl Cell Differ* 2010, **51**:173-196.
397. Maslin CL, Kedzierska K, Webster NL, Muller WA, Crowe SM: *Transendothelial migration of monocytes: the underlying molecular mechanisms and consequences of HIV-1 infection*. *Curr HIV Res* 2005, **3**:303-317.
398. McGeer PL, Kawamata T, Walker DG, Akiyama H, Tooyama I, McGeer EG: *Microglia in degenerative neurological disease*. *Glia* 1993, **7**:84-92.
399. Okada H: *Brain tumor immunotherapy with type-1 polarizing strategies*. *Ann N Y Acad Sci* 2009, **1174**:18-23.
400. Endo H, Sasaki K, Tonosaki A, Kayama T: *Three-dimensional and ultrastructural ICAM-1 distribution in the choroid plexus, arachnoid membrane and dural sinus of*

- inflammatory rats induced by LPS injection in the lateral ventricles.* Brain Res 1998, **793**:297-301.
401. Wang X, Michie SA, Xu B, Suzuki Y: *Importance of IFN-gamma-mediated expression of endothelial VCAM-1 on recruitment of CD8+ T cells into the brain during chronic infection with Toxoplasma gondii.* J Interferon Cytokine Res 2007, **27**:329-338.
402. Gimenez MA, Sim JE, Russell JH: *TNFR1-dependent VCAM-1 expression by astrocytes exposes the CNS to destructive inflammation.* J Neuroimmunol 2004, **151**:116-125.
403. Yang J, Fei M, Gu Y, Sun L, Ben Z, Zhou D, Chen J, Wang Y, Wang P, Shen A, Cheng C: *Evaluated expression of ICAM-1 and its ligands in the rat spinal cord following lipopolysaccharide intraspinal injection.* Neuromolecular Med 2008, **10**:385-392.
404. McHale JF, Harari OA, Marshall D, Haskard DO: *TNF-alpha and IL-1 sequentially induce endothelial ICAM-1 and VCAM-1 expression in MRL/lpr lupus-prone mice.* J Immunol 1999, **163**:3993-4000.
405. Wong D, Dorovini-Zis K: *Upregulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in primary cultures of human brain microvessel endothelial cells by cytokines and lipopolysaccharide.* J Neuroimmunol 1992, **39**:11-21.
406. Engelhardt B, Kappos L: *Natalizumab: targeting alpha4-integrins in multiple sclerosis.* Neurodegener Dis 2008, **5**:16-22.
407. Steinman L: *A molecular trio in relapse and remission in multiple sclerosis.* Nat Rev Immunol 2009, **9**:440-447.
408. Bowen JD, Petersdorf SH, Richards TL, Maravilla KR, Dale DC, Price TH, St John TP, Yu AS: *Phase I study of a humanized anti-CD11/CD18 monoclonal antibody in multiple sclerosis.* Clin Pharmacol Ther 1998, **64**:339-346.
409. Palmer AM: *Pharmacotherapy for multiple sclerosis: progress and prospects.* Curr Opin Investig Drugs 2009, **10**:407-417.
410. Keszthelyi E, Karlik S, Hyduk S, Rice GP, Gordon G, Yednock T, Horner H: *Evidence for a prolonged role of alpha 4 integrin throughout active experimental allergic encephalomyelitis.* Neurology 1996, **47**:1053-1059.
411. Rigolio R, Biffi A, Oggioni N, Cavaletti G: *Actively induced EAE in Lewis rats: characterization of spleen and spinal cord infiltrating lymphocytes by flow cytometry during the course of the disease.* J Neuroimmunol 2008, **199**:67-74.
412. van der Laan LJ, van der Goes A, Wauben MH, Ruuls SR, Dopp EA, De Groot CJ, Kuijpers TW, Elices MJ, Dijkstra CD: *Beneficial effect of modified peptide inhibitor of alpha4 integrins on experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats.* J Neurosci Res 2002, **67**:191-199.
413. Engelhardt B, Laschinger M, Schulz M, Samulowitz U, Vestweber D, Hoch G: *The development of experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse requires alpha4-integrin but not alpha4beta7-integrin.* J Clin Invest 1998, **102**:2096-2105.
414. Kent SJ, Karlik SJ, Cannon C, Hines DK, Yednock TA, Fritz LC, Horner HC: *A monoclonal antibody to alpha 4 integrin suppresses and reverses active experimental allergic encephalomyelitis.* J Neuroimmunol 1995, **58**:1-10.
415. Eikelenboom MJ, Killestein J, Izeboud T, Kalkers NF, Baars PA, van Lier RA, Barkhof F, Uitdehaag BM, Polman CH: *Expression of adhesion molecules on*

- peripheral lymphocytes predicts future lesion development in MS.* J Neuroimmunol 2005, **158**:222-230.
416. Lee-Chang C, Top I, Zephir H, Dubucquoi S, Trauet J, Dussart P, Prin L, Vermersch P: *Primed status of transitional B cells associated with their presence in the cerebrospinal fluid in early phases of multiple sclerosis.* Clin Immunol 2011, **139**:12-20.
417. Soilu-Hanninen M, Laaksonen M, Hanninen A, Eralinna JP, Panelius M: *Downregulation of VLA-4 on T cells as a marker of long term treatment response to interferon beta-1a in MS.* J Neuroimmunol 2005, **167**:175-182.
418. Cannella B, Raine CS: *The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions.* Ann Neurol 1995, **37**:424-435.
419. Jain P, Coisne C, Enzmann G, Rottapel R, Engelhardt B: *Alpha4beta1 integrin mediates the recruitment of immature dendritic cells across the blood-brain barrier during experimental autoimmune encephalomyelitis.* J Immunol 2010, **184**:7196-7206.
420. Izmailova E, Walker R, Fitzgerald M, Ocain T, Jaffee B, Healy AM: *Quantitation of peripheral blood markers of rat experimental autoimmune encephalomyelitis.* Autoimmunity 2007, **40**:355-365.
421. Deloire MS, Touil T, Brochet B, Dousset V, Caille JM, Petry KG: *Macrophage brain infiltration in experimental autoimmune encephalomyelitis is not completely compromised by suppressed T-cell invasion: in vivo magnetic resonance imaging illustration in effective anti-VLA-4 antibody treatment.* Mult Scler 2004, **10**:540-548.
422. Theien BE, Vanderlugt CL, Nickerson-Nutter C, Cornebise M, Scott DM, Perper SJ, Whalley ET, Miller SD: *Differential effects of treatment with a small-molecule VLA-4 antagonist before and after onset of relapsing EAE.* Blood 2003, **102**:4464-4471.
423. Theien BE, Vanderlugt CL, Eagar TN, Nickerson-Nutter C, Nazareno R, Kuchroo VK, Miller SD: *Discordant effects of anti-VLA-4 treatment before and after onset of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis.* J Clin Invest 2001, **107**:995-1006.
424. Yednock TA, Cannon C, Fritz LC, Sanchez-Madrid F, Steinman L, Karin N: *Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin.* Nature 1992, **356**:63-66.
425. Kanwar JR, Harrison JE, Wang D, Leung E, Mueller W, Wagner N, Krissansen GW: *Beta7 integrins contribute to demyelinating disease of the central nervous system.* J Neuroimmunol 2000, **103**:146-152.
426. Rose LM, Richards TL, Peterson J, Petersen R, Alvord EC, Jr.: *Resolution of CNS lesions following treatment of experimental allergic encephalomyelitis in macaques with monoclonal antibody to the CD18 leukocyte integrin.* Mult Scler 1997, **2**:259-266.
427. Smith SS, Barnum SR: *Differential expression of beta 2-integrins and cytokine production between gammadelta and alphabeta T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis.* J Leukoc Biol 2008, **83**:71-79.
428. Bullard DC, Hu X, Schoeb TR, Axtell RC, Raman C, Barnum SR: *Critical requirement of CD11b (Mac-1) on T cells and accessory cells for development of experimental autoimmune encephalomyelitis.* J Immunol 2005, **175**:6327-6333.

429. Gordon EJ, Myers KJ, Dougherty JP, Rosen H, Ron Y: *Both anti-CD11a (LFA-1) and anti-CD11b (MAC-1) therapy delay the onset and diminish the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Neuroimmunol 1995, **62**:153-160.
430. Gultner S, Kuhlmann T, Hesse A, Weber JP, Riemer C, Baier M, Hutloff A: *Reduced Treg frequency in LFA-1-deficient mice allows enhanced T effector differentiation and pathology in EAE*. Eur J Immunol 2010, **40**:3403-3412.
431. Wang Y, Kai H, Chang F, Shibata K, Tahara-Hanaoka S, Honda S, Shibuya A, Shibuya K: *A critical role of LFA-1 in the development of Th17 cells and induction of experimental autoimmune encephalomyelitis*. Biochem Biophys Res Commun 2007, **353**:857-862.
432. Yang J, Lindsberg PJ, Hukkanen V, Seljelid R, Gahmberg CG, Meri S: *Differential expression of cytokines (IL-2, IFN-gamma, IL-10) and adhesion molecules (VCAM-1, LFA-1, CD44) between spleen and lymph nodes associates with remission in chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis*. Scand J Immunol 2002, **56**:286-293.
433. Avolio C, Ruggieri M, Cafforio P, Giuliani F, Silvestris F, Dammacco F, Livrea P, Trojano M: *LFA-1 expression on CD4(+)CD45RO(+) peripheral blood T-lymphocytes in RR MS: effects induced by rIFNbeta-1a*. J Neurol Sci 2001, **186**:65-73.
434. Oreja-Guevara C, Sindern E, Raulf-Heimsoth M, Malin JP: *Analysis of lymphocyte subpopulations in cerebrospinal fluid and peripheral blood in patients with multiple sclerosis and inflammatory diseases of the nervous system*. Acta Neurol Scand 1998, **98**:310-313.
435. Engelhardt B, Martin-Simonet MT, Rott LS, Butcher EC, Michie SA: *Adhesion molecule phenotype of T lymphocytes in inflamed CNS*. J Neuroimmunol 1998, **84**:92-104.
436. Willenborg DO, Staykova MA, Miyasaka M: *Short term treatment with soluble neuroantigen and anti-CD11a (LFA-1) protects rats against autoimmune encephalomyelitis: treatment abrogates autoimmune disease but not autoimmunity*. J Immunol 1996, **157**:1973-1980.
437. Shin T, Kojima T, Tanuma N, Ishihara Y, Matsumoto Y: *The subarachnoid space as a site for precursor T cell proliferation and effector T cell selection in experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Neuroimmunol 1995, **56**:171-178.
438. Welsh CT, Rose JW, Hill KE, Townsend JJ: *Augmentation of adoptively transferred experimental allergic encephalomyelitis by administration of a monoclonal antibody specific for LFA-1 alpha*. J Neuroimmunol 1993, **43**:161-167.
439. Dugger KJ, Zinn KR, Weaver C, Bullard DC, Barnum SR: *Effector and suppressor roles for LFA-1 during the development of experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Neuroimmunol 2009, **206**:22-27.
440. Hellings N, Gelin G, Medaer R, Bruckers L, Palmers Y, Raus J, Stinissen P: *Longitudinal study of antimyelin T-cell reactivity in relapsing-remitting multiple sclerosis: association with clinical and MRI activity*. J Neuroimmunol 2002, **126**:143-160.
441. McDonnell GV, McMillan SA, Douglas JP, Droogan AG, Hawkins SA: *Serum soluble adhesion molecules in multiple sclerosis: raised sVCAM-1, sICAM-1 and sE-selectin in primary progressive disease*. J Neurol 1999, **246**:87-92.

442. Kraus J, Oschmann P, Engelhardt B, Schiel C, Hornig C, Bauer R, Kern A, Traupe H, Dorndorf W: *Soluble and cell surface ICAM-1 as markers for disease activity in multiple sclerosis*. Acta Neurol Scand 1998, **98**:102-109.
443. Bo L, Peterson JW, Mork S, Hoffman PA, Gallatin WM, Ransohoff RM, Trapp BD: *Distribution of immunoglobulin superfamily members ICAM-1, -2, -3, and the beta 2 integrin LFA-1 in multiple sclerosis lesions*. J Neuropathol Exp Neurol 1996, **55**:1060-1072.
444. Washington R, Burton J, Todd RF, 3rd, Newman W, Dragovic L, Dore-Duffy P: *Expression of immunologically relevant endothelial cell activation antigens on isolated central nervous system microvessels from patients with multiple sclerosis*. Ann Neurol 1994, **35**:89-97.
445. Hu X, Barnum SR, Wohler JE, Schoeb TR, Bullard DC: *Differential ICAM-1 isoform expression regulates the development and progression of experimental autoimmune encephalomyelitis*. Mol Immunol 2010, **47**:1692-1700.
446. Schneider C, Schuetz G, Zollner TM: *Acute neuroinflammation in Lewis rats - a model for acute multiple sclerosis relapses*. J Neuroimmunol 2009, **213**:84-90.
447. Bullard DC, Hu X, Schoeb TR, Collins RG, Beaudet AL, Barnum SR: *Intercellular adhesion molecule-1 expression is required on multiple cell types for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Immunol 2007, **178**:851-857.
448. Schulz M, Engelhardt B: *The circumventricular organs participate in the immunopathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis*. Cerebrospinal Fluid Res 2005, **2**:8.
449. Kohm AP, Miller SD: *Role of ICAM-1 and P-selectin expression in the development and effector function of CD4+CD25+regulatory T cells*. J Autoimmun 2003, **21**:261-271.
450. Sipkins DA, Gijbels K, Tropper FD, Bednarski M, Li KC, Steinman L: *ICAM-1 expression in autoimmune encephalitis visualized using magnetic resonance imaging*. J Neuroimmunol 2000, **104**:1-9.
451. Samoilova EB, Horton JL, Chen Y: *Experimental autoimmune encephalomyelitis in intercellular adhesion molecule-1-deficient mice*. Cell Immunol 1998, **190**:83-89.
452. Dore-Duffy P, Balabanov R, Rafols J, Swanborg RH: *Recovery phase of acute experimental autoimmune encephalomyelitis in rats corresponds to development of endothelial cell unresponsiveness to interferon gamma activation*. J Neurosci Res 1996, **44**:223-234.
453. Kobayashi Y, Kawai K, Honda H, Tomida S, Niimi N, Tamatani T, Miyasaka M, Yoshikai Y: *Antibodies against leukocyte function-associated antigen-1 and against intercellular adhesion molecule-1 together suppress the progression of experimental allergic encephalomyelitis*. Cell Immunol 1995, **164**:295-305.
454. Willenborg DO, Simmons RD, Tamatani T, Miyasaka M: *ICAM-1-dependent pathway is not critically involved in the inflammatory process of autoimmune encephalomyelitis or in cytokine-induced inflammation of the central nervous system*. J Neuroimmunol 1993, **45**:147-154.
455. Archelos JJ, Jung S, Maurer M, Schmied M, Lassmann H, Tamatani T, Miyasaka M, Toyka KV, Hartung HP: *Inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis by an antibody to the intercellular adhesion molecule ICAM-1*. Ann Neurol 1993, **34**:145-154.

456. Wilcox CE, Ward AM, Evans A, Baker D, Rothlein R, Turk JL: *Endothelial cell expression of the intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the central nervous system of guinea pigs during acute and chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis*. J Neuroimmunol 1990, **30**:43-51.
457. Doerck S, Gobel K, Weise G, Schneider-Hohendorf T, Reinhardt M, Hauff P, Schwab N, Linker R, Maurer M, Meuth SG, Wiendl H: *Temporal pattern of ICAM-1 mediated regulatory T cell recruitment to sites of inflammation in adoptive transfer model of multiple sclerosis*. PLoS One 2010, **5**:e15478.
458. Allavena R, Noy S, Andrews M, Pullen N: *CNS elevation of vascular and not mucosal addressin cell adhesion molecules in patients with multiple sclerosis*. Am J Pathol 2010, **176**:556-562.
459. Vercellino M, Votta B, Condello C, Piacentino C, Romagnolo A, Merola A, Capello E, Mancardi GL, Mutani R, Giordana MT, Cavalla P: *Involvement of the choroid plexus in multiple sclerosis autoimmune inflammation: a neuropathological study*. J Neuroimmunol 2008, **199**:133-141.
460. Verbeek MM, Westphal JR, Ruiter DJ, de Waal RM: *T lymphocyte adhesion to human brain pericytes is mediated via very late antigen-4/vascular cell adhesion molecule-1 interactions*. J Immunol 1995, **154**:5876-5884.
461. Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S: *Recent developments and complexities in neutrophil transmigration*. Curr Opin Hematol 2010, **17**:9-17.
462. Wittchen ES: *Endothelial signaling in paracellular and transcellular leukocyte transmigration*. Front Biosci 2009, **14**:2522-2545.
463. Petri B, Bixel MG: *Molecular events during leukocyte diapedesis*. FEBS J 2006, **273**:4399-4407.
464. Kvietys PR, Sandig M: *Neutrophil diapedesis: paracellular or transcellular?* News Physiol Sci 2001, **16**:15-19.
465. Muller WA: *Mechanisms of transendothelial migration of leukocytes*. Circ Res 2009, **105**:223-230.
466. Carman CV: *Mechanisms for transcellular diapedesis: probing and pathfinding by 'invadosome-like protrusions'*. J Cell Sci 2009, **122**:3025-3035.
467. Sellebjerg F, Sorensen TL: *Chemokines and matrix metalloproteinase-9 in leukocyte recruitment to the central nervous system*. Brain Res Bull 2003, **61**:347-355.
468. Lukes A, Mun-Bryce S, Lukes M, Rosenberg GA: *Extracellular matrix degradation by metalloproteinases and central nervous system diseases*. Mol Neurobiol 1999, **19**:267-284.
469. Vestweber D: *Adhesion and signaling molecules controlling the transmigration of leukocytes through endothelium*. Immunol Rev 2007, **218**:178-196.
470. Muller WA, Randolph GJ: *Migration of leukocytes across endothelium and beyond: molecules involved in the transmigration and fate of monocytes*. J Leukoc Biol 1999, **66**:698-704.
471. Muller WA: *Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response*. Trends Immunol 2003, **24**:327-334.
472. Eugenin EA, Berman JW: *Chemokine-dependent mechanisms of leukocyte trafficking across a model of the blood-brain barrier*. Methods 2003, **29**:351-361.
473. Man S, Ubogu EE, Ransohoff RM: *Inflammatory cell migration into the central nervous system: a few new twists on an old tale*. Brain Pathol 2007, **17**:243-250.

474. Nelissen I, Gveric D, van Noort JM, Cuzner ML, Opdenakker G: *PECAM-1 and gelatinase B coexist in vascular cuffs of multiple sclerosis lesions*. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2006, **32**:15-22.
475. Eugenin EA, Gamss R, Buckner C, Buono D, Klein RS, Schoenbaum EE, Calderon TM, Berman JW: *Shedding of PECAM-1 during HIV infection: a potential role for soluble PECAM-1 in the pathogenesis of NeuroAIDS*. *J Leukoc Biol* 2006, **79**:444-452.
476. Del Maschio A, De Luigi A, Martin-Padura I, Brockhaus M, Bartfai T, Fruscella P, Adorini L, Martino G, Furlan R, De Simoni MG, Dejana E: *Leukocyte recruitment in the cerebrospinal fluid of mice with experimental meningitis is inhibited by an antibody to junctional adhesion molecule (JAM)*. *J Exp Med* 1999, **190**:1351-1356.
477. Williams KC, Zhao RW, Ueno K, Hickey WF: *PECAM-1 (CD31) expression in the central nervous system and its role in experimental allergic encephalomyelitis in the rat*. *J Neurosci Res* 1996, **45**:747-757.
478. Lechner F, Sahrbacher U, Suter T, Frei K, Brockhaus M, Koedel U, Fontana A: *Antibodies to the junctional adhesion molecule cause disruption of endothelial cells and do not prevent leukocyte influx into the meninges after viral or bacterial infection*. *J Infect Dis* 2000, **182**:978-982.
479. Vorbrodth AW, Dobrogowska DH: *Molecular anatomy of intercellular junctions in brain endothelial and epithelial barriers: electron microscopist's view*. *Brain Res Brain Res Rev* 2003, **42**:221-242.
480. Engelhardt B, Wolburg H: *Mini-review: Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house?* *Eur J Immunol* 2004, **34**:2955-2963.
481. Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Engelhardt B: *Diapedesis of mononuclear cells across cerebral venules during experimental autoimmune encephalomyelitis leaves tight junctions intact*. *Acta Neuropathol* 2005, **109**:181-190.
482. Grammas P, Martinez J, Miller B: *Cerebral microvascular endothelium and the pathogenesis of neurodegenerative diseases*. *Expert Rev Mol Med* 2011, **13**:e19.
483. Esparza J, Kruse M, Lee J, Michaud M, Madri JA: *MMP-2 null mice exhibit an early onset and severe experimental autoimmune encephalomyelitis due to an increase in MMP-9 expression and activity*. *FASEB J* 2004, **18**:1682-1691.
484. van Horssen J, Brink BP, de Vries HE, van der Valk P, Bo L: *The blood-brain barrier in cortical multiple sclerosis lesions*. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007, **66**:321-328.
485. Haarmann A, Deiss A, Prochaska J, Foerch C, Weksler B, Romero I, Couraud PO, Stoll G, Rieckmann P, Buttmann M: *Evaluation of soluble junctional adhesion molecule-A as a biomarker of human brain endothelial barrier breakdown*. *PLoS One* 2010, **5**:e13568.
486. Padden M, Leech S, Craig B, Kirk J, Brankin B, McQuaid S: *Differences in expression of junctional adhesion molecule-A and beta-catenin in multiple sclerosis brain tissue: increasing evidence for the role of tight junction pathology*. *Acta Neuropathol* 2007, **113**:177-186.
487. Yong VW, Zabad RK, Agrawal S, Goncalves Dasilva A, Metz LM: *Elevation of matrix metalloproteinases (MMPs) in multiple sclerosis and impact of immunomodulators*. *J Neurol Sci* 2007, **259**:79-84.

488. Minagar A, Jy W, Jimenez JJ, Sheremata WA, Mauro LM, Mao WW, Horstman LL, Ahn YS: *Elevated plasma endothelial microparticles in multiple sclerosis*. *Neurology* 2001, **56**:1319-1324.
489. Losy J, Niezgoda A, Wender M: *Increased serum levels of soluble PECAM-1 in multiple sclerosis patients with brain gadolinium-enhancing lesions*. *J Neuroimmunol* 1999, **99**:169-172.
490. Niezgoda A, Losy J: *Pecam-1 expression in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis*. *Folia Morphol (Warsz)* 2002, **61**:143-145.
491. Reinke EK, Lee J, Zozulya A, Karman J, Muller WA, Sandor M, Fabry Z: *Short-term sPECAM-Fc treatment ameliorates EAE while chronic use hastens onset of symptoms*. *J Neuroimmunol* 2007, **186**:86-93.
492. Graesser D, Solowiej A, Bruckner M, Osterweil E, Juedes A, Davis S, Ruddle NH, Engelhardt B, Madri JA: *Altered vascular permeability and early onset of experimental autoimmune encephalomyelitis in PECAM-1-deficient mice*. *J Clin Invest* 2002, **109**:383-392.
493. Weaver A, Goncalves da Silva A, Nuttall RK, Edwards DR, Shapiro SD, Rivest S, Yong VW: *An elevated matrix metalloproteinase (MMP) in an animal model of multiple sclerosis is protective by affecting Th1/Th2 polarization*. *FASEB J* 2005, **19**:1668-1670.
494. Dubois B, Masure S, Hurtenbach U, Paemen L, Heremans H, van den Oord J, Sciot R, Meinhardt T, Hammerling G, Opdenakker G, Arnold B: *Resistance of young gelatinase B-deficient mice to experimental autoimmune encephalomyelitis and necrotizing tail lesions*. *J Clin Invest* 1999, **104**:1507-1515.
495. Linker RA, Kieseier BC, Gold R: *Identification and development of new therapeutics for multiple sclerosis*. *Trends Pharmacol Sci* 2008, **29**:558-565.
496. Vallieres L, Sawchenko PE: *Bone marrow-derived cells that populate the adult mouse brain preserve their hematopoietic identity*. *J Neurosci* 2003, **23**:5197-5207.
497. Richard JF, Roy M, Audoy-Remus J, Tremblay P, Vallieres L: *Crawling Phagocytes Recruited in the Brain Vasculature after Pertussis Toxin Exposure through IL6, ICAM1 and ITGalphaM*. *Brain Pathol* 2011.
498. Herges K, de Jong BA, Kolkowitz I, Dunn C, Mandelbaum G, Ko RM, Maini A, Han MH, Killestein J, Polman C, et al: *Protective effect of an elastase inhibitor in a neuromyelitis optica-like disease driven by a peptide of myelin oligodendroglial glycoprotein*. *Mult Scler* 2012.
499. Kanwar JR, Kanwar RK, Wang D, Krissansen GW: *Prevention of a chronic progressive form of experimental autoimmune encephalomyelitis by an antibody against mucosal addressin cell adhesion molecule-1, given early in the course of disease progression*. *Immunol Cell Biol* 2000, **78**:641-645.
500. Modur V, Li Y, Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre TM: *Retrograde inflammatory signaling from neutrophils to endothelial cells by soluble interleukin-6 receptor alpha*. *J Clin Invest* 1997, **100**:2752-2756.
501. Romano M, Sironi M, Toniatti C, Polentarutti N, Fruscella P, Ghezzi P, Faggioni R, Luini W, van Hinsbergh V, Sozzani S, et al: *Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment*. *Immunity* 1997, **6**:315-325.
502. Shrikant P, Weber E, Jilling T, Benveniste EN: *Intercellular adhesion molecule-1 gene expression by glial cells. Differential mechanisms of inhibition by IL-10 and IL-6*. *J Immunol* 1995, **155**:1489-1501.

503. Xie J, Li R, Kotovuori P, Vermot-Desroches C, Wijdenes J, Arnaout MA, Nortamo P, Gahmberg CG: *Intercellular adhesion molecule-2 (CD102) binds to the leukocyte integrin CD11b/CD18 through the A domain*. J Immunol 1995, **155**:3619-3628.
504. Hubbard AK, Rothlein R: *Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades*. Free Radic Biol Med 2000, **28**:1379-1386.
505. Singh SK, Baar V, Morbach H, Girschick HJ: *Expression of ICAM-1, ICAM-2, NCAM-1 and VCAM-1 by human synovial cells exposed to Borrelia burgdorferi in vitro*. Rheumatol Int 2006, **26**:818-827.
506. Diamond MS, Alon R, Parkos CA, Quinn MT, Springer TA: *Heparin is an adhesive ligand for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD1)*. J Cell Biol 1995, **130**:1473-1482.
507. Taylor KR, Gallo RL: *Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation*. FASEB J 2006, **20**:9-22.
508. Bai T, Chen CC, Lau LF: *Matricellular protein CCN1 activates a proinflammatory genetic program in murine macrophages*. J Immunol, **184**:3223-3232.
509. Wijnhoven TJ, Lensen JF, Wismans RG, Lamrani M, Monnens LA, Wevers RA, Rops AL, van der Vlag J, Berden JH, van den Heuvel LP, van Kuppevelt TH: *In vivo degradation of heparan sulfates in the glomerular basement membrane does not result in proteinuria*. J Am Soc Nephrol 2007, **18**:823-832.
510. Zhang C, Liu Y, Gao Y, Shen J, Zheng S, Wei M, Zeng X: *Modified heparins inhibit integrin alpha(IIb)beta(3) mediated adhesion of melanoma cells to platelets in vitro and in vivo*. Int J Cancer 2009, **125**:2058-2065.
511. Kohanawa M, Asano M, Minagawa T, Nakane A: *Macrophage antigen-1 positive cells are essential in the defense against Theiler's virus strain GD VII infection in the spinal cord*. Microb Pathog 1997, **23**:33-38.
512. Pozner RG, Berria MI, Negrotto S, Schattner M, Gomez RM: *Differential astrocyte response to Theiler's murine encephalomyelitis virus infection*. Intervirology 2005, **48**:279-284.
513. Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S, Sarnacki S, Cumano A, Lauvau G, Geissmann F: *Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior*. Science 2007, **317**:666-670.
514. Murray PD, Krivacic K, Chernosky A, Wei T, Ransohoff RM, Rodriguez M: *Biphasic and regionally-restricted chemokine expression in the central nervous system in the Theiler's virus model of multiple sclerosis*. J Neurovirol 2000, **6 Suppl 1**:S44-52.
515. Rubio N, Sanz-Rodriguez F, Lipton HL: *Theiler's virus induces the MIP-2 chemokine (CXCL2) in astrocytes from genetically susceptible but not from resistant mouse strains*. Cell Immunol 2006, **239**:31-40.
516. Sakuma H, Kohyama K, Park IK, Miyakoshi A, Tanuma N, Matsumoto Y: *Clinicopathological study of a myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced demyelinating disease in LEW.1AV1 rats*. Brain 2004, **127**:2201-2213.
517. Goverman J: *Autoimmune T cell responses in the central nervous system*. Nat Rev Immunol 2009, **9**:393-407.
518. Waksman BH, Adams RD: *A comparative study of experimental allergic neuritis in the rabbit, guinea pig, and mouse*. J Neuropathol Exp Neurol 1956, **15**:293-334.

519. Liu L, Belkadi A, Darnall L, Hu T, Drescher C, Cotleur AC, Padovani-Claudio D, He T, Choi K, Lane TE, et al: *CXCR2-positive neutrophils are essential for cuprizone-induced demyelination: relevance to multiple sclerosis*. Nat Neurosci 2010, **13**:319-326.
520. Liu L, Darnall L, Hu T, Choi K, Lane TE, Ransohoff RM: *Myelin repair is accelerated by inactivating CXCR2 on nonhematopoietic cells*. J Neurosci 2010, **30**:9074-9083.
521. Hamilton TA, Novotny M, Datta S, Mandal P, Hartupee J, Tebo J, Li X: *Chemokine and chemoattractant receptor expression: post-transcriptional regulation*. J Leukoc Biol 2007, **82**:213-219.
522. Toft-Hansen H, Nuttall RK, Edwards DR, Owens T: *Key metalloproteinases are expressed by specific cell types in experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Immunol 2004, **173**:5209-5218.
523. Ji KA, Yang MS, Jeong HK, Min KJ, Kang SH, Jou I, Joe EH: *Resident microglia die and infiltrated neutrophils and monocytes become major inflammatory cells in lipopolysaccharide-injected brain*. Glia 2007, **55**:1577-1588.

Annexe I : Résultats supplémentaires partie I : Expression et rôle de CCR1, CCR2 et CX3CR1 ainsi que de leurs ligands en réponse au LPS ou à la PTX

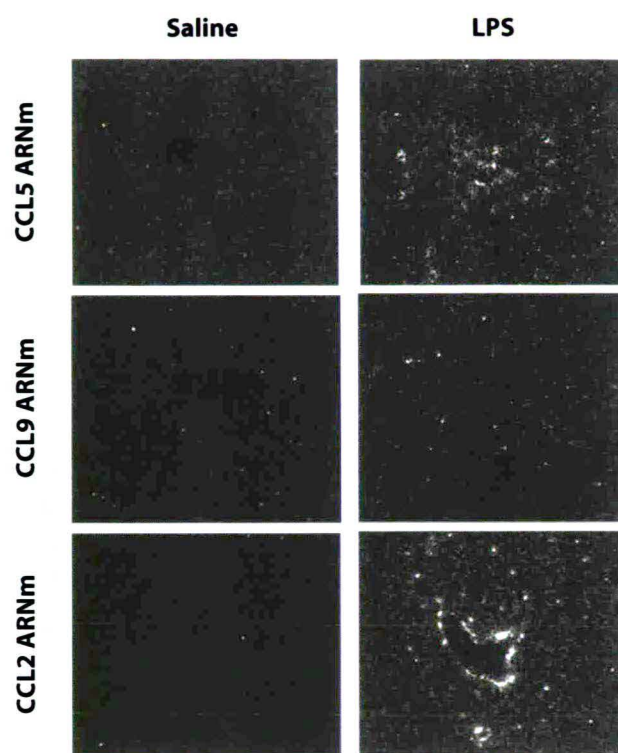


Figure I.1 : Expression de CCL5, CCL9 et CCL2 dans le cerveau de souris lors d'une endotoxémie provoquée par le LPS.

Détection du niveau d'ARNm de CCL5, CCL9 et CCL2 par hybridation *in situ* six heures après l'injection de LPS ou de saline (contrôles). Photos prises à partir d'une coupe représentative des résultats obtenus de cinq animaux pour chaque traitement, c'est-à-dire que le LPS induit uniquement l'expression de CCL5 et CCL2.

La méthode utilisée est la même que celle expliquée dans les chapitres 2 et 3 et ne sera donc pas décrite une nouvelle fois.

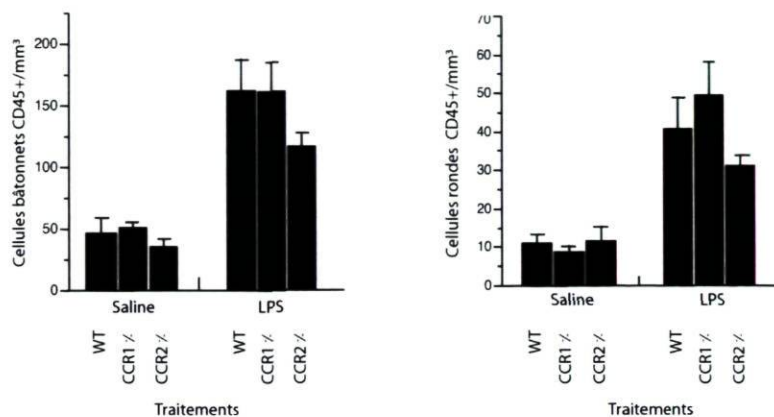


Figure I.2 : Recrutement des leucocytes bâtonnets et ronds chez des animaux de souche sauvage ou déficients pour les récepteurs CCR1 et CCR2 lors d'une endotoxémie provoquée par le LPS

Compte des cellules bâtonnets et rondes CD45⁺ dans le cortex cérébral de souris de souche sauvage (WT) ou déficientes (^{-/-}) pour CCR1 ou CCR2 six heures après l'injection de LPS ou de saline (contrôles) de sept ou huit animaux par traitement. L'absence des récepteurs CCR1 ou CCR2 n'influence pas l'adhésion des leucocytes bâtonnets ou ronds lors d'une endotoxémie provoquée par le LPS.

La méthode utilisée est la même que celle expliquée dans les chapitres 2 et 3 et ne sera donc pas décrite une nouvelle fois.

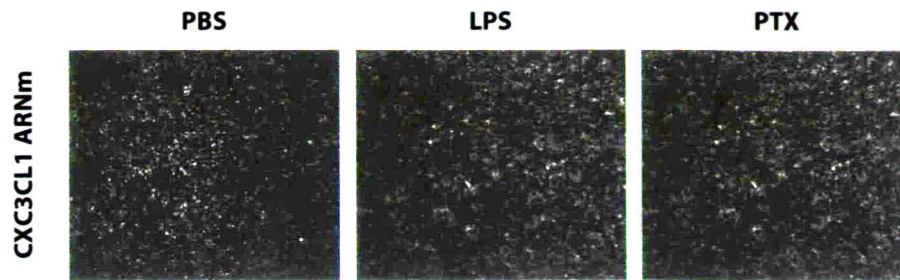


Figure I.3 : Expression de CX3CL1 dans le cerveau de souris lors de traitement au LPS ou à la PTX

Détection du niveau d'ARNm de CX3CL1 par hybridation *in situ* six heures après l'injection de LPS, de PTX ou de PBS (contrôles). Photos prises à partir d'une coupe représentative des résultats obtenus de cinq animaux pour chaque traitement, c'est-à-dire que ni le LPS ni la PTX n'augmente l'expression de CX3CL1.

La méthode utilisée est la même que celle expliquée dans les chapitres 2 et 3 et ne sera donc pas décrite une nouvelle fois.

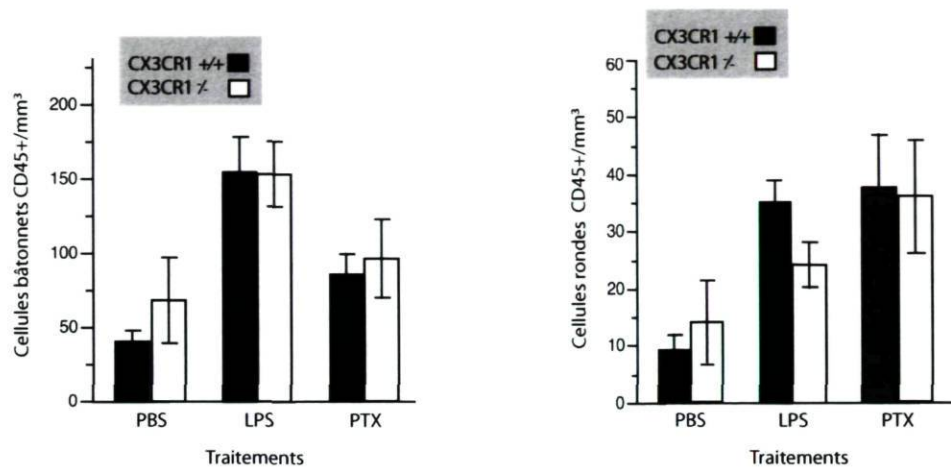


Figure I.4 : Recrutement des leucocytes bâtonnets et ronds chez des animaux de souche sauvage ou déficients pour le récepteur CX3CR1

Compte des cellules bâtonnets et rondes CD45⁺ dans le cortex cérébral de souris de souche sauvage (^{+/+}) ou déficientes (^{-/-}) pour CX3CR1 six heures après l'injection de LPS, de PTX ou de PBS (contrôles) de huit animaux par traitement. L'absence du récepteur CX3CR1 n'influence pas l'adhésion des leucocytes bâtonnets ou ronds lors de traitement au LPS ou à la PTX.

La méthode utilisée est la même que celle expliquée dans les chapitres 2 et 3 et ne sera donc pas décrite une nouvelle fois.

Annexe II : Résultats supplémentaires partie II : Expression du ligand d' α M β 2 : RAGE, en réponse au LPS ou à la PTX

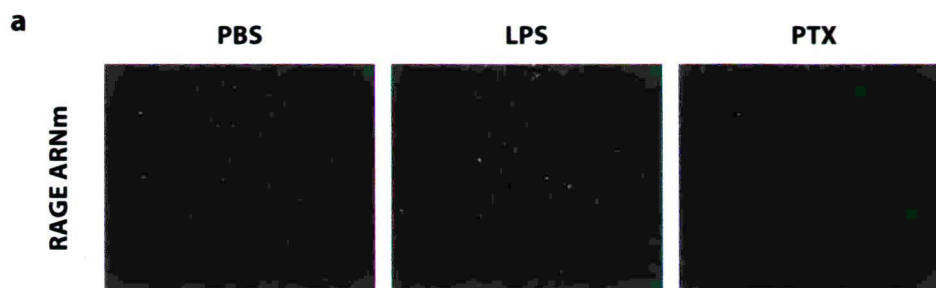


Figure II.1 : Expression de RAGE dans le cerveau de souris lors de traitement au LPS ou à la PTX.

Détection du niveau d'ARNm de RAGE par hybridation *in situ* six heures après l'injection de LPS, de PTX ou de PBS (contrôle). Photos prises à partir d'une coupe représentative des résultats obtenus de huit animaux pour chaque traitement, c'est-à-dire que, dans tous les traitements, aucun signal n'a été détecté.

La méthode utilisée est la même que celle expliquée dans les chapitres 2 et 3 et ne sera donc pas décrite une nouvelle fois.