



Rôle des cellules myéloïdes dans des modèles murins de neuroinflammation

Thèse

Lusiné Bozoyan

Doctorat en neurobiologie
Philosophiæ doctor (Ph.D.)

Québec, Canada

© Lusiné Bozoyan, 2016

Rôle des cellules myéloïdes dans des modèles murins de neuroinflammation

Thèse

Lusiné Bozoyan

Sous la direction de:

Luc Vallières, directeur de recherche

Résumé

L'inflammation du système nerveux central (SNC), appelée neuroinflammation, est un aspect inséparable des maladies neurodégénératives chroniques comme la sclérose en plaques (SEP) et la maladie d'Alzheimer (MA). La caractérisation de la signature moléculaire spécifique à chaque population cellulaire dans des pathologies distinctes va aboutir à la compréhension et donc au contrôle de la neuroinflammation. Le présent ouvrage a pour but de mieux comprendre les mécanismes d'action de deux types cellulaires myéloïdes, la microglie et les neutrophiles, au cours des affections neuroinflammatoires du SNC. Ainsi, le premier objectif a été de comprendre le rôle des cytokines IL-36 dans la neuroinflammation établie au cours de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE). Dans une seconde partie, l'objectif a été d'explorer l'action du GPR84, un récepteur couplé à la protéine G spécifique à la microglie dans le SNC, lors de l'altération des fonctions cérébrales dans un modèle de souris transgénique de la MA. Nos résultats démontrent que la voie de signalisation IL-36/IL36R est augmentée dans trois modèles différents de l'EAE, mais ne contribue pas au développement ni à la progression de la pathologie. En utilisant l'approche de cytométrie en flux nous identifions les neutrophiles comme la source majeure de l'IL-36 γ . De plus, nous démontrons que la microglie exprime l'IL-36R et sa stimulation par l'IL-36 γ conduit à la production de cytokines pro-inflammatoires. Dans un second temps, nous caractérisons l'augmentation de l'expression du GPR84 par la microglie dans le modèle murin de la MA APP/PS1. Ainsi, le croisement de ces souris avec des souris déficientes en GPR84 diminue l'activation et le recrutement de la microglie autour des plaques d'amyloïde- β et accélère le déclin cognitif. Nos études impliquent le GPR84 comme un acteur important dans le maintien de l'homéostasie neuronale puisque son absence favorise la dégénérescence des dendrites dans le cerveau. Les résultats obtenus dans cette thèse apportent de nouveaux éléments qui peuvent contribuer au développement des thérapies qui ciblent les cellules myéloïdes dans diverses pathologies du SNC. Ces données ouvrent de nouvelles pistes pour élucider le rôle de l'IL-36 γ dans des maladies neurodégénératives. Enfin, pour une première fois, nous présentons un modèle murin permettant d'identifier le(s) ligand(s) endogène(s) du GPR84, une cible thérapeutique potentielle pour la prévention et/ou le traitement de la MA.

Abstract

Inflammation of the central nervous system (CNS), known as neuroinflammation, is a hallmark of chronic neurodegenerative diseases such as multiple sclerosis (MS) and Alzheimer's disease (AD). Detailed characterization of each cell population and its specific molecular signature in different pathologies will allow us to master and, thus, control neuroinflammatory processes. The present work aimed to understand the mechanisms of action of two types of myeloid cells, microglia and neutrophils, in various models of CNS disorders. The specific goals of my research were: (a) understanding the role of IL-36 in neuroinflammation established during experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE); (b) evaluating the implication of GPR84, a G-protein coupled receptor, which is specifically expressed by microglia in the CNS during cognitive function alterations in a transgenic mouse model of AD. Our results showed that the levels of IL-36/IL-36R signalling pathway elements are increasing in three different models of EAE, however they contribute neither to the development nor to the progression of this pathology. Using flow cytometry we identified neutrophils as a major source of IL-36 γ . Moreover, we demonstrated that microglia express IL-36R and their stimulation with IL-36 γ results in the production of pro-inflammatory cytokines. In the second part of our research, we characterized the increase of GPR84 expression on microglia during AD progression using APP/PS1 mice. Crossing these mice with GPR84 deficient mice decreases the activation and the recruitment of microglia around β -amyloid plaques and accelerates the cognitive decline. Our data imply an important role for GPR84 in the maintenance of neuronal homeostasis since its lack contributes to the dendritic degeneration in the brain. Discoveries made during my studies provide new and valuable insights that may contribute to the development of efficient therapies targeting myeloid cells in different CNS pathologies. My results open up new avenues to elucidate the role of IL-36 γ in neurodegenerative diseases. Furthermore, through my work, we introduce an *in vivo* model for identifying the endogenous ligand of GPR84, which is a potential therapeutic target for prevention and/or treatment of AD.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures	ix
Liste des abréviations	x
Remerciements	xii
Avant-Propos	xiii
Chapitre 1: Introduction générale.....	1
1.1 Neuroinflammation.....	1
1.2 Structure immunologique unique du SNC.....	2
1.3 Système immunitaire	3
1.3.1 Immunité innée	4
1.3.2 Immunité acquise.....	4
1.4 Cellules myéloïdes.....	6
1.4.1 Microglie	7
1.4.2 Neutrophiles.....	8
1.5 Mécanismes de communication intercellulaire.....	9
1.5.1 Famille de l'IL-1.....	9
1.5.1.1 Membres et régulation de la famille de l'IL-1	9
1.5.1.2 Signalisation de l'IL-1	11
1.5.1.3 IL-1 et neuroinflammation.....	12
1.5.2 Famille de l'IL-36.....	12
1.5.2.1 IL-36 et inflammation	13
1.5.2.2 Signalisation de l'IL-36	14
1.5.3 Récepteurs couplés aux protéines G (GPCR)	15
1.5.3.1 Les lipides comme ligands pour les GPCRs.....	16
1.5.3.2 GPR84.....	16
1.6 Maladies auto-immunes.....	17
1.6.1 Maladies auto-immunes démyélinisantes	18
1.6.1.1 Immunopathogenèse de la sclérose en plaques (SEP).....	19
1.6.1.2 Description de l'encéphalomyélite aiguë disséminée (EMAD).....	21
1.6.1.3 Description de la neuromyéélite optique (NMO).....	22
1.6.2 Modèles d'EAE	22
1.6.2.1 EAE par immunisation active.....	22
1.6.2.2 EAE par transfert adoptif	24
1.6.2.3 Modèle 2D2	24

1.6.3 Cellules myéloïdes dans l'EAE	24
1.6.3.1 Neutrophiles dans l'EAE	25
1.7 Maladie d'Alzheimer (MA)	28
1.7.1 Descriptif de la maladie d'Alzheimer	28
1.7.2 Modèle de souris APP/PS1	29
1.7.3 Rôle de la microglie dans la réponse immunitaire dans la maladie d'Alzheimer	30
1.7.3.1 Activation microgliale par l'amyloïde- β	30
1.7.3.2 Implication de la microglie dans la maladie d'Alzheimer	30
1.8 Problématiques, hypothèses et objectifs	33
Chapitre 2: Interleukine-36γ est exprimée par les neutrophiles et peut activer la microglie, mais n'intervient pas dans l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale	36
2.1 Notes introductives et contributions	36
2.2 Résumé	37
2.3 Interleukin-36 γ is expressed by neutrophils and can activate microglia, but has no role in experimental autoimmune encephalomyelitis	38
2.4 Abstract	39
2.5 Background	40
2.6 Methods	41
2.6.1 Animals	41
2.6.2 EAE induction by active immunization	41
2.6.3 EAE induction by adoptive transfer	42
2.6.4 EAE induction in 2D2 mice	42
2.6.5 Evaluation of EAE symptoms	42
2.6.6 Cell suspension and flow cytometry	42
2.6.7 Western blotting	43
2.6.8 Immunostaining	43
2.6.9 <i>In situ</i> hybridization	43
2.6.10 Microscopy	43
2.6.11 Microglial cell isolation and culture	44
2.6.12 RNA extraction and qRT-PCR	44
2.6.13 Statistical analyses	44
2.7 Results	45
2.7.1 Neutrophils express IL-36 γ in the CNS and hematopoietic tissues of EAE mice	45
2.7.2 Microglia respond to IL-36 γ by expressing inflammatory genes	46
2.7.3 The IL-36 γ -IL-36R axis does not influence the course of active EAE	47
2.8 Discussion	47
2.9 Competing interests	48
2.10 Acknowledgments	48
2.11 References	49
2.3.10 Figures	54
2.3.11 Supplementary files	60

Chapitre 3: La déficience en GPR84 réduit la microgliose, mais accélère la dégénération dendritique et le déclin cognitif dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer	63
3.1 Notes introductives et contributions	63
3.2 Résumé	64
3.3 GPR84 deficiency reduces microgliosis, but accelerates dendritic degeneration and cognitive decline in a mouse model of Alzheimer's disease	65
3.4 Abstract.....	66
3.5 Introduction.....	67
3.6 Materials and Methods.....	68
3.6.1 Animals	68
3.6.2 EAE induction and clinical evaluation	68
3.6.3 LPS treatment and sickness behavior assessment	69
3.6.4 Cognitive analysis	69
3.6.5 Immunostaining.....	69
3.6.6 <i>In situ</i> hybridization	69
3.6.7 Congo red staining.....	70
3.6.8 Stereological analyses	70
3.6.9 Electron microscopy.....	70
3.6.10 Protein extraction	71
3.6.11 Western blotting	71
3.6.12 Statistical analyses	72
3.7 Results.....	72
3.7.1 GPR84 is upregulated in microglia of APP/PS1 mice	72
3.7.2 GPR84 influences the clinical outcome in APP/PS1 mice, but not in mice suffering from EAE or endotoxic shock	72
3.7.3 GPR84 promotes the accumulation of microglia around amyloid plaques.....	73
3.7.4 GPR84 does not affect β -amyloid deposition and accumulation	73
3.7.5 The lack of GPR84 increases β -amyloid-induced dendritic degeneration	74
3.7.6 The lack of GPR84 does not affect adult hippocampal neurogenesis.....	74
3.8 Discussion	75
3.9 Conflict of interest	76
3.10 Acknowledgments.....	76
3.11 References	77
3.11 Figures.....	82
Chapitre 4: Discussion générale et conclusions	90
4.1 IL-36 γ et l'inflammation	90
4.2 Rôle des neutrophiles dans les maladies démyélinisantes auto-immunes	92
4.3 GPR84 et microglie.....	94
Bibliographie.....	98

Liste des tableaux

Tableau 1-1. Nomenclature des membres de la famille de l'IL-1.	10
Supplementary Table 2-1. Primers used for genotyping.....	60
Supplementary Table 2-2. Primers used for qRT-PCR.....	61
Supplementary Table 2-3. Genes that were up-regulated ≥ 2 times in BV2 microglial cells cultured for 6h with recombinant IL-36 γ (100 ng/ml), as determined using Affymetrix DNA microarrays.	62

Liste des figures

Figure 1-1. Méninges et composition de la BHE.	3
Figure 1-2. Développement de la microglie et autres cellules myéloïdes.	5
Figure 1-3. Activation et régulation des membres de la famille de l'IL-1.	111
Figure 1-4. Rôle de l'IL-36 dans l'immunité innée et adaptative.	133
Figure 1-5. Formes cliniques principales de la SEP.	200
Figure 1-6. Migration et fonction effectrice des cellules T réactives à la myéline au cours de l'EAE.	233
Figure 1-7. Schéma des différentes étapes d'actions microgliales au cours de la MA.	311
Figure 2-1. IL-36 γ and IL-36R are transcriptionally upregulated in 3 EAE models.	544
Figure 2-2. IL-36 γ is selectively expressed by neutrophils, while IL-36R is expressed by different leukocytes such as monocytic cells.	555
Figure 2-3. IL-36 γ stimulates the expression of inflammatory genes in microglial cultures.	577
Figure 2-4. Neither IL-36 γ nor IL-36R is required for EAE development.	58
Figure 2-5. No difference in leukocyte recruitment in the spinal cord of EAE mice expressing or not IL-36 γ or IL-36R.	59
Figure 3-1. Expression of GPR84 mRNA in the brains of APP/PS1 transgenic mice.	832
Figure 3-2. Clinical assessment of GPR84 knockout and wild-type mice in three disease models.	844
Figure 3-3. Microgliosis in APP/PS1 transgenic mice deficient or not in GPR84.	855
Figure 3-4. Amyloid burden in APP/PS1 transgenic mice deficient or not in GPR84.	866
Figure 3-5. Dendritic degeneration in APP/PS1 mice deficient or not in GPR84.	87
Figure 3-6. Hippocampal neurogenesis in APP/PS1 transgenic mice lacking or not GPR84.	89

Liste des abréviations

* A noter que les termes anglais sont en italiques.

ACF	Adjuvant complet de Freund
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPc	Adenosine monophosphate cyclique
APP	<i>Amyloid precursor protein</i>
ATP	Adenosine triphosphate
A β	Amyloïde- β
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CMH-I (II)	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (II)
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
EAE	Encéphalomyélite auto-immune expérimentale
EMAD	Encéphalomyélite aiguë disséminée
G-CSF	<i>Granulocyte-stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GPCR	<i>G-Protein coupled receptors</i>
IFN γ	Interféron gamma
IgG	Immunoglobuline de type G
IL-1	Interleukine-1
IL-17A	Interleukine-17A

IL-23	Interleukine-23
IL-36	Interleukine-36
LCR	Liquide céphalo-rachidien
MA	Maladie d'Alzheimer
MOG	<i>Myelin oligodendrocyte glycoprotein</i>
MPO	Myéloperoxydase
NMO	Neuromyérite optique
OLS	Organes lymphoïdes secondaires
PS	Préséniline
PTX	<i>Pertussis toxin</i>
RO	Réactifs de l'oxygène
SEP	Sclérose en plaques
SEPPP	SEP primaire progressive
SEPRR	SEP récurrente-rémittente
SEPSP	SEP secondaire progressive
SNC	Système nerveux central
TCR	<i>T-cell receptor</i>
TGF- β	<i>Tumor growth factor-β</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, Dr Luc Vallières, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Sa rigueur scientifique, son esprit positif et son dévouement à la recherche m'ont inspiré durant tout mon parcours. Je tiens à vous remercier, Dr Vallières, pour toute votre confiance et votre soutien envers moi.

Je ne peux pas oublier notre équipe qui m'a toujours été d'une grande aide. Aline, Alex, Jean-François, William, je suis très reconnaissante envers vous pour l'ambiance agréable de travail que vous avez créée. Les discussions enrichissantes, des fois agitées, qu'on a eues ensemble ont amplement contribué au développement de mon esprit scientifique.

Je voudrais remercier les membres de mon jury (Dr Vallières, Dre Tremblay, Dr Pouliot et Dr Fernandes) pour votre précieux temps à évaluer ma thèse et assister à ma soutenance. Merci aussi au CTRN, à l'UGAB et aux FQRNT pour le soutien financier au cours de mes études.

Je veux remercier tous mes amis que j'ai connus à Québec. Sofia, Camille, Vincent, Courtney, Francesco, Charalampos, Filippo, Francesca, Hèlia, Alex, Yanina, Lynda, Delphine, Flavien, Archana, Sarah, Audrey, Julia, Sofia vous avez facilité mon intégration dans cette nouvelle culture et m'avez réchauffé le cœur pendant les hivers québécois. Une petite sortie avec vous après les longues heures de travail au laboratoire m'a donné le courage de tenir le coup des expériences échouées ou des résultats négatifs et de rentrer au laboratoire le lendemain avec un grand sourire. Je tiens surtout à remercier Julia pour son énorme travail d'amélioration de la qualité du français de ma thèse.

Je veux aussi remercier mes amis arméniens de l'Université Laval. Sona, Karen, Vahe, Anush, Lia, Aïk, Aram vous avez créé une petite Arménie ici et avez aidé à relaxer mon cerveau en parlant ma langue natale et à faire la fête comme chez nous.

Je remercie énormément toute ma famille en Arménie, surtout mon père, ma mère, mes deux soeurs, Tatev et Nuard, et mon frère, Mesrop. Vos conseils précieux et votre support moral m'ont donné la force de persévérer et me rendre au bout de ce long projet qu'est le doctorat. Merci d'avoir toujours cru en moi.

Finalement, je tiens à remercier les deux hommes de ma vie: mon mari, Jivan, et mon petit ange, Tigran. Merci pour votre amour inconditionnel, votre compréhension et votre support immense tout le long de mes études graduées.

Avant-Propos

Le premier chapitre de cette thèse est une introduction générale portant sur les différentes notions de la neuroinflammation qui sont essentielles pour la compréhension des chapitres suivants.

Le Chapitre 2 correspond à un article intitulé: *Interleukin-36 γ is expressed by neutrophils and can activate microglia, but has no role in experimental autoimmune encephalomyelitis* dont la liste des auteurs est: Lusine Bozoyan, Aline Dumas, Alexandre Patenaude et Luc Vallières. Je suis l'auteure principale de cette étude qui a été publiée dans le *Journal of Neuroinflammation* le 17 septembre 2015 et peut être retrouvée sous le lien suivant: <http://www.jneuroinflammation.com/content/12/1/173>. Dans cet article nous avons démontré que l'Interleukine-36 γ est exprimée par les neutrophiles et peut activer la microglie, mais qu'elle n'intervient pas dans le développement de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale. Mon rôle a été de contribuer au projet en y apportant mes idées, développer et réaliser toutes les expériences, analyser les résultats, monter les figures et rédiger l'article. Les Drs Aline Dumas et Alexandre Patenaude m'ont assistée pour la réalisation de certaines expériences. Le Dr Luc Vallières a conceptualisé le projet et amélioré le manuscrit.

Le Chapitre 3 est un article intitulé: *GPR84 deficiency reduces microgliosis, but accelerates dendritic degeneration and cognitive decline in a mouse model of Alzheimer's disease*. La liste des auteurs de cet article est: Julie Audoy-Rémus, Lusine Bozoyan, Aline Dumas, Mohammed Filali, Cynthia Lecours, Steve Lacroix, Serge Rivest, Marie-Ève Tremblay et Luc Vallières. Il est publié dans la revue prestigieuse *Brain, Behaviour and Immunity*, le 28 janvier 2015, et peut être retrouvé sous le lien suivant: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889159115000136>. Dans cette étude, nous avons démontré que la déficience en GPR84 réduit la microgliose, mais accélère la dégénérescence dendritique et le déclin cognitif dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer (MA). Ce projet a été initié avant mon arrivée au laboratoire par Dre Julie Audoy-Rémus. Elle a produit les résultats des Figures 3-1 (a-d, f-h); 3-3 et 3-4. Dr Mohammed Filali a effectué tous les tests de comportement sur les souris (Figure 3-2). Dre Marie-Ève Tremblay et Cynthia Lecours ont fourni les résultats de microscopie électronique (Figure 3-5). Dans cet article, je suis deuxième auteure et j'ai réalisé les résultats des Figures 3-1e et 3-6. Mon travail a donc été de quantifier l'expression du GPR84 durant le vieillissement des souris APP/PS1. J'ai montré qu'en absence de GPR84 la neurogenèse postnatale n'est pas affectée dans le modèle murin de la MA APP/PS1 permettant d'exclure son rôle dans les troubles d'apprentissage et de mémoire caractérisés. L'article ayant été principalement écrit par les Dr Luc Vallières et Dre Julie Audoy-Rémus, j'ai contribué à la révision de l'article, l'apport en nouvelles idées, l'analyse statistique et la création des figures.

Enfin, le Chapitre 4 est une discussion générale sur les résultats obtenus dans les chapitres précédents et les mécanismes d'action possibles des molécules étudiées. Cette discussion soulève également plusieurs

questionnements dans le domaine toujours controversé de l'implication des neutrophiles dans la sclérose en plaques.

Je dois mentionner que les études présentées dans cette thèse représentent les travaux de recherche que j'ai effectués durant la dernière partie de mon doctorat. En effet, j'ai commencé mon doctorat par une étude mettant en évidence le mécanisme de la formation du chemin de migration des progéniteurs neuronaux situés dans la zone sous-ventriculaire durant le développement postnatal. Ces résultats ont été publiés dans le *Journal of Neuroscience*, le 1^{er} février 2012, et peuvent être visionnés sous le lien suivant: <http://www.jneurosci.org/content/32/5/1687.long>. Par la suite, j'ai travaillé sur des projets portant sur la croissance des tumeurs cérébrales, particulièrement des glioblastomes. Malheureusement, par faute de temps, nous n'avons pas pu répéter certaines expériences et compléter ces études dont les résultats sont négatifs et non publiés. Néanmoins, j'ai effectué un énorme travail pour créer des lignées cellulaires astrocytomales génétiquement modifiées, les transplanter dans le cerveau de souris et analyser les glioblastomes formés. La réalisation de tous ces projets m'a permis de bien maîtriser la technique de modification génique à l'aide des nucléases à doigts de zinc, les injections stéréotaxiques et la stéréologie. Je suis convaincue que les connaissances et les outils acquis durant mon doctorat me serviront pour la suite de ma carrière professionnelle.

Chapitre 1: Introduction générale

Il est connu depuis très longtemps que l'inflammation du système nerveux central (SNC), aussi appelée neuroinflammation, joue un rôle essentiel dans des maladies neurodégénératives telles que la sclérose en plaques (SEP) et la maladie d'Alzheimer (MA). Ces maladies entraînent une perte progressive de neurones conduisant à une diminution des capacités mentales et/ou motrices des personnes atteintes et constituent l'une des principales causes d'incapacité au sein de la population canadienne.

Une compréhension approfondie des mécanismes de l'activation des cellules immunitaires résidentes du SNC et du recrutement des leucocytes périphériques pourrait amener à la découverte d'approches thérapeutiques permettant de contrer la progression de ces affections dégénératives. Un des défis majeurs est de comprendre pourquoi et comment les cellules myéloïdes sont activées afin de décrire précisément leur rôle dans les différentes phases des pathologies du SNC. Mes travaux de recherche visent à mieux comprendre les mécanismes de l'implication des cellules myéloïdes dans les maladies auto-immunes démyélinisantes et la MA. Plus particulièrement, j'ai étudié le rôle de l'IL-36 γ exprimée par les neutrophiles au cours de l'EAE (modèle murin de neuroinflammation pour l'étude des maladies auto-immunes démyélinisantes), ainsi que l'action du GPR84, un récepteur couplé à la protéine G spécifique à la microglie dans le SNC, dans l'EAE, l'endotoxémie et un modèle transgénique murin de la maladie d'Alzheimer.

Dans cette partie de ma thèse, je vais présenter l'état des connaissances actuelles sur lesquelles nos travaux de recherches sont basés.

1.1 Neuroinflammation

L'inflammation est une réponse immunitaire essentielle pour la guérison de toute lésion. Elle a pour but d'éliminer la cause initiale du dommage cellulaire ainsi que les débris et les tissus nécrotiques suite à une quelconque blessure ou menace extérieure. Sa fonction principale est de restaurer l'homéostasie de l'organisme. L'inflammation comprend un dommage tissulaire et requiert un remodelage du tissu blessé pour rétablir la santé de l'organisme (Shechter and Schwartz, 2013). À défaut d'un contrôle précis de la coordination d'évènements entraînant l'initiation, la progression et la résolution de l'inflammation, la réponse immunitaire peut être associée à des dommages tissulaires importants comme décrits dans le cadre des maladies affectant le SNC (Schwartz and Baruch, 2014). Le SNC est le système le plus délicat de l'organisme, puisque son potentiel de régénérescence est très limité. Il est donc critique de garder l'homéostasie dans le SNC, car tout dommage tissulaire pourrait être fatal pour les circuits neuronaux, les cellules nerveuses étant des entités post-mitotiques très sensibles. C'est d'ailleurs pourquoi une structure hautement spécialisée,

appelée barrière hémato-encéphalique (BHE), protège le parenchyme du SNC des substances et des cellules indésirables qui peuvent se trouver dans la circulation sanguine et altérer l'homéostasie du SNC.

1.2 Structure immunologique unique du SNC

Les vaisseaux sanguins du SNC sont formés par des cellules endothéliales spécialisées qui ont une faible activité pinocytaire et sont scellées entre elles avec des jonctions serrées et adhérentes (Bechmann et al., 2007; Alvarez et al., 2011). Ces cellules endothéliales sont entourées de prolongements astrocytiques (appelés *glia limitans*) et constituent la barrière hémato-encéphalique (BHE) (Figure 1-1A). Cette organisation unique de capillaires délimite le parenchyme du SNC et rend l'accès des cellules immunes périphériques au cerveau, à la moelle épinière et au nerf optique hautement sélectif. Cependant, le SNC possède un système de surveillance méningée complexe composé de leucocytes périphériques (McMenamin, 1999; Chinnery et al., 2010; Ransohoff and Engelhardt, 2012). En effet, une accumulation des cellules immunitaires est observée au cours de différentes pathologies du SNC dans la leptoméninge qui représente deux membranes physiques actives (la pie-mère et l'arachnoïde) entourant le SNC (Figure 1-1B). Il est intéressant de noter que c'est entre la pie-mère et l'arachnoïde, dans l'espace subarachnoïde, que le liquide céphalo-rachidien (LCR) (Figure 1-1) circule et évacue les molécules et les «déchets» provenant du cerveau (Whedon and Glassey, 2009). De ce fait, les leptoméniges représentent un endroit idéal où les cellules présentatrices d'antigènes peuvent faire l'échantillonnage du matériel qui sort du SNC. Ainsi, c'est dans les leptoméniges que l'immunosurveillance du SNC est effectuée: les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) y circulent abondamment phagocytant les particules étrangères. Par la suite, elles expriment les peptides digérés sur leur surface, couplés aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), et les présentent aux cellules T. Les cellules T ayant des récepteurs (*TCR-T cell receptor*) qui reconnaissent les peptides présentés par la CPA s'activent et montent une réponse spécifique contre tout danger. De cette façon, les mécanismes d'immunosurveillance permettent la détection des dommages et des infections dans le SNC et engendrent une réponse inflammatoire. Donc, malgré le fait que les cellules immunes ne circulent pas librement dans le parenchyme du SNC comme dans les organes périphériques, le SNC reste une entité immunologiquement active qui possède tous les éléments pour établir une réponse immunitaire complexe.

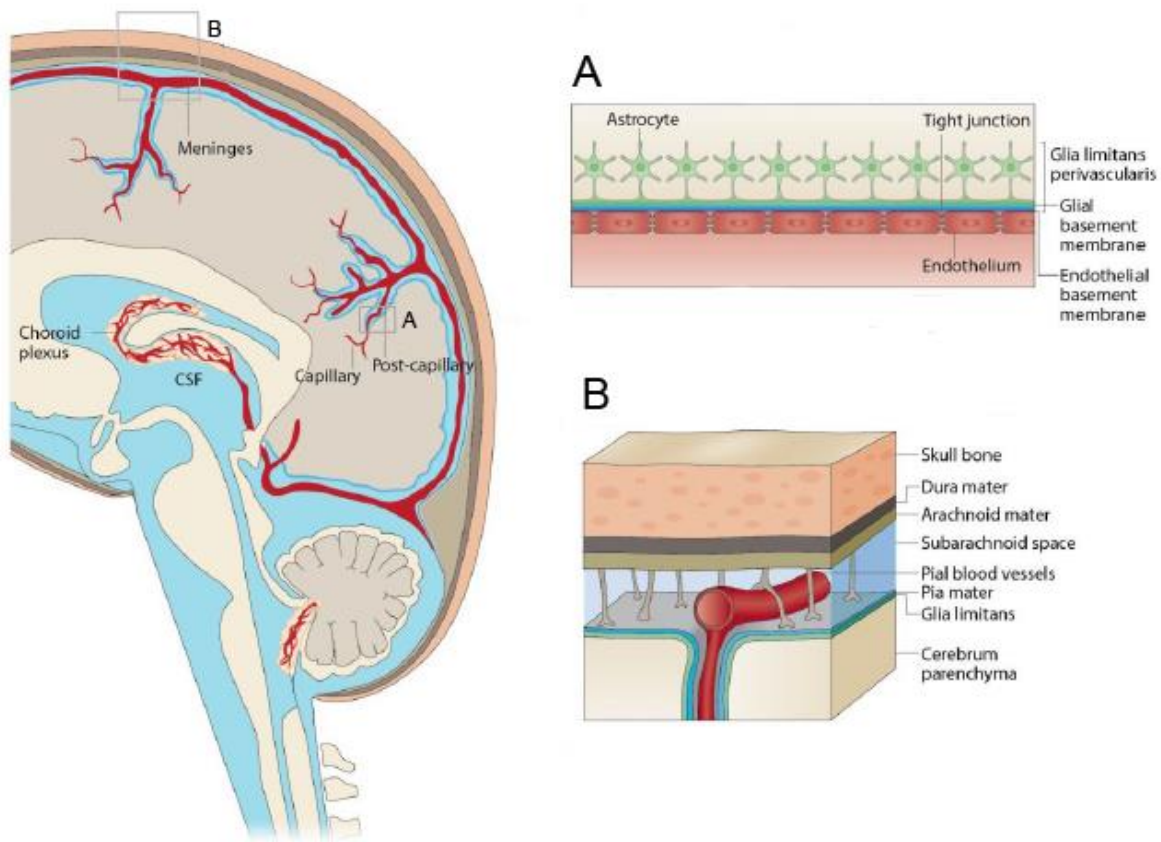


Figure 1-1. Méninges et composition de la BHE.

(A) La BHE est composée de l'endothélium avec ses jonctions serrées et sa membrane basale, de l'espace périvasculaire et de la *glia limitans* qui consiste essentiellement en une membrane basale et des pieds astrocytaires. Lors de certaines réactions inflammatoires, différents leucocytes peuvent infiltrer au travers de l'endothélium pour migrer dans l'espace périvasculaire. (B) Le cerveau est protégé par le crâne et les méninges. Du LCR (en bleu) est continuellement produit par le plexus choroïde et circule par un système de ventricules permettant l'irrigation des espaces subarachnoïdes et périvasculaires. Adaptée de (Shechter et al., 2013a).

1.3 Système immunitaire

Le système immunitaire est l'ensemble des éléments qui discrimine et défend l'organisme de toute agression et dysfonctionnement cellulaire. Les principaux effecteurs du système immunitaire recrutés sur les sites d'infection ou du dommage tissulaire sont les leucocytes qui circulent constamment dans le sang et les

organes lymphoïdes. Toutes les cellules du sang proviennent d'une même cellule souche hématopoïétique qui réside au sein de la moelle osseuse et produit à la fois les progéniteurs lymphoïdes et myéloïdes. Ces cellules sont ensuite regroupées au sein de deux systèmes d'immunité qui interagissent en permanence pour rétablir l'homéostasie de l'organisme: l'immunité innée et l'immunité acquise.

1.3.1 Immunité innée

L'immunité innée représente la première ligne de défense de l'organisme contre tout dommage et agent pathogène invasif. Les cellules du système immunitaire inné sont toujours présentes dans l'organisme et sont rapidement mobilisées au site d'infection et utilisent des mécanismes non spécifiques, comme la phagocytose, pour l'élimination des pathogènes. Les principaux types cellulaires faisant partie du système immunitaire inné impliqués dans les processus neuroinflammatoires sont les monocytes, les leucocytes phagocytaires (microglie, macrophages, neutrophiles) et les cellules dendritiques (Ransohoff and Brown, 2012). Toutes ces cellules proviennent d'un progéniteur myéloïde commun CD11b⁺ et sont regroupées sous le nom de cellules myéloïdes.

Il est intéressant de mentionner que la population microgliale est établie dans le parenchyme SNC à partir des précurseurs myéloïdes du sac vitellin durant l'embryogenèse (Ginhoux et al., 2010). Ces cellules s'autorenouvellent tout au long de la vie adulte, indépendamment des cellules du sang (Vallieres and Sawchenko, 2003; Ginhoux et al., 2010; Ajami et al., 2011). Les autres populations myéloïdes sont dérivées des cellules souches de la moelle osseuse au cours de l'hématopoïèse définitive et sont régulièrement remplacées par les cellules du sang (Figure 1-2). Ces cellules myéloïdes jouent un rôle actif dans la pathophysiologie du SNC dont je vais parler dans la section 1.6.4.

1.3.2 Immunité acquise

Le progéniteur lymphoïde est responsable du développement des éléments du système immunitaire acquis ou adaptatif. C'est ce système immunitaire qui distingue le «soi» du «non-soi» et s'adapte à la nature exacte du «danger» afin de mettre en place une défense hautement spécifique. Dans les organes lymphoïdes secondaires (OLS) tels que les ganglions lymphatiques, les cellules dendritiques présentent des antigènes couplés au CMH de classe II (CMH-II) ou au CMH-I pour activer les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ naïfs, respectivement. Ensuite, un signal de co-stimulation par les molécules CD80, CD86 est indispensable pour déclencher la prolifération et la différenciation des lymphocytes dotés de récepteurs spécifiques à ces antigènes. Selon une hypothèse récente, la différenciation finale des cellules T se fait après leur réactivation par les CPA sur le site d'inflammation et non pas dans les OLS (Ley, 2014). Les lymphocytes cytotoxiques CD8⁺ tuent directement la cellule infectée, les lymphocytes CD4⁺ activent d'autres lymphocytes en sécrétant

des cytokines, et sont appelés des lymphocytes effecteurs auxiliaires : Th (T *helper*). On distingue 4 types principaux de cellules T CD4⁺ : Th1, Th2, Th17 et T_{reg}. La présence de différentes cytokines dans l'environnement durant l'interaction de la cellule T avec la cellule dendritique définit sa polarisation (Zhu et al., 2010). Par exemple, l'IFN γ et l'IL-12 entraînent la production des cellules Th1, le TGF- β et l'IL-23 mènent au développement des Th17. Les cellules T sont des acteurs essentiels dans la pathogenèse de l'EAE, un des modèles de maladies neuroinflammatoires utilisés dans cette thèse (Kurschus, 2015).

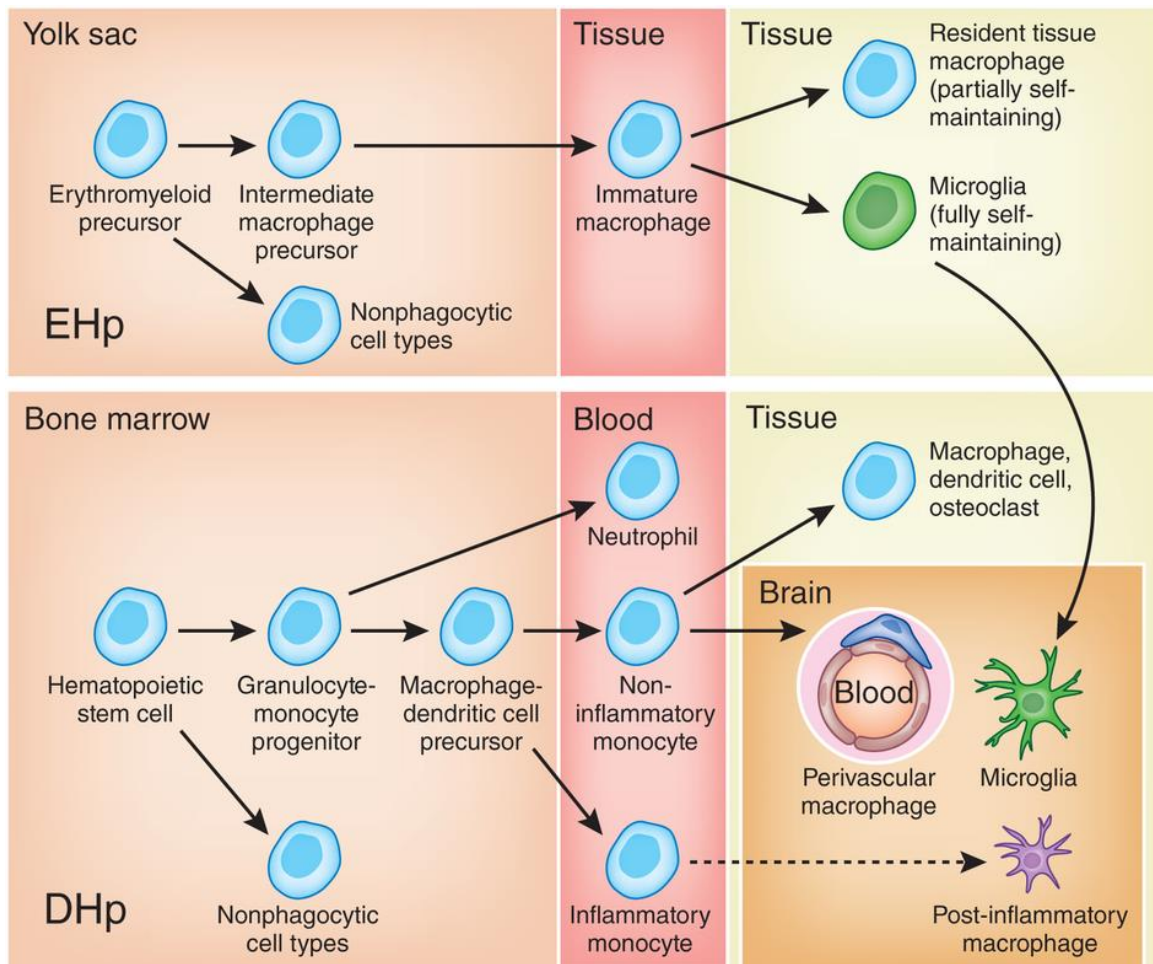


Figure 1-2. Développement de la microglie et autres cellules myéloïdes.

La microglie (en vert) est dérivée du précurseur érythromyéloïde du sac vitellin durant l'hématopoïèse embryonnaire (EHp-*embryonic hematopoiesis*). En revanche, la cellule souche hématopoïétique multipotente de la moelle osseuse est responsable de l'hématopoïèse définitive (DHp-*definitive hematopoiesis*) et donne naissance aux neutrophiles et aux autres cellules du sang tout au long de la vie adulte. Tiré de (Neumann and Wekerle, 2013).

1.4 Cellules myéloïdes

Dans le SNC, les cellules myéloïdes constituent une population hétérogène de cellules mononucléaires qui médient des réponses immunitaires durant le développement du cerveau, les conditions physiologiques et les maladies neuroinflammatoires (Prinz et al., 2011). Les cellules myéloïdes principales caractérisées au cours des pathologies du SNC sont les macrophages résidents (la microglie), les monocytes, les cellules dendritiques et les neutrophiles.

Pour garder l'homéostasie du cerveau et de la moelle épinière, la microglie surveille le parenchyme du SNC, tandis que les cellules dendritiques et les monocytes/macrophages périphériques patrouillent constamment la paroi luminale des leptoméninges, le plexus choroïde et l'espace périvasculaire (McMenamin, 1999; Chinnery et al., 2010). Une des fonctions essentielles des cellules myéloïdes est la présentation d'antigènes aux cellules T patrouillantes pour informer le système immunitaire périphérique de la présence de dangers potentiels dans le SNC. En conditions physiologiques, les monocytes peuvent transporter des antigènes de tous les tissus aux ganglions lymphatiques (Jakubzick et al., 2013). Récemment, une population de cellules dendritiques, les CPA professionnelles, a été caractérisée dans le parenchyme du cerveau dans des conditions normales (Mohammad et al., 2014). Les études montrent qu'à part les cellules dendritiques, les monocytes/macrophages présents dans les espaces méningés peuvent aussi présenter des antigènes dans le SNC (Miller et al., 2007; Anandasabapathy et al., 2011). Stratégiquement situé, ce réseau de cellules myéloïdes joue un rôle crucial dans le développement, la progression et la résolution des maladies neuroinflammatoires comme la SEP et la MA (Ransohoff and Engelhardt, 2012).

Les monocytes sanguins peuvent être divisés en 2 sous-types. Pour les différencier, les niveaux des antigènes de surface CX3 *chemokine receptor 1* (CX3CR1), CCR2 et *lymphocyte antigen 6 complex* (Ly6C) sont principalement utilisés. Les monocytes «inflammatoires» sont caractérisés par l'expression des antigènes de surface CX3CR1^{low}CCR2⁺Ly6C^{high} tandis que les monocytes «patrouilleurs» possèdent les marqueurs CX3CR1^{high}CCR2⁻Ly6C^{low}. Au cours des maladies neuroinflammatoires les cellules monocytaires CX3CR1^{low}CCR2⁺Ly6C^{high} dérivées du sang sont rapidement recrutées au SNC et peuvent se différencier en macrophages ou cellules dendritiques ayant des fonctions phagocytiques, protéolytiques et inflammatoires (King et al., 2009; Mildner et al., 2009; Geissmann et al., 2010). Bien qu'observés seulement dans certains contextes, les monocytes patrouilleurs CX3CR1^{high}CCR2⁻Ly6C^{low} peuvent également infiltrer les tissus et s'y différencier en macrophages (Auffray et al., 2009). De façon intrigante, il a récemment été rapporté que les monocytes Ly6C^{high} sont les précurseurs des monocytes patrouilleurs Ly6C^{low} et leur abondance dans le sang détermine la durée de vie de ces derniers (Yona et al., 2013). Il est intéressant de noter que les différentes populations myéloïdes peuvent réguler la persistance de l'inflammation menant à une neurodégénérescence

progressive aussi bien qu'ils peuvent initier la remyélinisation et la régénérescence du tissu (Miron et al., 2013; Yamasaki et al., 2014). Je vais détailler l'action de cellules myéloïdes dans la section 1.6.4.

Parmi toutes les populations de cellules myéloïdes, ma thèse est focalisée sur la microglie et les neutrophiles.

1.4.1 Microglie

Dans le SNC adulte, les microglies constituent environ 10% des cellules totales en fonction de la région cérébrale (Kraft and Harry, 2011). En condition physiologique, la cellule microgliale possède un petit corps cellulaire et présente une structure hautement ramifiée qui couvre un territoire unique dans le SNC. La microglie joue un rôle crucial dans la formation et le maintien des circuits neuronaux durant le développement et à l'âge adulte (Tremblay et al., 2010; Paolicelli et al., 2011; Schafer et al., 2012; Sierra et al., 2014; Zhan et al., 2014). Autrefois considérée «au repos», les études en imagerie *in vivo* révèlent la nature dynamique de la microglie. A l'aide de ses longs prolongements la microglie surveille constamment son environnement (Davalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005; Wake et al., 2009; Tremblay et al., 2010). En cas de détection de blessure, la microglie peut commencer à proliférer, ses extensions vont se rétracter et son corps cellulaire devient davantage amiboïde. En plus de ces changements morphologiques et suite à son activation, la microglie peut effectuer de diverses fonctions, incluant la phagocytose, la production de cytokines, de chimiokines et de facteurs trophiques ainsi que la présentation d'antigènes (Davalos et al., 2005; Ransohoff and Perry, 2009; Prinz and Priller, 2014).

La microglie partage plusieurs marqueurs avec les monocytes/macrophages périphériques comme CD11b et Iba1, toutefois son rôle semble être différent de ces derniers durant les pathologies neuroinflammatoires (Mildner et al., 2011; Yamasaki et al., 2014). Récemment, les approches transcriptomique et épigénétique ont révélé des facteurs de transcription et des marqueurs de surface uniquement régulés et exprimés par la microglie (Chiu et al., 2013; Hickman et al., 2013; Butovsky et al., 2014). À titre d'exemple, ces études ont démontré que la microglie exprime spécifiquement P2yr12 (récepteur purinergique P2Y 12 couplé à la protéine G) et Fcrls (Fc *receptor-like* S). De plus, contrairement aux macrophages périphériques, les molécules essentielles dans la présentation d'antigènes, comme CMH-II, CD80, CD86 sont à peine détectées sur la microglie durant homéostasie. Néanmoins, dans divers modèles de maladies neurodégénératives la microglie commence à les surexprimer (Ponomarev et al., 2005; Mildner et al., 2011; Prinz et al., 2011; Chiu et al., 2013). Les capacités de la microglie à détecter et à répondre au « danger » font de ces cellules des acteurs essentiels dans la neuroinflammation (Ransohoff and El Khoury, 2015).

De manière similaire aux macrophages périphériques, la microglie est hautement plastique. Ainsi, quelques études suggèrent que ces cellules pourraient être polarisées en M1 ou M2 (Durafour et al., 2012; Boche et al., 2013; Miron et al., 2013). De façon très générale, les macrophages polarisés en M1 démontreraient une réponse pro-inflammatoire classique tandis que les macrophages M2 seraient davantage impliqués dans la réponse anti-inflammatoire et la résolution de l'inflammation. Il semble que l'environnement du SNC aurait tendance à induire l'expression des molécules anti-inflammatoires par les macrophages/microglie (Schmid et al., 2009; Shechter et al., 2013b). Cependant, dans le cerveau de souris transgéniques modélisant la MA, des marqueurs de l'activation M1 et M2 ont été détectés sur les microglies entourant les plaques d'A β , suggérant un changement de phénotype au cours de l'évolution de la pathologie (Colton et al., 2006; Jimenez et al., 2008). Compte tenu de toutes ces évidences, l'action de la microglie peut être hautement contexte-dépendante. Je détaillerai rôle de la microglie dans le contexte de la maladie d'Alzheimer plus loin (section 1.7.3.2).

1.4.2 Neutrophiles

Les neutrophiles sont des phagocytes spécialisés et représentent la première ligne de défense de l'organisme. Ils jouent un rôle crucial dans la pathogenèse de plusieurs maladies incluant les infections causées par les pathogènes intracellulaires ou extracellulaires, l'auto-immunité, l'inflammation chronique et le cancer (Mantovani et al., 2011).

Les neutrophiles, aussi appelés granulocytes, sont des cellules polymorphonucléaires avec un noyau segmenté et un cytoplasme riche en vésicules et granules, d'où vient aussi leur nom. Ces granules contiennent diverses protéases (e.g. élastase, myéloperoxydase (MPO)) et molécules antibactériennes (lactoferrine, défensines, cathepsines, lysozyme) qui peuvent être mobilisées et libérées à la suite de différents stimuli (Borregaard, 2010). Le processus de dégranulation constitue un des mécanismes effecteurs essentiels des neutrophiles. Les neutrophiles hautement activés peuvent aussi libérer des structures extracellulaires composées d'ADN auxquelles des histones, des protéines et des enzymes sont associées. Ces structures sont appelées «pièges extracellulaires» et servent à immobiliser les pathogènes et à faciliter leur phagocytose subséquente (Kolaczkowska and Kubes, 2013). La phagocytose a longtemps été considérée comme la seule fonction des neutrophiles, mais l'avancement des connaissances en neuroimmunologie leur attribue également d'autres rôles durant les maladies neuroinflammatoires, comme la perméabilisation de la BHE et la présentation d'antigènes (Kolaczkowska and Kubes, 2013). Les actions possibles des neutrophiles dans les maladies auto-immunes démyélinisantes seront détaillées dans la section 1.6.3.1.1.

1.5 Mécanismes de communication intercellulaire

La réponse immunitaire est possible grâce à plusieurs types cellulaires qui doivent concerter leurs actions afin de combattre le danger. Cette communication entre cellules immunitaires se fait par contact physique, comme la présentation d'antigènes, ou bien par l'intermédiaire des molécules de signalisation sécrétées appelées cytokines. Les cytokines régulent la production, la maturation et le recrutement des leucocytes et sont les éléments essentiels au développement de la réaction inflammatoire. Les cytokines avec des propriétés chémo-attractantes, appelées aussi chimiokines, agissent sur leur cellule cible via des récepteurs couplés aux protéines G et régulent ainsi la mobilisation et la migration de ces cellules immunitaires vers les sites atteints (Ransohoff, 2009). L'identification de cytokines spécifiques à chaque type cellulaire dans différentes pathologies s'avère essentielle à la découverte de nouveaux biomarqueurs et au développement de molécules thérapeutiques efficaces.

Dans cette introduction, parmi les médiateurs inflammatoires existants une attention particulière sera accordée à la famille de l'Interleukine-1 (IL-1) et les récepteurs à sept hélices transmembranaires couplées aux protéines G (*G-protein coupled receptors*-GPCR).

1.5.1 Famille de l'IL-1

Les cytokines de la famille de l'IL-1 sont les régulateurs principaux de l'immunité et de l'inflammation. La signalisation de cette famille affecte pratiquement tous les types cellulaires et les organes et représente un médiateur pathologique majeur dans l'auto-immunité, les infections et les maladies neurodégénératives (Dinarello et al., 2012).

1.5.1.1 Membres et régulation de la famille de l'IL-1

La famille de l'IL-1 comprend 7 agonistes pro-inflammatoires (IL-1 α , IL-1 β , IL-18, IL-33, IL-36 α , IL-36 β et IL-36 γ), 9 récepteurs transmembranaires fonctionnels (IL-1R1, IL-1R2, IL-1RacP, IL-36R, ST2, IL-18Ra, SIGIRR, TIGIRR1 et TIGIRR2), 2 récepteurs leurres (*decoy receptors*) qui ne contiennent pas de domaine signalétique (IL-1R2 et IL-18Rb), 3 antagonistes de récepteurs (IL-1Ra, IL-36Ra et IL-38) et une molécule anti-inflammatoire (IL-37). La nomenclature des membres de cette famille et leurs noms alternatifs est présentée dans le Tableau 1. Les récepteurs ST2 et IL-1RacP peuvent aussi être présents sous forme soluble. Dans ce cas, ils ne contiennent plus le domaine signalétique transmembranaire et agissent comme récepteurs leurres ou régulateurs négatifs, en capturant les agonistes (Garlanda et al., 2013).

Tableau 1-1. Nomenclature des membres de la famille de l'IL-1.

Cytokine	Nom alternatif	Recepteur	Corecepteur
IL-1 α	IL-1F1	IL-1R1, IL-1R2	IL-1RAcP
IL-1 β	IL-1F2	IL-1R1, IL-1R2	IL-1RAcP
IL-1Ra	IL-1F3	IL-1R1	
IL-18	IL-1F4, IL-1 γ	IL-18R α	IL-18R β
IL-33	IL-1F11	ST2	IL-1RAcP (IL-1RAP)
IL-36 α	IL-1F6, FIL-1 ϵ	IL-1RL2 (IL-36R)	IL-1RAcP (IL-1RAP)
IL-36 β	IL-1F8, FIL-1 η , IL-1H2	IL-1RL2 (IL-36R)	IL-1RAcP (IL-1RAP)
IL-36 γ	IL-1F9, IL-1H1, IL-1 ϵ	IL-1RL2 (IL-36R)	IL-1RAcP (IL-1RAP)
IL-36Ra	IL-1F5, IL-1H3, IL-1 δ	IL-1RL2 (IL-36R)	
IL-37	IL-1F7, FIL1 ζ , IL-1H4	IL-18R α	
IL-38	IL-1F10, IL-1Hy2	IL-1RL2 (IL-36R)	
		TIR8 (SIGIRR)	

Adapté de (Garlanda and Mantovani, 2013)

La sécrétion de certains membres de la famille de l'IL-1 est sous le contrôle étroit de deux stimuli. Ainsi, l'IL-1 β et l'IL-18 sont pourvus de prodomaines N-terminal. Un stimulus initial, comme des motifs moléculaires associés au danger (*DAMPs- danger associated molecular patterns*) ou aux pathogènes (*PAMPs- pathogen associated molecular patterns*), est nécessaire pour causer l'accumulation de la forme proIL-1 β ou proIL-18 dans le cytosol. Ensuite, pour devenir biologiquement actif et être sécrété, le prodomaine de ces cytokines doit être clivé. Ce clivage est généralement catalysé par la caspase-1 qui est assemblée dans un complexe multiprotéique appelé inflammasome (Schroder and Tschopp, 2010; Rathinam et al., 2012). Ce complexe inclut aussi des protéines qui servent à la fois de détecteur des signaux de danger (ATP, produits de cellules mourantes, etc) et d'activateur de caspase-1. Plusieurs détecteurs d'inflammasomes sont caractérisés et la plupart d'entre eux appartiennent à la famille des récepteurs *Nod-like* (NLR) (Latz et al., 2013). Ainsi, la stimulation de l'inflammasome active la caspase-1, ce qui clive et sécrète l'IL-1 β et l'IL-18 (Martinon et al., 2009). Dans le cas des cytokines IL-1 α et IL-33, la forme active est déjà présente dans la cellule (Sims and Smith, 2010). Ces cytokines sont sécrétées immédiatement en réponse au dommage tissulaire et agissent comme des alarmines. Afin d'illustrer l'activation et régulation des membres de la famille de l'IL-1, un schéma récapitulatif est présenté dans la Figure 1-3.

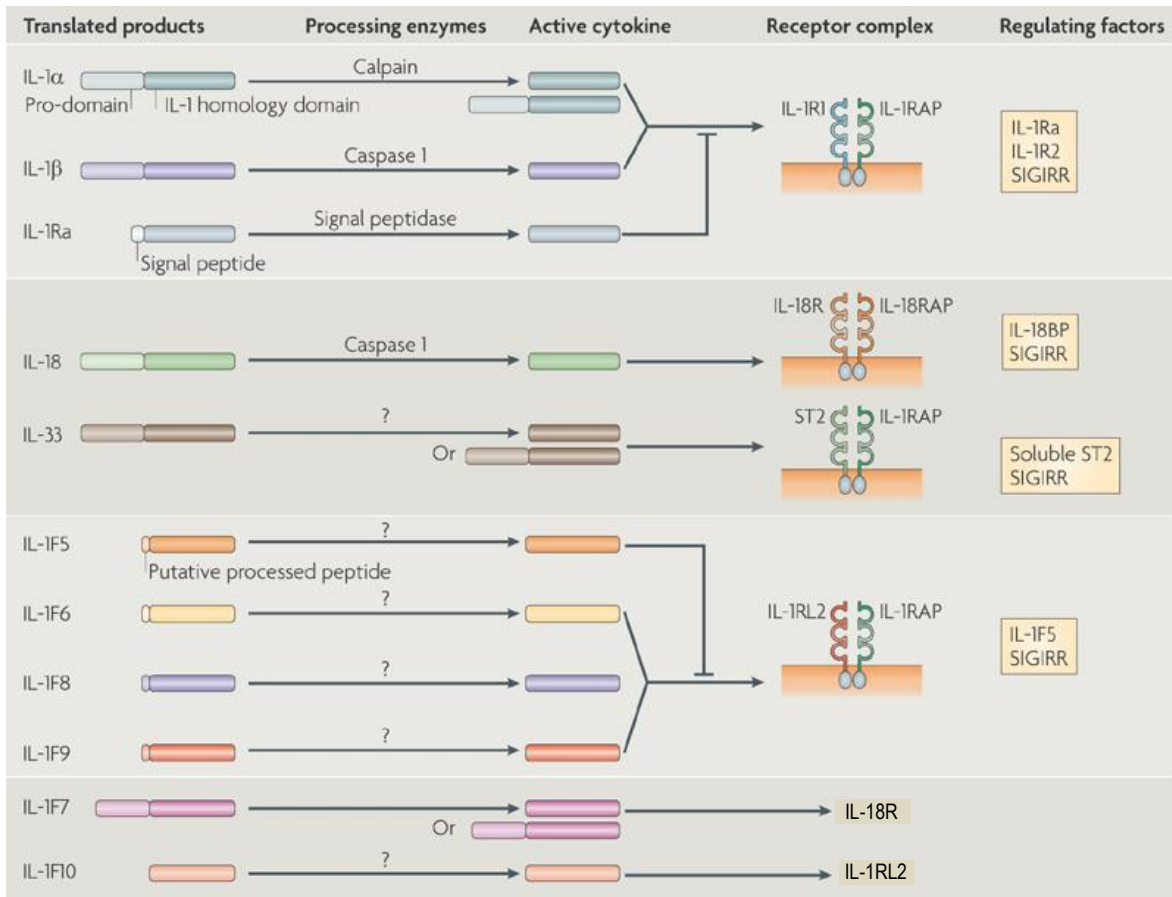


Figure 1-3. Activation et régulation des membres de la famille de l'IL-1.

Le schéma montre les cytokines de la famille de l'IL-1, les enzymes (si connues) qui les transforment pour produire des formes biologiquement actives, les récepteurs qu'ils utilisent et les molécules qui régulent leur action. Adaptée de (Sims and Smith, 2010)

1.5.1.2 Signalisation de l'IL-1

Les récepteurs des cytokines de la famille de l'IL-1 contiennent des domaines extracellulaires d'immunoglobulines et un domaine cytoplasmique Toll/IL-1R (TIR) (Sims and Smith, 2010). La réponse est initiée lorsque le ligand se lie à la sous-unité de son récepteur primaire, par exemple IL-1R1 dans le cas de l'IL-1 α et β , ou l'IL36R pour les cytokines IL-36. Cette liaison permet le recrutement de la seconde sous-unité du récepteur, *IL-1R accessory protein* (IL-1RAcP), qui est commune pour l'IL-1 et l'IL-36 (Sims and Smith, 2010). La formation de ce récepteur hétérodimère conduit à la juxtaposition des domaines TIR, induit les voies de signalisation *nuclear factor- κ B* (NF- κ B) et *mitogen activated protein-kinase* (MAPK) qui activent les facteurs de transcription *c-jun n-terminal kinase* (JNK) et p38.

1.5.1.3 IL-1 et neuroinflammation

Les thérapies anti-IL-1 ont un impact considérable dans les maladies inflammatoires. L'étude de ces cytokines dans les maladies auto-immunes a montré le rôle crucial de l'IL-1 α , IL-1 β , IL-18 et IL-33 dans les pathologies comme l'arthrite, le psoriasis et l'asthme (Dinarello et al., 2012). Les cytokines IL-1 α et IL-1 β sont les plus étudiées de cette famille. Ainsi, la signalisation IL-1R1 est requise pour le développement des cellules Th17 et la progression de la sclérose en plaques dans le modèle animal (Matsuki et al., 2006; Sutton et al., 2006; Chung et al., 2009). De plus, l'IL-1 β prolonge drastiquement la durée de vie des neutrophiles et des macrophages stimulant leurs fonctions effectrices (Mantovani et al., 2011).

Toutefois, la découverte de certains membres de la famille de l'IL-1 est relativement récente et leur rôle n'a pas encore été élucidé dans le cadre des maladies neuroinflammatoires, notamment la sous-famille de l'IL-36. Le Chapitre 2 de ma thèse décrit l'implication de la famille de l'IL-36 dans la pathologie de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE).

1.5.2 Famille de l'IL-36

Les membres de la famille de l'IL-36 ont été classés dans la grande famille de l'IL-1 étant donné leur homologie. Les agonistes de la famille IL-36 (IL-36 α , IL-36 β et IL-36 γ) interagissent avec le même récepteur, IL-36R, recrutent l'IL-1RacP et activent les voies de signalisation NF- κ B et MAPK (Debets et al., 2001; Towne et al., 2004; Vigne et al., 2011). Les antagonistes des cytokines IL-36 sont l'IL-36Ra (IL1F5) (Debets et al., 2001; Towne et al., 2004; Towne et al., 2011; Vigne et al., 2011) et l'IL-38 (IL1F10) (van de Veerdonk et al., 2012). Ces antagonistes se lient aussi à l'IL-36R mais ne sont pas en mesure de recruter la sous-unité IL-1RacP et n'activent donc pas de voie de signalisation. Aucune isoforme de l'IL-36 n'active le récepteur de l'IL-1 classique, IL-1R1 (Debets et al., 2001; Towne et al., 2004). Les cytokines IL-36 sont synthétisées sans peptide signalétique. Par conséquent, elles ne peuvent pas être sécrétées par le réticulum endoplasmique ni l'appareil de Golgi.

Les agonistes IL-36 ne semblent pas posséder de prodomaine semblable à l'IL-1 β ou à l'IL-18, mais le clivage N-terminal *in vitro* augmente leur activité biologique par 10³ à 10⁵ fois (Towne et al., 2011). Les isoformes de l'IL-36 partagent très peu d'homologie de séquence autour des sites de clivage entre eux et avec l'IL-1, ce qui suggère que différentes enzymes seraient impliquées dans la génération des agonistes biologiquement actifs de l'IL-36 (Nicklin et al., 2002; Taylor et al., 2002). De l'autre côté, l'étude de Jensen et coll. rapporte que le relargage de l'IL-36 γ par les keratinocytes est dépendant de la caspase-1 (Lian et al., 2012). La démonstration de l'existence des formes clivées de la famille IL-36 *in vivo* et l'identification de la (des) protéase(s) responsable(s) reste(nt) des questions importantes de la recherche actuelle. Dans mes travaux de doctorat

(Chapitre 2), j'ai démontré que la régulation de l'IL-36 γ est fortement augmentée, mais aucun clivage n'a été reporté durant l'EAE.

1.5.2.1 IL-36 et inflammation

Tout comme les autres membres de la famille de l'IL-1, l'IL-36 joue un rôle important dans l'immunité. Un grand nombre d'études impliquent actuellement ces cytokines dans différentes maladies inflammatoires auto-immunes. Des niveaux élevés des trois isoformes de l'IL-36 et de leur récepteur ont été observés dans le psoriasis, l'asthme et l'arthrite (Debets et al., 2001; Ramadas et al., 2007; Carrier et al., 2011; Chustz et al., 2011; Johnston et al., 2011; Frey et al., 2013) (Figure 1-4).

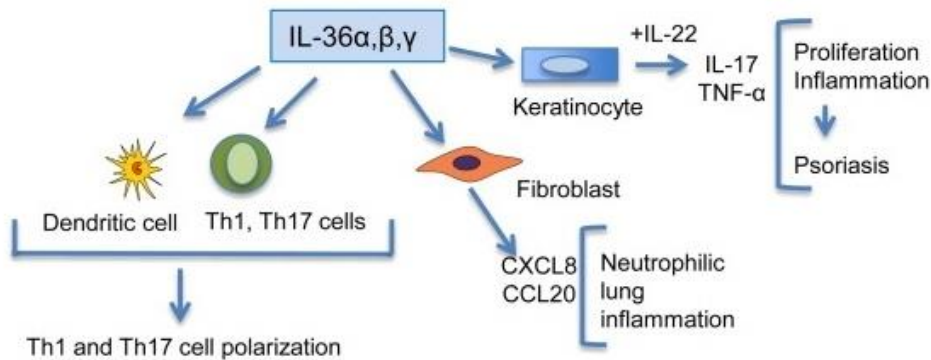


Figure 1-4. Rôle de l'IL-36 dans l'immunité innée et adaptative.

Le récapitulatif des effets biologiques des cytokines IL-36. Elles sont impliquées dans la maturation des cellules dendritiques et des cellules T, ainsi que le recrutement des neutrophiles. Les cytokines IL-36 sont des acteurs critiques dans la pathogenèse du psoriasis. Tiré de Garlanda, Mantovani 2013

Le rôle crucial de l'IL-36 α dans l'inflammation de la peau est maintenant bien établi dans les modèles murins de psoriasis (Debets et al., 2001; Blumberg et al., 2007; Blumberg et al., 2010; Carrier et al., 2011; Johnston et al., 2011; Tortola et al., 2012). À la naissance, les souris surexprimant l'IL-36 α présentent un phénotype similaire au psoriasis qui se normalise au sevrage. Ce phénotype est accentué quand ces souris transgéniques sont croisées avec des souris déficientes en IL-36Ra, un antagoniste d'IL-36 (Blumberg et al., 2010). Au contraire, le croisement des souris surexprimant IL-36 α avec des souris IL-36R $^{-/-}$ normalise le

phénotype de psoriasis. Il est intéressant de noter que, bien que les souris adultes qui surexpriment l'IL-36 α ne présentent pas d'anomalies au niveau histologique, elles développent rapidement le psoriasis après un traitement à l'ester de phorbol, un activateur de TLR utilisé pour induire une dermatite inflammatoire (Blumberg et al., 2010). En accord avec ces travaux, les souris déficientes en IL-36R sont protégées de l'inflammation de la peau induite par l'imiquimod, un agent stimulant les TLR7/8, tandis que les souris IL-36R α ^{-/-} développent une pathologie plus sévère (Tortola et al., 2012). De plus, les mutations dans le gène d'IL-36Ra sont associées à une forme plus sévère de psoriasis (Marrakchi et al., 2011; Onoufriadis et al., 2011; Sugiura et al., 2012; Farooq et al., 2013; Kanazawa et al., 2013; Sugiura et al., 2013).

1.5.2.2 Signalisation de l'IL-36

Dans les tissus épithéliaux, les cytokines IL-36 activent un circuit pro-inflammatoire qui conduit au recrutement des cellules T et des neutrophiles (Carrier et al., 2011; Johnston et al., 2011; Tortola et al., 2012). La stimulation des kératinocytes par IL-36 α ou IL-36 γ induit l'expression des cytokines telles que IL-17, IL-23, TNF α et IFN γ (Blumberg et al., 2007; Carrier et al., 2011). Des études *in vitro* ont montré que les fibroblastes et les cellules épithéliales de poumon répondent à la stimulation IL-36 α en induisant l'expression des chimiokines IL-8 et CXCL3 liées au recrutement des neutrophiles, ainsi que la chimiokine CCL20 qui stimule le recrutement des Th17 (Ramadas et al., 2012). De plus, l'administration intranasale de l'IL-36 α ou de l'IL-36 γ induit l'expression de CXCL1 et CXCL2 et entraîne un recrutement massif des neutrophiles dans les voies respiratoires (Ramadas et al., 2011).

La voie de signalisation IL-36/IL-36R peut également activer les cellules dendritiques. En effet, les cellules dendritiques murines et humaines expriment des niveaux élevés d'IL-36R et produisent les molécules IL-12, IL-23, IL-1 β , TNF α , IL-6, CCL1, CXCL1 et GM-CSF suite à la stimulation avec de l'IL-36 (Vigne et al., 2011; Mutamba et al., 2012; Foster et al., 2014). Ces cytokines et les chimiokines peuvent induire la prolifération des cellules T, la production de l'IFN γ et de l'IL-17 et donc, entraîner des réactions neuroinflammatoires impliquant des réponses Th1 et Th17 (Mutamba et al., 2012; Gresnigt et al., 2013; Foster et al., 2014). IL-36 peut également favoriser la maturation des cellules dendritiques en régulant positivement, à des niveaux plus élevés que l'IL-1 β , l'expression du CMH-II et des molécules co-stimulatrices CD40, CD80 et CD86 (Vigne et al., 2011; Mutamba et al., 2012; Foster et al., 2014). Une étude a même suggéré que l'IL-36 pourrait induire la polarisation des cellules T naïves directement et amorcer des réponses immunitaires précoces chez les souris dans le contexte d'infection mycobactérienne (Vigne et al., 2012). *In vitro*, IL-36 β agit en combinaison avec l'IL-12 pour induire la différenciation des cellules Th vers un phénotype cellulaire Th1⁺ produisant IFN γ et les souris IL-36R^{-/-} voient leurs réponses Th1 diminuer (Vigne et al., 2012).

Ainsi, les cytokines IL-36 induisent un recrutement massif des neutrophiles, aident à la maturation des cellules dendritiques et médient des réponses immunitaires Th1 et Th17; des processus qui sont critiques dans le développement de l'EAE. De plus, il a été rapporté que l'IL-36R est exprimé dans les méninges et le plexus choroïde par les cellules microgliales, les astrocytes et les vaisseaux sanguins (Lovenberg et al., 1996; Berglof et al., 2003), mais la fonction des cytokines IL-36 n'a jamais été explorée dans les pathologies affectant le SNC. Nous avons donc étudié le développement de l'EAE, modèle de maladie auto-immune inflammatoire du SNC, chez les souris déficientes en IL-36 γ ou en IL-36R.

1.5.3 Récepteurs couplés aux protéines G (GPCR)

La superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) est sans conteste la plus grande famille de récepteurs chez les mammifères qui encode plus de 800 gènes chez l'humain (Venkatakrisnan et al., 2013). Ces récepteurs sont définis par leur structure à sept hélices transmembranaires et leur capacité à induire une signalisation intracellulaire par l'activation d'une protéine G (Bjarnadottir et al., 2006). Cette protéine G hétérotrimérique est composée de trois sous-unités différentes appelées alpha, beta et gamma. En général, l'activation du GPCR entraîne la dissociation de la sous-unité α et du dimère β/γ . Ces deux parties restent ancrées dans la membrane plasmique de la cellule, mais ne sont plus liées au GPCR (Venkatakrisnan et al., 2013). Elles peuvent diffuser latéralement, interagir avec d'autres protéines et induire une signalisation intracellulaire. Trois principales sous-unités de $G\alpha$ sont caractérisées: $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_s$, $G\alpha_q$ qui activent différentes classes d'effecteurs, tels que la *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), les phospholipases C (PLC), les phosphodiésthérases, les phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K) et les adénylates cyclases (AC) (Venkatakrisnan et al., 2013). L'activation de ces enzymes mène à la production de molécules appelées «seconds messagers», comme l'inositol triphosphate (IP3) et le diacylglycérol (DAG), ou l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) qui initient et coordonnent les voies de signalisations intracellulaires. Par exemple, la voie de signalisation $G\alpha_{i/o}$ inhibe l'AC, l'enzyme catalysant la conversion de l'adénosine triphosphate (ATP) à l'AMPc et diminue ainsi les niveaux de ce dernier (Venkatakrisnan et al., 2013). Leur capacité à induire une signalisation intracellulaire à la suite des stimuli extracellulaires fait des GPCRs des cibles parfaites de thérapies. En effet, environ 50% de médicaments agissent en modifiant l'activité de ces récepteurs (Lagerstrom and Schioth, 2008). Les récepteurs de la sérotonine, les récepteurs métabotropiques de glutamate et de GABA, les récepteurs adrénérgiques sont tous des GPCR ce qui permet de les cibler dans le cadre des maladies mentales, cardiaques et autres. Ainsi, l'étude de ces récepteurs peut amener potentiellement à la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques.

1.5.3.1 Les lipides comme ligands pour les GPCRs

Les GPCRs répondent à une grande variété de stimuli extracellulaires comprenant notamment des ions, peptides, hormones, neurotransmetteurs, chimiokines et lipides (Lagerstrom and Schiöth, 2008). Parmi ces stimuli, les endocannabinoïdes constituent un groupe de messagers lipidiques (des dérivés d'acides gras), qui activent les GPCR CB₁ et CB₂ et jouent un rôle important dans des maladies neurodégénératives comme la SEP et la MA. Les études montrent que, en condition neuroinflammatoire, la microglie surexprime les récepteurs CB₁ et CB₂ stimulant sa fonction neuroprotectrice (Gowran et al., 2011). D'autres récepteurs comme GPR18, GPR55 s'activant par des cannabinoïdes sont aussi exprimés abondamment par la microglie et semblent moduler son activation (Kallendrusch et al., 2013) et sa migration (McHugh et al., 2010). D'autre part, l'absence du GPR34 à la surface de la microglie altère sa motilité et la phagocytose (Preissler et al., 2015).

Dernièrement, plusieurs GPCR ayant la capacité de lier des acides gras à courte (GPR41 et GPR43), moyenne (GPR84) et/ou longue chaîne (GPR40 et GPR120) ont été découverts. Étant donné le rôle essentiel des lipides dans la balance énergétique, ces GPCRs ont surtout été évalués pour leur implication au cours de pathologie comme le diabète de type 2 et l'obésité (Hara et al., 2014). L'expression de ces récepteurs par les cellules immunitaires souligne également leur potentiel à contrôler les processus inflammatoires. En effet, l'activation de GPR40 exprimé par les keratinocytes inhibe l'inflammation cutanée, en diminuant les réponses Th1 et Th2 via la suppression de CCL5, CCL17 et CXCL10 (Fujita et al., 2011). D'autres études démontrent que GPR43 est un récepteur essentiel dans le recrutement des neutrophiles et des monocytes et la sécrétion des cytokines lors de l'inflammation périphérique (Maslowski et al., 2009; Masui et al., 2013). La déficience en GPR43 entraîne une augmentation des niveaux de TNF α et IL-17 et une inflammation exacerbée dans des modèles murins d'arthrite, d'asthme et de colite (Maslowski et al., 2009; Masui et al., 2013). Dans un modèle d'obésité, l'activation du récepteur GPR120 par les acides gras oméga-3 au niveau des macrophages a un effet anti-inflammatoire caractérisé par la sécrétion de TNF α , IL-1 β et IL-6 (Oh et al., 2010; Oh da et al., 2014). En conclusion, la signalisation engendrée par les GPCRs active la sécrétion de divers médiateurs inflammatoires qui sont essentiels pour intervenir contre des pathologies du SNC.

1.5.3.2 GPR84

Le GPR84, un autre récepteur activé par des acides gras, est fortement surexprimé par la microglie et les cellules myéloïdes périphériques dans des conditions neuroinflammatoires telles que l'EAE, la démyélinisation induite par la cuprizone, la lésion de nerfs et l'endotoxémie induite par le LPS (Bedard et al., 2007; Bouchard et al., 2007; Gamo et al., 2008). Cette surexpression est dépendante des facteurs pro-inflammatoires TNF α et IL-1 β (Bouchard et al., 2007). Au niveau des macrophages, la stimulation du GPR84 augmente la production

de l'IL-12p40 et IL-8 (Wang et al., 2006; Suzuki et al., 2013). IL-12p40 est essentiel dans le développement de la réaction immunitaire médiée par les lymphocytes Th1 comme dans le cas de l'EAE. Il est intéressant de noter que l'inoculation d'un ligand du GPR84, le 6-n-octylaminouracil (6-OAU), dans les poches d'air sous-cutanées favorise le recrutement des neutrophiles et des macrophages (Suzuki et al., 2013). Les auteurs ont attribué cet effet à l'augmentation des niveaux de CXCL1 suite à la stimulation du GPR84. Dans une autre étude, les macrophages déficients en GPR84 ont un rôle anti-inflammatoire en diminuant la production de $TNF\alpha$, IL-1 β et IL-6 (Nicol et al., 2015). Basé sur toutes ces données, nous avons exploré le rôle physiopathologique du GPR84 dans l'EAE, l'endotoxémie et la MA. Cette étude fait l'objet du Chapitre 3 de cette thèse.

1.6 Maladies auto-immunes

Le terme auto-immun s'applique à une pathologie qui se développe lorsque des cellules immunitaires, particulièrement les cellules T, ciblent des antigènes du «soi» et attaquent les tissus de l'organisme. Les mécanismes précis du développement de la réponse auto-immune restent inconnus. Pour prévenir l'auto-immunité, au cours de la différenciation finale des cellules T, la sélection est une étape cruciale pour bien armer le système immunitaire avec la mise en place d'un répertoire d'antigènes pathogéniques variés (sélection positive) et l'élimination de l'auto-réactivité (sélection négative) (Starr et al., 2003). Il existe deux types de mécanismes permettant la tolérance du soi: la tolérance centrale restreinte au thymus et la tolérance périphérique qui a lieu au niveau des organes lymphoïdes secondaires (OLS) comme les ganglions lymphatiques, la rate ou les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (intestins, poumons, etc). Ainsi, selon le modèle basique de tolérance centrale, la liaison d'un antigène du soi présenté par une cellule dendritique à une cellule T non mature dans le thymus amène à sa délétion clonale, un processus appelé sélection négative (Hogquist et al., 2005). La tolérance centrale s'applique généralement aux antigènes du soi omniprésents dans le thymus. Les cellules T autoréactives aux antigènes spécifiques d'autres tissus de l'organisme sont éliminées par les mécanismes de la tolérance périphérique (Metzger and Anderson, 2011). Les OLS sont des lieux de drainage de la lymphe qui contiennent les déchets cellulaires. En effet, lorsque le sang passe dans un capillaire, au début du capillaire celui-ci donne au tissu une partie du liquide plasmatique, tandis qu'à la fin, presque la même quantité de liquide est récupérée par le capillaire du tissu. La quantité de liquide non récupérée, la lymphe, est drainée par les vaisseaux lymphatiques qui vont aboutir sur les OLS. Ainsi, les antigènes de tous les tissus périphériques de l'organisme vont migrer dans les OLS, activer les lymphocytes T ayant des récepteurs (TCR) spécifiques et subir encore une fois les processus de sélection positive ou négative (Metzger and Anderson, 2011).

Jusqu'à récemment, la tolérance immunologique était considérée inexistante contre les antigènes du SNC. Toutefois, dernièrement, une équipe a caractérisé pour la première fois une population dendritique CD11c+ patrouillante le parenchyme du cerveau dans des conditions normales (Mohammad et al., 2014). De plus, deux études récentes ont montré la présence de vaisseaux lymphatiques dans le SNC qui transportent des cellules immunitaires du LCR et sont directement connectés aux ganglions lymphatiques cervicaux (Aspelund et al., 2015; Louveau et al., 2015). Ainsi, la découverte des cellules dendritiques et du système lymphatique standard au niveau du SNC révèlent le mécanisme de génération de la tolérance périphérique par un antigène provenant du SNC.

Malgré l'efficacité des mécanismes de tolérance immunologique, le répertoire des cellules T matures périphériques contient des TCR spécifiques aux antigènes du soi (Hogquist and Jameson, 2014). De façon intrigante, les cellules T spécifiques aux antigènes restreints aux tissus autres que le thymus sont moins sujets à la sélection négative (Legoux et al., 2015; Yu et al., 2015). Il semble exister d'autres mécanismes de tolérance périphérique qui contrôlent ces cellules auto-réactives. Premièrement, elles peuvent survivre dans un état d'anergie ou d'hyporéactivité ayant un seuil élevé de stimulation par les antigènes (Choi and Schwartz, 2007; Fulton et al., 2015). Deuxièmement, dans certains organes exposés aux dangers exogènes, comme les poumons et les intestins, le nombre de T_{reg} , qui jouent un rôle immunosuppresseur, est augmenté (Sakaguchi et al., 2008; Legoux et al., 2015). La défaillance de ces mécanismes de tolérance centrale ou périphérique peut être à l'origine des maladies auto-immunes.

1.6.1 Maladies auto-immunes démyélinisantes

Lorsque les cellules T autoréactives ciblent le cerveau, la moelle épinière ou l'œil on parle de maladies auto-immunes démyélinisantes du SNC. La myéline est une substance constituée à 80% de lipides qui sert à isoler et protéger les fibres nerveuses transportant l'influx nerveux par les axones. Dans le cas des maladies démyélinisantes auto-immunes, la réaction inflammatoire engendrée altère la cellule myélinisante, l'oligodendrocyte, et la gaine de myéline autour de fibres neuronales engendrant ainsi une démyélinisation des axones. Cette perte de myéline ralentit, voire bloque, la conduction nerveuse. L'accumulation des régions démyélinisées, appelées plaques, et la mise en place de mécanismes neurodégénératifs au cours de la progression des maladies démyélinisantes peut amener à des lésions axonales irréversibles (Frohman et al., 2006). La nature des déficiences engendrées par ces pathologies dépend de l'emplacement et de la taille de la plaque démyélinisante. Étant donné que le processus démyélinisant n'est pas localisé dans une région particulière du SNC, les symptômes peuvent varier considérablement entre les patients. Il peut s'agir de troubles moteurs comme une faiblesse musculaire, des troubles d'équilibre et une paralysie, de problèmes

visuels ou de langage, d'affections sensorielles, urinaires et sexuelles. Ces signes sont souvent associés à une fatigue extrême, des troubles de la mémoire, de la concentration ou encore des épisodes dépressifs (Holmoy and Hestvik, 2008).

Chez l'homme, on distingue trois principales maladies auto-immunes démyélinisantes: la sclérose en plaques (SEP), la neuromyéélite optique (NMO) et l'encéphalomyélite aiguë disséminée (EMAD). Je vais détailler ci-dessous l'aspect histopathologique de chacune de ces pathologies dans le but de présenter les points communs avec le modèle animal utilisé dans mes travaux de doctorat, l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE).

1.6.1.1 Immunopathogenèse de la sclérose en plaques (SEP)

La SEP est une maladie auto-immune neurodégénérative qui se présente à tout âge et provoque des perturbations motrices, visuelles et cognitives (Holmoy and Hestvik, 2008). Elle affecte approximativement 2.5 millions de personnes dans le monde entier. La SEP est principalement diagnostiquée chez des jeunes adultes (entre 15 et 40 ans), toutefois il existe une forme pédiatrique de la SEP et elle affecte également les personnes âgées. Sa prévalence est trois fois plus élevée chez les femmes que chez les hommes (Goldenberg, 2012). La maladie se présente principalement sous forme de déficiences sensorielles et motrices unilatérales.

Bien que l'étiologie de la maladie soit mal connue, il est maintenant accepté que la SEP est initiée par une attaque auto-immune aberrante dirigée contre des protéines de la gaine de myéline. Les marques histopathologiques de la SEP sont les infiltrats de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ autoréactifs et de cellules myéloïdes. Ces cellules immunitaires forment majoritairement des foyers inflammatoires périvasculaires dans le SNC, principalement dans la matière blanche, et entraînent la démyélinisation et la perte axonale (Lisak, 2007). Certains facteurs génétiques liés à la biologie des cellules T favorisent le développement de la SEP. Les loci génétiques qui corréleront le plus spécifiquement avec la susceptibilité de la maladie codent pour le CMH-II, qui contrôle l'activation des cellules T CD4⁺, ainsi que les récepteurs essentiels pour la prolifération et la survie des cellules T. Selon certaines hypothèses, le développement de la SEP peut dépendre aussi des facteurs environnementaux, comme l'insuffisance en vitamine D ou encore la présence d'un agent infectieux présentement inconnu (Holmoy and Hestvik, 2008). Par exemple, les risques de développer la SEP doublent chez les individus ayant souffert de mononucléose infectieuse (Marrie et al., 2000; Hernan et al., 2001; Goldacre et al., 2004; Ascherio and Munger, 2007; Zaadstra et al., 2008; Ramagopalan et al., 2009; Handel et al., 2010). De plus, le risque de rechutes augmente et ces dernières sont plus sévères à la suite d'infections des voies respiratoires (Sibley et al., 1985; Marrie et al., 2000; Buljevac et al., 2002; Tremlett et al., 2008).

La progression de la SEP est de nature extrêmement hétérogène d'un patient à l'autre, toutefois trois principales formes cliniques de la maladie sont classifiées: SEP récurrente rémittente (SEPRR), SEP secondaire progressive (SESP) et SEP primaire progressive (SEPPP) (Goldenberg, 2012) (Figure 1-5).

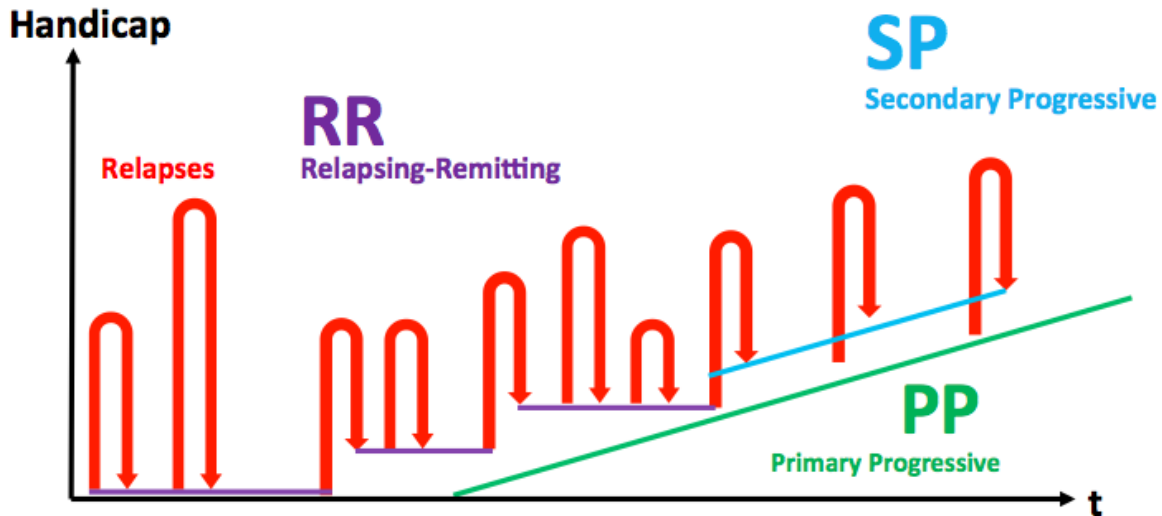


Figure 1-5. Formes cliniques principales de la SEP.

Dans 85% des cas, la maladie se manifeste sous forme récurrente rémittente (RR) caractérisée par des poussées de symptômes handicapants survenant de façon aiguë (en quelques heures ou en quelques jours) et disparaissant totalement ou partiellement en quelques semaines. Quelques années après le début des symptômes, les rémissions sont moins complètes dû à l'accumulation des lésions ce qui conduit à l'installation graduelle d'un handicap permanent et représente la forme secondaire progressive (SP) de la SEP. Dans 15% des cas de la SEP, les symptômes apparaissent et s'aggravent graduellement sans être interceptés par des phases de rémissions, ce qui représente la forme primaire progressive (PP) de la pathologie. Tiré de <https://blog.servier.fr/en/will-soon-treatment-forms-multiple-sclerosis/>

Basé sur les évidences immunologiques et histopathologiques, nous pouvons souligner le rôle de la neuroinflammation dans toutes les formes cliniques de la SEP. Cependant, les réseaux de cytokines/chimiokines et les leucocytes impliqués dans la réaction auto-immune ainsi que la nature de la réponse immunitaire semblent varier dans chacune des formes de la maladie. Les mécanismes de la transformation de réponse immunitaire sont mal compris. Aux phases RR de la maladie, la réponse immunitaire serait modelée en périphérie. L'infiltration des lymphocytes CD4+ et CD8+ et des cellules

myéloïdes dans le SNC activerait la cascade inflammatoire aboutissant à la démyélinisation (Segal, 2014). Ainsi, les agents immunomodulateurs qui inhibent le recrutement des lymphocytes au niveau du SNC, bloquent la signalisation de facteurs de croissance des cellules T ou déplètent les lymphocytes de la périphérie diminuent la fréquence des rechutes et l'accumulation des lésions (Lassmann, 2011). Dans les formes SP et PP de la pathologie, l'attaque immune aurait lieu directement dans le SNC, supportée par une activation massive de microglie, l'astrogliose et le développement des follicules méningés lymphoïdes (Serafini et al., 2004; Kutzelnigg et al., 2005). Ces formes de maladie seraient dues à la morte neuronale, la dégénérescence neuro-axonale et la microgliose et seraient moins dépendante des attaques auto-immunes prédominantes dans la SEPRR (Miller and Leary, 2007; Trapp and Nave, 2008). Néanmoins, les mécanismes immunopathogéniques restent moins connus. Les effets immunomodulateurs de traitements de la SEPRR ne sont pas efficaces pour le traitement des formes SP et PP.

1.6.1.2 Description de l'encéphalomyélite aiguë disséminée (EMAD)

L'EMAD est une maladie démyélinisante inflammatoire généralement monophasique qui affecte plus souvent les enfants (Young et al., 2008). Toutefois, dans certains cas cette pathologie serait récurrente ou multiphasique si l'épisode de démyélinisation se reproduisait dans la région initiale ou une partie différente du SNC, respectivement. Il existe aussi une forme fulminante de l'EMAD chez les adultes (Young et al., 2008).

Entre 10 à 40% des enfants atteints d'EMAD présentent des épisodes subséquents de démyélinisation et sont diagnostiqués d'une SEP (Dale et al., 2012). Aucun biomarqueur sérologique ou dérivé des cellules mononucléaires du sang ne permet de discriminer l'EMAD de la SEP et aucun essai immunologique ne prédit l'évolution clinique ou la sensibilité du patient au traitement (Wingerchuk and Lucchinetti, 2007; Young et al., 2008). Toutefois, il existe certaines caractéristiques principales de l'EMAD comme l'encéphalopathie et les lésions plus diffuses et moins bien définies comparées à la SEP (Young et al., 2008). Les techniques de l'imagerie en résonance magnétique permettent de faire la distinction de l'EMAD et de la SEP mettant en évidence les particularités de l'EMAD, telles qu'une maladie symétrique bilatérale, l'affection de la matière grise profond et du cortex, ainsi que l'absence relative d'anomalies dans les régions périventriculaires du cerveau (Young et al., 2008). La pathologie de l'EMAD se ressemble énormément à l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) qui est un modèle animal de démyélinisation inflammatoire aiguë monophasique.

1.6.1.3 Description de la neuromyélie optique (NMO)

La NMO était autrefois appelée SEP optico-spinale vu les similarités de signes cliniques et histopathologiques (Holmoy and Hestvik, 2008). Plus récemment, NMO est devenue une entité clinique bien définie, car, dans la majorité des cas, son diagnostic est confirmé avec un biomarqueur spécifique détecté dans le sérum, le NMO-IgG qui cible l'aquaporine-4 (Lennon et al., 2005; Jiao et al., 2013). Comme le nom l'indique, la NMO se manifeste par une myélite et une névrite optique simultanée et se caractérise par une infiltration massive de neutrophiles et d'autres leucocytes au niveau la moelle épinière et du nerf optique (Wingerchuk et al., 2007). Il existe une prédominance féminine pour la NMO. De plus, le sexe peut aussi déterminer la progression récurrente versus monophasique de la maladie, le cours de maladie étant plus souvent récurrente chez les femmes (Pereira et al., 2015).

1.6.2 Modèles d'EAE

Dans le Chapitre 2 et la première partie du Chapitre 3 de cette thèse, j'ai exploré l'implication des cellules de l'immunité innée, particulièrement les neutrophiles et la microglie, dans le développement des maladies auto-immunes démyélinisantes en utilisant différents modèles d'EAE progressive chronique.

L'encéphalomyélite auto-immune expérimentale est le modèle animal des maladies auto-immunes démyélinisantes le plus couramment utilisé qui récapitule des aspects pathologiques de la neuroinflammation: la dégénérescence axonale et la démyélinisation. C'est grâce à l'EAE que le développement et l'amélioration des thérapies efficaces contre la SEP comme le glatiramer acetate, mitoxantrone et natalizumab ont été possibles (Steinman and Zamvil, 2006; Croxford et al., 2011).

À l'origine, l'EAE a été utilisé pour comprendre les épisodes de paralysie observée chez certains patients vaccinés contre la rougeole, la variole et la rage. Les premiers modèles d'EAE produisaient des changements inflammatoires dans le SNC entraînant une paralysie aiguë et récapitulant donc les caractéristiques de l'EMAD (Steinman and Zamvil, 2006). Sur la base de ce premier modèle, plusieurs variantes ont été créées pour imiter les différentes formes d'affections auto-immunes du SNC, incluant des modèles plus spécifiques pour la NMO, la SEPRR et la SEP progressive. Pour comprendre l'implication de l'immunité innée, dans cet ouvrage nous avons utilisé trois modèles d'EAE progressive que je vous décris ci-dessous.

1.6.2.1 EAE par immunisation active

L'EAE est induite dans plusieurs espèces de mammifères à l'aide d'une immunisation active contre les épitopes de myéline spécifique au CMH-II. Ce type d'immunisation active produit un modèle chronique qui

récapitule les symptômes suivants de la SEP progressive: inflammation du SNC, perte de poids, paralysie et démyélinisation. Les souris C57BL/6 sont immunisées avec le peptide de MOG₃₅₋₅₅ dans l'adjuvant complet de Freund (CFA). Cette immunisation sous-cutanée amorce une expansion de cellules T CD4⁺ dans les organes lymphoïdes périphériques et une polarisation de cellules T naïves autoréactives vers Th1 et Th17 qui produisent les cytokines IFN γ et IL-17, respectivement (Stromnes and Goverman, 2006a). Ces cellules T effectrices se rendent ensuite au cerveau et à la moelle épinière et sont réactivées par les APC locales pour produire une pathogenèse complète (Kawakami et al., 2004; Greter et al., 2005; Bartholomaeus et al., 2009; Kivisakk et al., 2009). Les cellules T s'infiltrent dans le parenchyme du SNC et restimulent, à leur tour, les cellules myéloïdes incluant la microglie et les macrophages dérivés des monocytes et initient les processus de la démyélinisation axonale et de la perte neuronale (Shemer and Jung, 2015) (Figure 1-6).

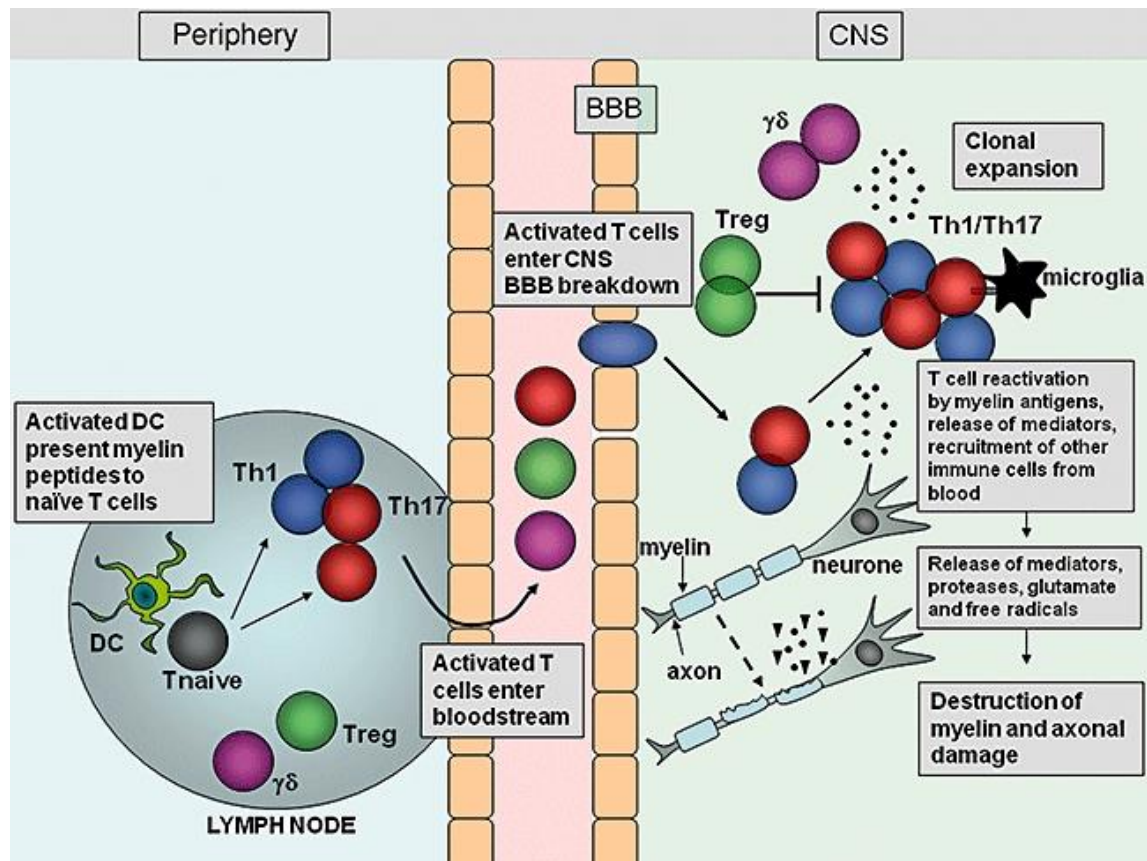


Figure 1-6. Migration et fonction effectrice des cellules T réactives à la myéline au cours de l'EAE.

Les cellules dendritiques présentent des peptides de myéline aux cellules T naïves dans les ganglions lymphatiques. Ces cellules T activées entrent dans la circulation sanguine, migrent vers le SNC, se réactivent par des CPA, pénètrent la barrière hémato-encéphalique, recrutent d'autres leucocytes à partir du sang et médient l'attaque contre la myéline et le dommage axonal. Tiré de (Fletcher et al., 2010).

1.6.2.2 EAE par transfert adoptif

L'EAE peut aussi être transférée de souris vaccinées contre la myéline à des naïves isogéniques utilisant des cellules T autoréactives (Stromnes and Goverman, 2006b). Les études d'EAE utilisant cette méthode d'induction d'EAE, appelée transfert adoptif, ont démontré que l'immunogénicité des cellules Th est dépendant exclusivement de la production de la cytokine GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*). Les cellules Th déficientes en GM-CSF rentrent au SNC et produisent d'autres cytokines, cependant l'EAE ne se développe pas (Kroenke et al., 2010; Codarri et al., 2011). Le GM-CSF est nécessaire pour le recrutement des cellules myéloïdes CD11b⁺ qui sont essentielles pour le maintien de l'inflammation locale du SNC, la démyélinisation et la survie des lymphocytes (Sonderregger et al., 2008).

1.6.2.3 Modèle 2D2

Les souris 2D2 expriment un TCR spécifique au MOG₃₅₋₅₅ et développent l'EAE spontanément avec une faible incidence (4 à 15%). Ces souris développent plus souvent une névrite optique (plus de 30%) (Bettelli et al., 2003). Ce modèle spontané de l'EAE est aussi appelée EAE optico-spinale. De façon intéressante, l'injection de PTX (*pertussis toxin*) chez les souris 2D2 augmente drastiquement l'incidence de l'EAE, atteignant jusqu'à 60% des cas (Dumas et al., 2014). PTX est une protéine dérivée de *Bordetella pertussis* et son effet adjuvant au cours du développement de l'EAE supporte le rôle d'agents bactériens dans la réaction inflammatoire décrit dans la SEP. En augmentant les niveaux d'expression de l'IL-6 dans le plasma, PTX peut induire différents médiateurs chimiques, comme l'IL-1 β et le CXCL-1, favorisant le recrutement des leucocytes périphériques qui patrouillent dans les leptoméninges (Roy et al., 2012; Dumas et al., 2014). Notons que cette population patrouillante suite à l'injection de PTX est constituée majoritairement de neutrophiles (Richard et al., 2011). C'est justement ces cellules qui ont été au centre de mes travaux présentés dans le Chapitre 2 de cette thèse.

1.6.3 Cellules myéloïdes dans l'EAE

L'EAE et les maladies auto-immunes démyélinisantes chez l'homme sont définies comme des pathologies médiées par les cellules T, toutefois le nombre de cellules myéloïdes est imposant dans les loci inflammatoires de ces maladies. Les cellules myéloïdes les plus étudiées dans l'EAE sont les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques. Les monocytes circulant dans le sang sont rapidement recrutés dans le parenchyme du cerveau au cours de l'EAE. Les monocytes inflammatoires exprimant des niveaux élevés de CCR2 et de Ly6C sont critiques pour le développement et la progression de l'EAE (Huitinga et al., 1990; Tran et al., 1998; Serafini et al., 2000; King et al., 2009; Mildner et al., 2009). Dans la SEP et l'EAE, l'infiltration des cellules myéloïdes précède la perméabilisation de la BHE et corrèle avec les signes cliniques de ces pathologies

(Brown and Sawchenko, 2007; Walker-Caulfield et al., 2015). De plus, l'inhibition de l'infiltration des monocytes dans le SNC chez les souris CCL2/CCR2 déficientes empêche le développement de l'EAE (Fife et al., 2000; Izikson et al., 2000; Huang et al., 2001; Gaupp et al., 2003).

Les cellules myéloïdes, plus particulièrement la population de cellules dendritiques, sont essentielles à la présentation d'antigènes et à la réactivation des cellules T lors de l'EAE. Ainsi, une fois entrées dans les leptoméninges, les cellules T CD4⁺ produisent des cytokines pro-inflammatoires et permettent l'infiltration des cellules myéloïdes dans le SNC (Greter et al., 2005; Sonderegger et al., 2008; Kivisakk et al., 2009; Kroenke et al., 2010; Codarri et al., 2011; Prodinger et al., 2011). Après avoir infiltré le SNC, ces cellules myéloïdes réactivent les cellules T et augmentent leur encéphalogénéicité (Kawakami et al., 2004; Greter et al., 2005; Bartholomaeus et al., 2009; Kivisakk et al., 2009). Sans cette réactivation, l'initiation et la progression de la réponse inflammatoire pathogénique durant l'EAE serait impossible (Kawakami et al., 2004).

À la suite de leur réactivation, les cellules T doivent traverser la BHE pour se rendre dans le parenchyme du SNC afin d'attaquer leurs cibles. Les recherches suggèrent que les cellules myéloïdes seraient également importantes à cette phase de la pathologie. En effet, la production de TNF par une autre cellule myéloïde, la mastocyte méningéale, régule la fonction de la BHE et l'infiltration des cellules T et des cellules myéloïdes dans le SNC et permet l'initiation de la phase symptomatique de l'EAE (Sayed et al., 2010).

Les cellules myéloïdes sont aussi les cellules effectrices majeures durant l'EAE. Ainsi, les macrophages médient directement le dommage tissulaire et la démyélinisation en sécrétant des molécules toxiques, des réactifs de l'oxygène (RO) et des facteurs pro-inflammatoires (Mildner et al., 2009). Selon leur état de polarisation, les macrophages peuvent être également impliqués dans les phases de la résolution de la neuroinflammation (Miron et al., 2013; Yamasaki et al., 2014).

Enfin, il y a de plus en plus d'évidences qu'une autre population de cellules myéloïdes, les neutrophiles, serait aussi essentielle dans la pathogenèse de l'EAE.

1.6.3.1 Neutrophiles dans l'EAE

Les neutrophiles constituent la population des cellules infiltrantes la plus abondante 24 à 48 heures avant l'apparition des symptômes neurologiques et durant le pic de la maladie (Reddy et al., 2005; Carlson et al., 2008; Kroenke et al., 2008; Soulika et al., 2009; Kang et al., 2010; Wu et al., 2010; Christy et al., 2013; Steinbach et al., 2013; Rumble et al., 2015). Il a été démontré que les cellules Th17 encéphalitogéniques activent les mastocytes qui, à leur tour recrutent des neutrophiles dans les phases précoces de l'EAE en sécrétant différentes cytokines comme le TNF, CXCL1 et CXCL2 (Carlson et al., 2008; Sayed et al., 2010; De

Filippo et al., 2013). La neutralisation des protéines associées aux neutrophiles comme Ly6G, CXCR2 et CXCL1 réduit la sévérité de l'EAE et retarde son initiation (McColl et al., 1998; Carlson et al., 2008; Liu et al., 2010; Steinbach et al., 2013; Aube et al., 2014; Rumble et al., 2015). De plus, une étude récente a révélé que les souris transgéniques déficientes en récepteur du G-CSF, le facteur essentiel pour la mobilisation des neutrophiles de la moelle osseuse, sont résistantes à l'EAE active (Rumble et al., 2015). Cette résistance est expliquée par l'absence de neutrophiles dans la moelle épinière des souris qui n'expriment pas le récepteur du G-CSF. Dans ce modèle, la présence de toutes les autres populations leucocytaires dans la moelle épinière est également compromise, ce qui pourrait être dû au rôle de neutrophiles dans la mobilisation de cellules souches hématopoïétiques (CSH) à partir de la moelle osseuse (Singh et al., 2012). En effet, les cellules souches mésenchymales (CSM) et les ostéoblastes (OB) présents dans la moelle osseuse expriment des molécules d'adhésion et différents facteurs permettant de retenir les CSH dans cette niche (Wilson and Trumpp, 2006). L'expansion des neutrophiles suite à la stimulation du G-CSF induit l'apoptose des CSM et des OB et réduit la production des facteurs de rétention des CSH dans la moelle osseuse, tels que VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*), SCF (*stem cell factor*) et SCDF1 (*stromal cell-derived factor-1*) (Singh et al., 2012).

Il est intéressant de noter que si la déplétion de neutrophiles de la circulation sanguine se fait avant la manifestation des signes de l'EAE, cela retarde considérablement son initiation et réduit sa sévérité (Carlson et al., 2008; Steinbach et al., 2013; Aube et al., 2014). Par contre, si l'on déplete les neutrophiles après le début de signes de paralysie, la progression de l'EAE ne varie pas (Steinbach et al., 2013), ce qui démontre l'implication des neutrophiles dans les phases d'initiation de la maladie. Toutes ces évidences soulignent un rôle crucial des neutrophiles dans l'EAE. Toutefois, les mécanismes précis de l'action des neutrophiles dans cette pathologie restent peu élucidés.

1.6.3.1.1 Fonctions des neutrophiles

Les neutrophiles peuvent effectuer des fonctions pléiotropes selon l'environnement inflammatoire. En plus de la phagocytose, les neutrophiles pourraient avoir d'autres rôles essentiels (Mantovani et al., 2011). Ils contiennent un large répertoire de molécules pro-inflammatoires et effectrices et sont des acteurs essentiels dans diverses pathologies. Deux hypothèses principales existent concernant l'implication des neutrophiles dans la pathogenèse de l'EAE : ils contribueraient à la rupture de la BHE et/ou aideraient à la maturation de cellules dendritiques. Je développe ces deux actions des neutrophiles dans les prochaines lignes.

1.6.3.1.1.1 Rupture de la BHE par les neutrophiles

Il est accepté que la BHE est moins efficace dans de nombreuses pathologies du SNC, puisque la neuroinflammation s'accompagne souvent de la perméabilisation de cette barrière et de l'augmentation du nombre de leucocytes infiltrant le parenchyme du SNC. Cependant, si le bris de la BHE est la cause ou le résultat de l'inflammation reste toujours un sujet de discussion. La capacité des neutrophiles actifs à produire des RO et à sécréter des enzymes lytiques suggère qu'ils peuvent directement perméabiliser la BHE (Ullen et al., 2012; Ullen et al., 2013) et ainsi faciliter l'infiltration des cellules immunitaires périphériques dans le parenchyme du SNC (Ransohoff and Brown, 2012).

Actuellement, quelques études suggèrent que les neutrophiles augmenteraient la perméabilité de la BHE et favoriseraient ainsi l'infiltration des cellules périphériques dans le SNC (Carlson et al., 2008; Aube et al., 2014). Durant l'EAE, les neutrophiles activés patrouillent la surface luminale des leptoméniges (Richard et al., 2011) et ont la capacité de dégrader les contacts entre les cellules endothéliales en sécrétant des enzymes ou des RO (Scholz et al., 2007). En accord avec ces études, la déficience en IL-1R1 des cellules non hématopoïétiques empêche l'adhésion et le roulement des neutrophiles sur l'endothélium, décale le début de l'EAE et protège l'intégrité de la BHE (Aube et al., 2014). De plus, l'inhibition de l'élastase améliore l'EAE induit par transfert adoptif des cellules Th17 et dans un modèle de souris NMO (Herges et al., 2012; Saadoun et al., 2012). Cependant, l'absence de l'enzyme MPO et l'inhibition de l'élastase dans l'EAE active n'ont aucun impact sur son développement (Steinbach et al., 2013). Une étude récente rapporte que dans le modèle d'EAE spontanée (appelée TCR1640) ainsi que chez des patients atteints de la SEP, le bris de la BHE précède l'infiltration des leucocytes dans le SNC et la démyélinisation (Alvarez et al., 2015). Dans la même étude, les auteurs démontrent qu'une réaction pro-inflammatoire périphérique est détectée avant le bris de la BHE et pourrait en être la cause. Plus d'études seront nécessaires pour démontrer, s'il y a lieu, l'action directe des neutrophiles sur la déstabilisation de la BHE au cours de l'EAE.

1.6.3.1.1.2 Régulation des cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont essentielles dans le développement de l'EAE car elles réactivent les cellules Th1 et Th17 en leur présentant des antigènes. L'accumulation des évidences suggère que les neutrophiles ont la capacité de moduler le recrutement et la fonction de cellules dendritiques. En effet, les neutrophiles peuvent directement contacter la cellule dendritique via les interactions Mac-1/DC-SIGN (van Gisbergen et al., 2005). L'activation et la migration des cellules dendritiques vers les ganglions lymphatiques peuvent être inhibées par l'enzyme MPO des neutrophiles (Odobasic et al., 2013). D'un autre côté, les neutrophiles peuvent sécréter différents facteurs moléculaires pour favoriser le recrutement et l'action des cellules dendritiques immatures en induisant l'expression des molécules co-stimulatrices CD86 et CD40 sur ces dernières (Bennouna et al.,

2003). Une étude démontre qu'*in vitro* les neutrophiles peuvent présenter eux-mêmes des antigènes aux cellules T et les différencier en Th1 ou Th17 (Abi Abdallah et al., 2011).

Dans le SNC, les neutrophiles produisent des facteurs pro-inflammatoires qui favorisent la maturation de cellules dendritiques induisant l'expression de CMH-II, CD80 et CD86 et augmentent ainsi leur capacité de restimuler les cellules T (Steinbach et al., 2013). La déplétion des neutrophiles par l'anticorps anti-Ly6G diminue la maturation de la microglie et des macrophages et compromet l'infiltration des leucocytes périphériques dans le SNC (Steinbach et al., 2013). Toutefois, les facteurs sécrétés des neutrophiles responsables de la maturation de cellules dendritiques au cours de l'EAE restent inconnus à ce jour. Ainsi, dans le Chapitre 2, j'explore le rôle de l'IL-36 γ , la première cytokine identifiée spécifique aux neutrophiles dans la pathogenèse de l'EAE.

1.7 Maladie d'Alzheimer (MA)

1.7.1 Descriptif de la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est la cause la plus fréquente de démence. Elle touche plus de 35 millions d'individus à travers le monde et sa prévalence devrait tripler en 2050 (*World Health Organization-WHO*-<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/en/>). Souvent, les symptômes de la MA débutent après l'âge de 65 ans sous forme de perte de mémoire à court terme et progressent en affectant toutes les fonctions cognitives et exécutives. Les caractéristiques histopathologiques de la MA sont: la présence de dépôts extracellulaires de amyloïde- β (les plaques d'A β) et les agrégats intracellulaires de la protéine tau hyperphosphorylée associée aux microtubules (les enchevêtrements neurofibrillaires) (Cameron and Landreth, 2010). Une autre particularité du tissu cérébral des patients atteints de la MA est la présence d'une réaction inflammatoire. Ainsi, les cellules gliales du SNC (microglies et astrocytes) sont activées et regroupées autour des plaques d'A β (Cameron and Landreth, 2010).

Une des théories centrales d'initiation de la MA est la cascade amyloïde selon laquelle la dérégulation de la production de certains peptides d'A β et/ou leur clairance amène à la neurodégénérescence et à la démence (Hardy and Selkoe, 2002). Les peptides d'A β sont générés à la suite d'une série de clivages endoprotéolytiques d'APP (*amyloid precursor protein*) qui est une protéine transmembranaire exprimée dans le cerveau. Les clivages successifs de l'APP par les enzymes β -sécrétase et le complexe γ -sécrétase, produisent des isoformes de peptide d'A β de différentes longueurs (Haass, 2004; Haass and Selkoe, 2007). Selon les études *in vitro*, les plaques d'amyloïde- β se forment par la polymérisation des monomères d'A β pour former des protofibrilles, ensuite des fibrilles matures insolubles (Harper and Lansbury, 1997; Finder and

Glockshuber, 2007). La forme d'A β composée de 40 acides aminés, l'A β 40, est le produit majeur généré de l'APP, cependant l'A β 42 est considérée comme la forme la plus neurotoxique puisqu'elle a une plus grande tendance à s'agréger pour former des oligomères et des fibrilles d'A β (Barrow and Zagorski, 1991; McGowan et al., 2005; Yan and Wang, 2006) et représente la forme la plus abondante dans les plaques d'A β (Braak and Braak, 1991; LaFerla et al., 2007; Ballard et al., 2011). Dans les conditions normales, les plaques d'A β sont dégradées et/ou éliminées du cerveau par différents mécanismes dont la dégradation par des peptidases, le transport actif médié par des récepteurs LRP (*low-density lipoprotein receptor-related protein*) et RAGE (*receptor for advanced glycation end products*) (Tanzi et al., 2004). Les mutations dans le gène d'APP et ceux codant pour l'enzyme-clé de l'activité de γ -sécrétase, la préséniline (PS1) conduisent à une accumulation de peptides A β 42 (Blennow et al., 2006). La rétention de ces peptides dans le cerveau sous différents états conformationnels (monomères, oligomères, plaques fibrillaires insolubles) enclenche des changements pathophysiologiques chez les patients et mène à la perte neuronale (Hardy and Selkoe, 2002).

La MA est le plus souvent sporadique (99% des cas), bien qu'elle peut également être d'origine génétique due à plusieurs mutations dominantes autosomales. Ainsi, les gènes mutants du substrat (APP) et de la préséniline sont responsables des cas relativement précoces de la MA familiale (Ballard et al., 2011). Ces mutations mènent à une augmentation de la capacité de clivage de la γ -sécrétase et donc à une accumulation anormalement élevée d'A β 42. La découverte de ces mutations a permis la création de modèles de souris pour étudier les mécanismes du développement de la MA.

1.7.2 Modèle de souris APP/PS1

Dans l'étude du Chapitre 3 de ma thèse, j'ai utilisé un modèle de souris transgénique qui surexprime les gènes mutés APP et PS1 humains sous le contrôle du promoteur Th1 spécifique aux neurones (Radde et al., 2006). Chez ces souris, l'accumulation de l'A β commence vers l'âge de 6 à 8 semaines de vie dans le cortex et vers 3-4 mois dans l'hippocampe. Très tôt après l'accumulation de dépôts d'A β , une activation de microglie (processus appelé microgliose) et un rassemblement de microglie hypertrophique Iba1⁺ est observé autour des plaques A β (Simard et al., 2006; Radde et al., 2006). Il est intéressant de noter que toutes ces plaques sont entourées de boutons synaptiques dystrophiques. Une perte d'épines dendritiques est aussi observée dans le cerveau dès 4 semaines après le dépôt initial des plaques (Radde et al., 2006; Bittner et al., 2012). Les épines dendritiques forment les synapses entre les neurones et participent à la sauvegarde de la nouvelle information dans le cerveau à l'aide du contenu des boutons synaptiques. En accord avec les anomalies décrites de ces éléments de base impliqués dans la plasticité synaptique, les souris APP/PS1 montrent des déficiences cognitives dès l'âge de 6 mois (Radde et al., 2006; Serneels et al., 2009).

1.7.3 Rôle de la microglie dans la réponse immune dans la maladie d'Alzheimer

Des études initiales de la pathologie cellulaire de la MA ont observé une activation et un regroupement de la microglie autour des dépôts d'A β (Simard et al., 2006; Perlmutter et al., 1990; Griffin et al., 1998; D'Andrea et al., 2004) et ont proposé un rôle important des cellules microgliales dans la pathologie d'Alzheimer. Ainsi, l'étude élégante de (Meyer-Luehmann et al., 2008) a démontré que la microglie est activée et recrutée vers les plaques d'amyloïde dans les 24h suivant la formation de ces dernières.

1.7.3.1 Activation microgliale par l'amyloïde- β

Durant la maladie d'Alzheimer, les oligomères et les fibrilles insolubles d'A β lient directement la microglie via plusieurs récepteurs de surface cellulaire comme SCARA1, CD36, CD14, l'intégrine α 6 β 1 et les TLRs (Paresce et al., 1996; Bamberger et al., 2003; Liu et al., 2005; Reed-Geaghan et al., 2009; Stewart et al., 2010). L'activation de ces récepteurs peut médier différentes actions de la microglie. Ainsi, la liaison de l'A β au SRA ou CD14 se traduit par l'internalisation de ces peptides et la stimulation de la phagocytose par la microglie (Paresce et al., 1996; Liu et al., 2005). Il a été également rapporté que les microglies utilisent un mécanisme de macropinocytose pour l'internalisation et la dégradation des peptides solubles d'A β 42 (Mandrekar et al., 2009). Par ailleurs, l'activation de CD36, TLR2, TLR4 et TLR6 par l'A β conduit à la production des cytokines et des chimiokines pro-inflammatoires et des molécules toxiques comme les RO (Bamberger et al., 2003; El Khoury et al., 2003; Reed-Geaghan et al., 2009; Stewart et al., 2010). De façon intrigante, l'amyloïde- β peut activer l'inflammasome NLRP3, entraîner le recrutement microglial et la synthèse des facteurs pro-inflammatoires et neurotoxiques, essentiellement via la voie de signalisation de l'IL-1 β (Halle et al., 2008; Masters and O'Neill, 2011). À l'opposé, la surexpression de TGF- β dans le cerveau des souris modélisant l'Alzheimer, qui est également associée avec une activation robuste de la microglie, corrèle positivement avec la réduction significative du nombre des plaques A β parenchymales (Wyss-Coray et al., 2001). Ces évidences démontrent l'implication importante des cellules microgliales dans la pathogenèse de la MA.

1.7.3.2 Implication de la microglie dans la maladie d'Alzheimer

Le rôle de la microglie dans la MA reste encore débattu au sein de la communauté scientifique. L'action de la microglie est hautement dépendante du contexte. Certains groupes affirment que l'activation microgliale a des effets neuroprotecteurs dans des modèles de la maladie d'Alzheimer par son action de phagocytose efficace des plaques A β et des débris de myéline (Wyss-Coray et al., 2001; Lampron et al., 2015). En accord avec cette hypothèse, les cytokines anti-inflammatoires IL-4 et IL-10 inhibent la microglie, résultant en une

accumulation des plaques A β et exacerbant les symptômes de la pathologie (Chakrabarty et al., 2012; Chakrabarty et al., 2015; Guillot-Sestier et al., 2015). De plus, l'activation de la microglie par la surexpression de la cytokine pro-inflammatoire TNF- α dans l'hippocampe diminue les dépôts A β (Chakrabarty et al., 2011). Au contraire, d'autres équipes supportent l'hypothèse selon laquelle l'activation de la microglie est délétère dû à la relâche de facteurs toxiques comme les RO et des molécules pro-inflammatoires IL-1 β , TNF- α , IL-6 (Meda et al., 1995; McDonald et al., 1997; Meda et al., 1999; Cho et al., 2011; Orre et al., 2014). Dernièrement, il a été proposé que les changements progressifs d'activité microgliale durant la MA peuvent être responsables de cet effet dichotomique (Prokop et al., 2013) (Figure 1-7). Ainsi, durant les phases précoces de la MA, la microglie serait efficace pour migrer, infiltrer les plaques d'A β et phagocyter l'A β fibrillaire. Toutefois, avec la progression de la maladie, la microglie deviendrait dysfonctionnelle présentant une activation, migration et phagocytose diminuée.

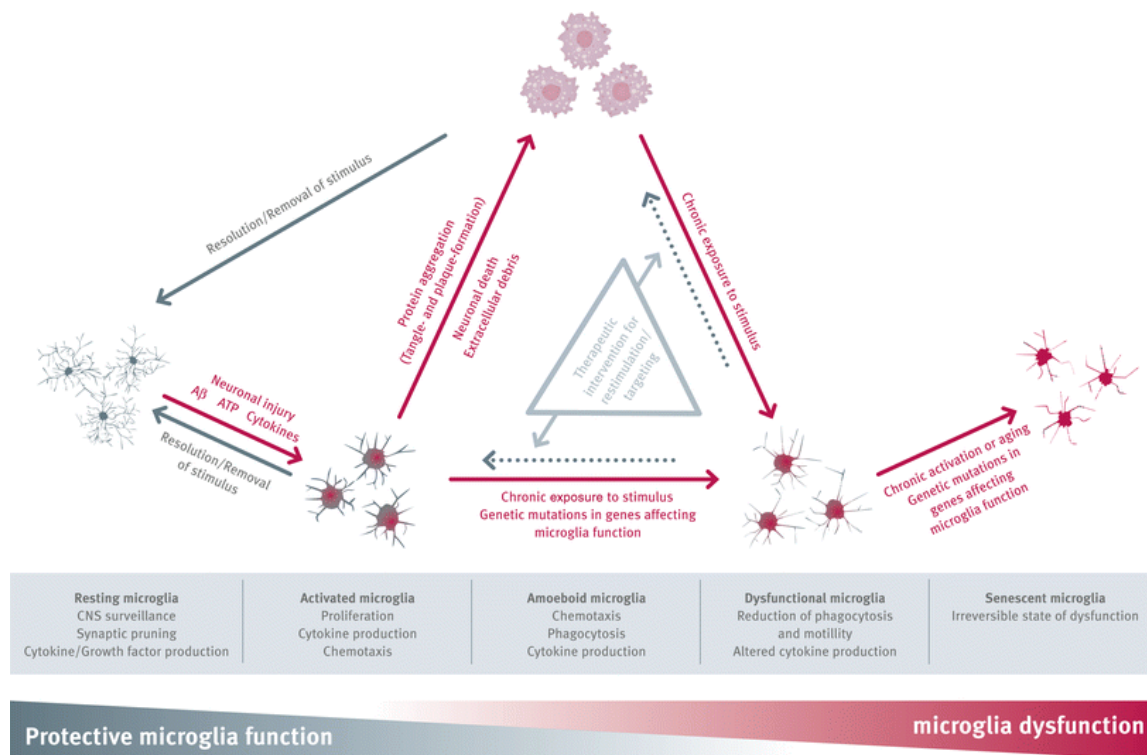


Figure 1-7. Schéma des différentes étapes d'actions microgliales au cours de la MA.

La microglie surveillant l'intégrité du SNC peut être activée par divers stimuli et effectuer diverses fonctions comme la prolifération, la chimiotaxie ou la production de cytokines pour rétablir l'homéostasie de l'organisme. Toutefois, à la suite d'une activation chronique, la microglie peut adopter un état amiboïde, dysfonctionnel ou sénéscent. Tirée de (Prokop et al., 2013).

1.7.3.2.1 Changements de microglie durant la pathologie d'Alzheimer

Le développement de la MA et le dépôt de l'A β sont associés avec l'accumulation des cellules microgliales dysfonctionnelles et sénescents dans les cerveaux des patients (Streit et al., 2004). Elles ont un corps cellulaire atrophique et des ramifications fragmentées, démontrant une morphologie distincte d'une microglie activée ou ramifiée (Streit et al., 2004; Lopes et al., 2008; Baron et al., 2014). Ainsi, ces changements liés à la fois à l'âge et à la progression de la MA pourraient impliquer une plus faible capacité de la microglie à surveiller son environnement. En accord avec cela, chez les souris transgéniques APP/PS1 vieillissantes, la microglie subit une diminution progressive de l'expression des récepteurs reconnaissant l'A β comme, par exemple, le SRA et le CD36, qui s'accompagne d'une augmentation des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β et le TNF- α (Hickman et al., 2008). Ces mêmes microglies âgées démontrent également une baisse d'efficacité de l'internalisation d'A β (Hickman et al., 2008; Njie et al., 2012; Krabbe et al., 2013). En effet, la microglie provenant des cerveaux de patients atteints de la MA a montré des niveaux moins forts en beclin-1 qui est associé avec une phagocytose affaiblie d'A β (Lucin et al., 2013). Toutes ces évidences indiquent qu'en plus d'être activée au cours de la MA, la microglie semble voir sa fonction altérer.

1.7.3.2.2 Phagocytose

Les cellules microgliales sont des phagocytes efficaces des boutons synaptiques, des épines dendritiques et des cellules apoptotiques dans des conditions physiologiques durant le développement ainsi que dans le cerveau adulte (Dalmau et al., 2003; Sierra et al., 2010; Schafer et al., 2012). Toutefois, leur rôle dans la phagocytose des dépôts d'A β est plutôt modeste. Malgré les évidences qu'en culture la microglie est en mesure d'internaliser et de dégrader les agrégats d'A β (Wyss-Coray et al., 2001; Bamberger et al., 2003; Koenigsknecht-Talboo and Landreth, 2005; Mandrekar et al., 2009), les macrophages périphériques sont plus efficace pour phagocyter l'A β (Wisniewski et al., 1991; Frackowiak et al., 1992; Akiyama et al., 1996; Simard et al., 2006; Majumdar et al., 2008). Ceci serait en partie dû à une faible activité enzymatique des lysosomes de microglies, probablement causée par une acidité lysosomale inférieure aux macrophages (Majumdar et al., 2008). À la suite d'une internalisation et d'une dégradation dysfonctionnelle, l'A β pratiquement intact serait sécrété par la microglie (Chung et al., 1999). En accord avec ces évidences, la déplétion de la microglie par l'injection du ganciclovir (GCV) dans un modèle de souris chimériques exprimant la thymidine kinase (TK) sous le promoteur de CD11b (la TK transforme le GCV en un produit toxique qui permet l'élimination des cellules TK⁺) n'a eu aucun impact sur le métabolisme des plaques d'A β (Grathwohl et al., 2009). Dans nos études du Chapitre 3 non plus, la microglie ne semble pas phagocyter l'A β .

1.7.3.2.3 Production des facteurs inflammatoires

En culture, l'activation de ces cellules par l'A β induit la production de plusieurs cytokines inflammatoires telles que TNF, TGF- β , IL-1 β , IL-12, IL-23, IL-8 et IL-6, en plus de la production de RO (McDonald et al., 1997; Meda et al., 1999; Walker et al., 2006; Vom Berg et al., 2012). Ces médiateurs produits par la microglie peuvent avoir directement des effets cytotoxiques sur les neurones (Marx et al., 1998; McGeer and McGeer, 1998; Akiyama et al., 2000) ou peuvent les affecter indirectement, en favorisant la production d'A β (Rogers et al., 1999; Sheng et al., 2003). D'autre part, plusieurs évidences démontrent qu'une activation finement régulée du système immunitaire inné et des microglies peut être largement bénéfique pour la pathologie (Wyss-Coray, 2006; Yong and Rivest, 2009). Par exemple, l'induction expérimentale de l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , TNF- α , IL-6 et IFN- γ au cerveau corrèle avec une diminution de dépôts d'A β (Shaftel et al., 2007; Chakrabarty et al., 2010a; Chakrabarty et al., 2010b; Matousek et al., 2012). Ces études potentiellement contradictoires démontrent que les effets de microglie dépendraient de la nature et de la durée de leur activation. De plus, les différences entre ces résultats pourraient également être dues au manque d'outils distinguant la microglie des monocytes/macrophages périphériques. Une meilleure connaissance de l'action des médiateurs spécifiques de la microglie pourrait fournir des cibles thérapeutiques adaptées dans le cadre des maladies chroniques du SNC comme la MA. Dans le Chapitre 3 de cette thèse, nous nous sommes intéressés au GPR84, un récepteur spécifique à la microglie dans le SNC, et nous avons directement exploré son rôle dans la maladie d'Alzheimer.

1.8 Problématiques, hypothèses et objectifs

La caractérisation des médiateurs moléculaires impliqués dans la formation et la coordination d'une réponse inflammatoire est essentielle pour trouver et développer des cibles thérapeutiques dans le cadre des maladies impliquant le système immunitaire. Plus d'une dizaine de cytokines, de chimiokines et leurs récepteurs couplés aux protéines G sont déjà identifiés comme des acteurs clés dans l'inflammation. Cependant, il y en a plusieurs dont l'action n'est pas caractérisée dans les affections du SNC. L'étude détaillée de ces molécules dans divers modèles comblerait nos connaissances sur les voies de signalisations impliquées dans des maladies neurodégénératives et aiderait à développer de nouveaux traitements avec des effets secondaires minimaux.

Ainsi, dans le Chapitre 2, nous avons cherché à comprendre l'action de la cytokine IL-36 dans la neuroinflammation au cours d'une maladie auto-immune démyélinisante. Le rôle crucial des cytokines de la

famille de l'IL-36 est incontestable dans des conditions inflammatoires de la peau comme le psoriasis (Blumberg et al., 2007; Blumberg et al., 2010; Tortola et al., 2012). Bien que l'expression de l'IL-36R ait été observée dans le cerveau (Lovenberg et al., 1996; Berglof et al., 2003), le rôle de la signalisation IL-36 n'a encore jamais été exploré dans le cadre des affections du SNC. Basé sur toutes ces évidences, dans le Chapitre 2, nous avons proposé l'hypothèse selon laquelle l'IL-36 serait impliquée dans le développement de maladies auto-immunes inflammatoires du SNC, telle que l'EAE. Nos objectifs spécifiques étaient de:

- (1) Déterminer l'expression spatio-temporale d'IL-36R et de ses agonistes (IL-36 α , IL-36 β et IL-36 γ) au cours du développement de l'EAE dans trois modèles, soit l'EAE induit par l'immunisation active du peptide de MOG₃₅₋₅₅, le transfert adoptif des cellules T autoréactives et dans des souris 2D2 injectées avec la PTX;
- (2) Identifier la source cellulaire de l'IL-36 γ et de son récepteur, l'IL-36R;
- (3) Mettre en évidence les gènes régulés dans la microglie lors de la stimulation avec l'IL-36 γ .
- (4) Déterminer le rôle de l'IL-36 γ et de son récepteur sur le développement, la progression et la sévérité de l'EAE.
- (5) Caractériser le recrutement de différents leucocytes dans le SNC suite à l'EAE chez des souris déficientes en IL-36 γ ou en IL-36R.

Le Chapitre 3 traite de l'implication du GPR84 dans la fonction effectrice des cellules microgliales dans des modèles murins de la neuroinflammation. Le récepteur GPR84 est exprimé dans différents modèles pathologiques du SNC dont l'EAE, l'endotoxémie, la démyélinisation induite par la cuprizone et l'axotomie (Bedard et al., 2007; Bouchard et al., 2007; Gamo et al., 2008). La seule population cellulaire qui exprime le GPR84 dans le SNC est la microglie. Cette expression est régulée par les cytokines pro-inflammatoires TNF et IL-1 (Bouchard et al., 2007). Toutefois, son implication dans d'autres troubles du système nerveux ainsi que sa fonction biologique dans le développement des maladies neuro-inflammatoires restent inconnues. L'hypothèse proposée est que le récepteur GPR84 jouerait un rôle important dans l'activation de la microglie au cours de processus neuroinflammatoires dans le modèle murin de la MA, l'EAE et l'endotoxémie. En absence d'expression de ce récepteur, la réponse microgliale deviendrait inefficace ce qui affecterait la progression et la sévérité de ces maladies. Pour répondre à cette hypothèse, nos objectifs étaient de:

- (1) Caractériser l'expression du GPR84 chez des souris APP/PS1, qui développent les signes de la MA;
- (2) Évaluer le comportement de souris déficientes pour le récepteur GPR84, dans différents modèles de la neuroinflammation, soit en subissant une endotoxémie, soit immunisées pour développer l'EAE ou soit croisées avec des souris APP/PS1;

- (3) Clarifier le rôle du GPR84 dans le recrutement de la microglie autour des plaques amyloïdes chez les souris transgéniques APP/PS1;
- (4) Identifier l'implication du GPR84 dans le métabolisme de l'A β ;
- (5) Caractériser de la dégénérescence neuronale dans le modèle de la MA déficient en GPR84 ;
- (6) Déterminer le rôle de GPR84 dans la neurogenèse chez les souris APP/PS1.

Chapitre 2: Interleukine-36 γ est exprimée par les neutrophiles et peut activer la microglie, mais n'intervient pas dans l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale

2.1 Notes introductives et contributions

L'objectif de ce projet de recherche était d'évaluer le rôle de l'Interleukine 36 γ dans le développement et la progression de l'EAE, en évaluant ainsi l'implication des neutrophiles et de la microglie dans l'EAE. Je suis l'auteure principale de cette étude qui a été publiée dans le *Journal of Neuroinflammation* et peut être retrouvée sous le lien suivant: <http://www.jneuroinflammation.com/content/12/1/173>.

La conceptualisation et la demande de financement du projet ont été effectuées par Dr Luc Vallières. J'ai développé et réalisé toutes les expériences avec l'assistance des Drs Aline Dumas et Alexandre Patenaude. La rédaction du manuscrit, l'analyse statistique et la création des figures ont été exécutées par moi. Dr Luc Vallières a par la suite corrigé et amélioré le manuscrit.

2.2 Résumé

Problématique: L'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) est un modèle de maladies inflammatoires démyélinisantes médié par différents types de leucocytes. Les mécanismes de communication de ces cellules durant les attaques auto-immunes ne sont pas complètement élucidés. Cette étude vise à déterminer le patron d'expression et le rôle de différentes composantes de la voie de signalisation de l'IL-36 (IL-36 α , IL36 β , IL-36 γ , IL-36R) dans l'EAE.

Méthodes: L'EAE a été induite par 1) immunisation active avec le peptide de myéline, 2) transfert adoptif des cellules T myéline-réactives ou 3) injection de la PTX aux souris transgéniques 2D2. Les molécules d'intérêt ont été analysées en combinant plusieurs techniques, telles que qRT-PCR, cytométrie en flux, immunobuvardage de type Western, hybridation *in situ* et immunohistochimie. Les cellules microgliales ont été traitées avec l'IL-36 γ recombinante et analysées en utilisant des puces à ADN. Différentes souches de souris ont été testées pour l'évaluation clinique et l'analyse en cytométrie en flux dans le but de comparer leur susceptibilité à développer l'EAE.

Résultats: Nos observations indiquent que l'IL-36 γ et son récepteur IL-36R sont fortement exprimés dans le tissu nerveux et hématopoïétique dans différentes formes d'EAE. L'IL-36 γ est spécifiquement exprimée par les neutrophiles, tandis que l'IL-36R est exprimé par une multitude de cellules immunes, incluant la microglie et d'autres cellules myéloïdes. En culture, la microglie répond à l'IL-36 γ recombinante induisant des molécules impliquées dans le recrutement des neutrophiles, comme le Csf3 (G-CSF), IL-1 β et Cxcl2. Cependant, les souris déficientes en IL-36 γ ou IL-36R développent des signes cliniques et histopathologiques d'EAE de façon similaire aux souris contrôles sauvages.

Conclusion: Cette étude identifie IL-36 γ comme étant une cytokine spécifique aux neutrophiles qui peut activer la microglie, mais n'a qu'une expression corrélative dans l'EAE et ne contribue pas à sa pathogenèse.

2.3 Interleukin-36 γ is expressed by neutrophils and can activate microglia, but has no role in experimental autoimmune encephalomyelitis

Lusine Bozoyan¹, Aline Dumas¹, Alexandre Patenaude¹ and Luc Vallières^{1,2}

¹Axis of Neuroscience, University Hospital Center of Quebec, Quebec, Canada

²Department of Molecular Medicine, Laval University, Quebec, Canada

2705 Laurier Boulevard, Quebec, QC, Canada, G1V 4G2

2.4 Abstract

Background: Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is a model of inflammatory demyelinating diseases mediated by different types of leukocytes. How these cells communicate with each other to orchestrate autoimmune attacks is not fully understood, especially in the case of neutrophils, whose importance in EAE is newly established. The present study aimed to determine the expression pattern and role of different components of the IL-36 signaling pathway (IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ , IL-36R) in EAE.

Methods: EAE was induced by either active immunization with myelin peptide, passive transfer of myelin-reactive T cells or injection of pertussis toxin to transgenic 2D2 mice. The molecules of interest were analyzed using a combination of techniques, including qRT-PCR, flow cytometry, Western blotting, in situ hybridization and immunohistochemistry. Microglial cultures were treated with recombinant IL-36 γ and analyzed using DNA microarrays. Different mouse strains were subjected to clinical evaluation and flow cytometric analysis in order to compare their susceptibility to EAE.

Results: Our observations indicate that both IL-36 γ and IL-36R are upregulated in nervous and hematopoietic tissues in different forms of EAE. IL-36 γ is specifically expressed by neutrophils, while IL-36R is expressed by different immune cells, including microglia and other myeloid cells. In culture, microglia respond to recombinant IL-36 γ by expressing molecules involved in neutrophil recruitment, such as Csf3, IL-1 β and Cxcl2. However, mice deficient in either IL-36 γ or IL-36R develop similar clinical and histopathological signs of EAE compared to wild-type controls.

Conclusion: This study identifies IL-36 γ as a neutrophil-related cytokine that can potentially activate microglia, but that is only correlative and not contributory in EAE.

2.5 Background

EAE is an inflammatory demyelinating disease of the central nervous system (CNS) that can be induced in animals to model immunological processes involved in human diseases such as multiple sclerosis, neuromyelitis optica and acute disseminated encephalomyelitis. EAE is initiated by CD4⁺ T helper lymphocytes of the Th1 or Th17 subset that recognize myelin peptides through their T cell receptors [1]. These cells do not act alone, but in concert with different myeloid cells, including monocyte-derived CD11c⁺ dendritic cells [2-5], which activate them by presenting the myelin peptides together with costimulatory signals [6-12], and monocyte-derived macrophages [2,4,13,14], which execute effector functions leading to demyelination [15]. In addition, recent studies have established that neutrophils importantly contribute to EAE [16-19], although their precise role is still unclear.

To coordinate their actions, immune cells must communicate with each other through chemical messengers such as interleukins, chemokines and growth factors. Many of these molecules have been studied in the context of EAE in the hope of identifying potential therapeutic targets. For example: GM-CSF derives from T cells and promotes dendritic cell recruitment [20,21]; IL-12 and IL-23 are secreted by dendritic cells to sustain T cell activation [22]; and IL-1 β is released from different myeloid cells to induce inflammatory responses [23]. However, no neutrophil-specific cytokine has been identified to date.

Following a study conducted to clarify the mechanism underlying the adjuvant effect of pertussis toxin (PTX) in EAE [24], we compared the transcriptional profiles of peritoneal leukocytes isolated from mice injected or not with PTX using DNA microarrays (unpublished data). Among the most upregulated genes was IL-36 γ (also called IL1F9), a newly characterized cytokine of the IL-1 family [25]. The IL-36–IL-36R signaling pathway comprises three agonists (IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ), two antagonists (IL-36RA, IL-38), one specific receptor subunit (IL-36R) and one accessory receptor subunit (IL-1RAcP) that is shared with the classical interleukin-1 receptor (IL-1R). The IL-36 proteins exhibit a typical β -trefoil structure [26] whose activity is enhanced by N-terminal truncation [27].

In the CNS, the expression of IL-36 γ has never been studied, but that of IL-36R has been reported under normal conditions in non-neuronal elements such as the meninges, choroid plexus and perivascular cells [28]. In the periphery, IL-36 γ expression is constitutive in epithelial cell lines and inducible in myeloid cells (monocytes, macrophages, dendritic cells) by inflammatory mediators (e.g., IL-1 β , TNF, IL-17, IL-23, TLR ligands) [29-37]. IL-36R is found on keratinocytes, splenic CD4⁺ T cells and different myeloid cells [38-40].

IL-36 γ promotes not only inflammation, but also dendritic cell maturation and ability to generate a Th1 response. Indeed, recombinant IL-36 γ induces cytokines and chemokines (e.g. IL-6, IL-8, Csf2, Csf3, Cxcl1,

Ccl20) when injected into epithelial tissues, resulting in neutrophil and T cell infiltration [31,40-42]. Furthermore, IL-36 γ stimulates dendritic cells to produce inflammatory mediators (e.g. IL-6, IL-1 β , IL-12p40, IL-12p35, IL-23p19, Cox-2, Cxcl1, Csf2) and cell surface receptors involved in antigen presentation (e.g. MHCII, CD80, CD83, CD86) [38-40]. IL-36 γ can also induce CD4+ T cells to adopt an inflammatory IFN γ + Th1 profile even in the absence of antigen-presenting cells, indicating that it can directly signal through IL-36R on T cells [38]. Consistently, the IL-36–IL-36R axis was found to be involved in psoriasis [29,32,34,43-50], but the possibility that it also contributes to other T cell-driven autoimmune diseases such as multiple sclerosis remains to be determined.

The goal of the present study was to test the hypothesis that myeloid cells produces IL-36 γ during EAE to promote inflammatory Th1/Th17 responses towards myelin. The findings presented below demonstrate that IL-36 γ is specifically and strongly expressed by neutrophils in both CNS and hematopoietic compartments during certain forms of EAE and that microglia can react to IL-36 γ by releasing neutrophil-related cytokines; however, IL-36 γ does not influence the clinical and histopathological signs of EAE.

2.6 Methods

2.6.1 Animals

C57BL/6 mice were obtained from The Jackson Laboratory. Colonies of IL-36 γ ^{-/-}, IL-36R^{-/-} and 2D2 mice (C57BL/6 background) were generated from breeders provided by the Mutant Mouse Regional Resource Center, Amgen or The Jackson Laboratory, respectively. The genotypes were confirmed by PCR using the primers listed in **Supplementary Table 2-1**. The experiments were performed on male mice aged 8-10 weeks under specific pathogen-free conditions with the approval of the Laval University Animal Protection Committee.

2.6.2 EAE induction by active immunization

Mice were subcutaneously injected into both flanks with a total of 200 μ l of emulsion containing 300 μ g of MOG₃₅₋₅₅ peptide (Feldan) dissolved in saline and mixed with an equal volume of complete Freund's adjuvant containing 500 μ g of killed *Mycobacterium tuberculosis* H37 RA (Difco Laboratories). They were also injected intraperitoneally with 20 μ g/kg of PTX (List Biological Laboratories) immediately and 2 days after immunization.

2.6.3 EAE induction by adoptive transfer

Mice were intraperitoneally injected with 20×10^6 encephalitogenic cells. These were isolated from abdominal lymph nodes and spleens of mice killed 8 days after active EAE induction, and then cultured for 2 days in DMEM with MOG₃₅₋₅₅ peptide (15 µg/ml), murine IL-12 (5 ng/ml, R&D Systems), murine IL-23 (20 ng/ml, R&D Systems), heat-inactivated HyClone bovine growth serum (10%, Thermo Scientific), modified Eagle's medium nonessential amino acids (1%, Wisent), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml) and amphotericin B (250 ng/ml).

2.6.4 EAE induction in 2D2 mice

2D2 mice received 2 intraperitoneal injections of PTX (20 µg/kg) at a 2-day interval.

2.6.5 Evaluation of EAE symptoms

Mice were weighed and scored daily as follows: 0, no visual sign of disease; 0.5, partial tail paralysis; 1, complete tail paralysis; 1.5, weakness in one hindlimb; 2, weakness in both hindlimbs; 2.5, partial hindlimb paralysis; 3, complete hindlimb paralysis; 3.5, partial forelimb paralysis; 4, complete forelimb paralysis; 5, dead or killed for humane reasons.

2.6.6 Cell suspension and flow cytometry

Mice were anesthetized and exsanguinated by cardiac perfusion with saline. Spinal cords were harvested, minced with razor blades in Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS, with Ca^{2+} and Mg^{2+}), digested for 45 min at 37°C in DPBS containing 0.13 U/ml Liberase TM (Roche Diagnostics) and 50 U/ml DNase I (Sigma-Aldrich), filtered through 40-µm cell strainers, then separated from myelin debris by centrifugation in 35% Percoll (GE Healthcare). Spleens were mashed through 40-µm cell strainers and treated with Ammonium chloride solution (Stemcell Technologies) to remove residual erythrocytes. For immunostaining, cells were incubated sequentially with rat anti-CD16/CD32 antibody (5 µg/ml, BD Biosciences, clone 2.4G2) and Fixable viability dye eFluor 506 (1:1000, eBioscience) for 5 min, with anti-IL-36R antibody (Abcam #ab171844 or R&D Systems #AF2354) for 30 min, and with combinations of the following antibodies for 30 min: rat anti-CD45-FITC (BD Biosciences, clone 30-F11), rat anti-CD11b-V450 (BD Biosciences, clone M1/70), rat anti-Ly6G-APC-Cy7 (Biolegend, clone 1A8), rat anti-CD3ε-PE (BD Biosciences, clone 145-2C11), rat anti-CD19-PerCP-Cy5.5, (BD Biosciences, clone 1D3), rat anti-CD11c-Alexa 647 (Biolegend, clone N418) and goat anti-rabbit

IgG-Alexa 594 (Invitrogen, Cat No A11072). The latter antibodies were diluted at 1:200, except anti-CD45-FITC, which was diluted at 1:100. Isotype control antibodies and fluorescence-minus-one controls were used for gating. Cells were washed and resuspended in PBS before being analyzed with a FACSAria II flow cytometer (BD Biosciences). All the analyses were performed by excluding dead cells and doublets using FlowJo software (Tree Star, version 10.0.7r2).

2.6.7 Western blotting

Ly6G⁺ neutrophils, isolated by flow cytometry, were homogenized in extraction buffer (50 mM Tris-HCl at pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 1 mM ethylene glycol tetraacetic acid, 2 mM Na pyrophosphate, 10 mM Na β -glycerophosphate, 1 mM Na orthovanadate, 1 mM phenylmethanesulfonylfluoride, 1 \times protease and phosphatase inhibitor cocktail [Sigma]). The protein samples (50 μ g) were resolved in a 12% SDS-PAGE Mini-Protean Precast gel (Bio-Rad) and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (Perkin Elmer). The membrane was blocked in PBS containing 0.1% Tween 20 and 7% non-fat milk, and then incubated at 4°C overnight with an antibody against IL-36 γ (1:200, Santa Cruz, sc-168163) or β -actin (1:50000, Abcam, mab150), followed by 1 h at room temperature in the appropriate secondary horseradish peroxidase-conjugated antibody (Cell Signaling Technology). The antibodies were detected using the Western Lightning Plus-ECL chemiluminescence substrate (Perkin Elmer).

2.6.8 Immunostaining

Immunostaining was performed as described previously [51] using the following primary antibodies: rat anti-CD3 (1:500, BD Biosciences, clone 17A2), rat anti-Ly6G (1:5000, BD Biosciences, clone 1A8).

2.6.9 *In situ* hybridization

Spinal cord sections were analyzed for IL-36 γ and IL-36R mRNAs by radioisotopic *in situ* hybridization as described previously [52].

2.6.10 Microscopy

Micrographs were taken using a Retiga EX camera on a Nikon E800 microscope. Images were adjusted for contrast, brightness and sharpness using Photoshop 12 (Adobe Systems).

2.6.11 Microglial cell isolation and culture

Primary microglia were isolated from newborn mice (1-day-old or less). The brains were minced with razor blades in DPBS and passed 4 times through a 20-G needle. After centrifugation (1,500 rpm), the pellets were resuspended and incubated at 37°C for 15 min in DPBS containing 0.25% trypsin-EDTA (Wisent) and 50 U/ml DNase I. Cells were plated in T-25 flasks (~3 brains/flask) and grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (Wisent) supplemented with 10% heat-inactivated HyClone bovine growth serum, with medium changed every 2 days. After 2 weeks, microglia were separated from other glial cells as described previously [53]. Briefly, they were incubated with 0.05% trypsin in DMEM at 37°C for 30-45 min, rinsed with PBS to remove contaminating non-adherent cells, then grown in a 1:1 mixture of fresh media and conditioned media from mixed glial cultures (2-3 days). Microglial purity was >99%, as determined by flow cytometry using the myeloid cell marker CD11b.

For experimentation, primary microglia were seeded in 12-well plates and used at ~70% confluence (after 5-7 days). BV2 microglia were seeded in 12-well plates at a density of 500,000 cells and used on the next day. Cells were stimulated with 100 ng/ml recombinant mouse IL-36 γ (amino acids 13-164, R&D Systems) or PBS as control. After 6 h, cells were rinsed with PBS, resuspended in lysis buffer and stored at -80°C until RNA extraction.

2.6.12 RNA extraction and qRT-PCR

Total RNA from tissues and cells was isolated by homogenization in TRI-reagent or lysis buffer (Sigma-Aldrich), respectively. GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) was used for RNA purification. First strand cDNA was generated from 5 (tissues) or 1 (cells) μ g of total RNA using Superscript III (Invitrogen) with random hexamers and 20-mer oligo-dT primers, then purified using 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 and primers listed in **Supplementary Table 2-2** according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems). The PCR conditions consisted of 45 cycles of denaturation (10 s at 95°C), annealing (10 s at 60°C), elongation (14 s at 72°C) and reading (5 s at 74°C). The number of mRNA copies was determined using the second derivative method [54].

2.6.13 Statistical analyses

Data are expressed as mean \pm standard error. Means were compared using the Wilcoxon or Kruskal-Wallis test, except for the microarray data, which were compared using the Student's *t* test. EAE incidence curves

were constructed using the Kaplan-Meier method and compared using the Wilcoxon test. All these analyses were performed using JMP 10 (SAS Institute) with a significance level of 5%.

2.7 Results

2.7.1 Neutrophils express IL-36 γ in the CNS and hematopoietic tissues of EAE mice

To compare the spatio-temporal expression patterns of IL-36R and its agonists (IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ) in different MS models, we quantified their mRNAs by qRT-PCR in nervous and hematopoietic tissues from mice killed at various time points after EAE induction by either one of the following methods: 1) active immunization with MOG₃₅₋₅₅ peptide in complete Freund's adjuvant (CFA) plus PTX (active EAE); 2) adoptive transfer of splenocytes isolated from EAE mice on day 8 and restimulated in culture for 2 days with MOG₃₅₋₅₅ in the presence of IL-12 and IL-23 (passive EAE); and 3) intraperitoneal injections of PTX to 2D2 mice expressing a transgenic MOG-specific T cell receptor [55]. Because the latter mice develop EAE within 2 weeks at an incidence lower than 60% [24,55], we killed them at a single time point (day 15) and separated them into those that had developed EAE or not (2D2 with or without EAE). Wild-type mice injected with PBS, PTX or CFA only were used as controls.

In the spinal cord, IL-36 γ and IL-36R mRNAs were markedly increased in the 3 EAE models, compared to control mice and PTX-treated 2D2 mice without EAE (**Fig. 2-1**). An important difference between the active and passive models is that IL-36 γ mRNA peaked at the latest time point examined (day 12) in the former, whereas it peaked at day 9 and declined thereafter in the latter. In the hematopoietic tissues (spleen, blood), IL-36 γ mRNA was increased in active EAE and, to a lesser extent, in response to PTX and CFA, but not in passive EAE. The upregulation of IL-36 γ was MOG-specific in the spleen and spinal cord, but mainly attributable to the adjuvants in the blood. Higher expression of IL-36 γ mRNA was also found in the spleen of 2D2 mice compared to that of wild-type mice, but there was no difference between PTX-treated 2D2 mice with or without EAE. IL-36R mRNA was modestly increased only in the spleen of mice with active EAE. No significant expression of IL-36 α and IL-36 β mRNAs was detected in any of the tissues and conditions examined (average amounts detected: <220 copies per μ m of total RNA; data not shown). Together, these results suggest that IL-36 γ is the primary IL-36R agonist that is upregulated during EAE in both CNS and hematopoietic tissues, where its receptor can also be expressed.

To identify the cell types expressing IL-36 γ and IL-36R, we first quantified their mRNAs by qRT-PCR in different leukocytes purified from the spleen or spinal cord of mice with active EAE (day 12) by flow cytometry

on the basis of established cell-specific markers. In both tissues, IL-36 γ mRNA was detected at high levels only in Ly6G⁺ neutrophils, whereas IL-36R was detected in different cells, especially those of the myeloid lineage (**Fig. 2-2a**). Second, the expression of IL-36 γ was confirmed at the protein level by Western blotting using FACS-purified splenic neutrophils (note that it was not possible to include neutrophils from spinal cords, because they were less abundant and yielded not enough proteins). A specific band for IL-36 γ was detected at the predicted molecular weight of ~22 kDa in neutrophils from IL-36 $\gamma^{+/+}$ mice, but not from IL-36 $\gamma^{-/-}$ mice (**Fig. 2-2b**). We also attempted to confirm the expression of IL-36R by flow cytometry using 2 different antibodies, but none of them provided reliable results, as the labeling was comparable between IL-36R^{+/+} and IL-36R^{-/-} neutrophils and was therefore non-specific (data not shown). Third, we examined the distribution of IL-36 γ mRNA in spinal cord sections from EAE and naïve mice by radioisotopic *in situ* hybridization. Some of these sections were also immunostained for Ly6G or the macrophage/microglia marker Iba1. Both transcripts were strongly expressed in EAE mice in areas near the meninges, but were not detectable in naïve mice (**Fig. 2-2c**). IL-36 γ mRNA was co-localized with Ly6G⁺ cells, while IL-36R mRNA was reliably co-localized only with Iba1⁺ cells (**Fig. 2-2d**), although we could not exclude its presence in other cell types. These results led us to conclude that neutrophils can produce IL-36 γ during EAE in both CNS and peripheral compartments, potentially to communicate with microglia and other myeloid cells.

2.7.2 Microglia respond to IL-36 γ by expressing inflammatory genes

To demonstrate that microglia are adequately equipped to respond to IL-36 γ , we first compared the transcriptional profiles of BV2 microglial cells treated or not for 6 h with recombinant IL-36 γ using Affymetrix DNA microarrays. The dose used (100 ng/ml) was chosen because it was previously reported to be optimal for stimulating IL-6 secretion from cultured dendritic cells [38]. Twenty-two genes were found to be upregulated ≥ 2 times with a hybridization signal ≥ 100 (**Supplementary Table 2-3** and **Fig. 2-3a**). The 3 most upregulated genes coded for Csf3, IL-1 β and Cxcl2, which are well known to be involved in neutrophil biology [56]. Quantitative PCR analysis confirmed that these 3 genes were strongly upregulated in BV2 cells by IL-36 γ (**Fig. 2-3b**). To validate these results, we repeated the experiment with primary microglia collected from IL-36R^{+/+} and IL-36R^{-/-} mice. As expected, upregulation of Csf3, IL-1 β and Cxcl2 were observed in IL-36R^{+/+} microglia following IL-36 γ exposure, but not in IL-36R^{-/-} microglia (**Fig. 2-3c**). The latter cells were not devoid of the ability to express these genes, because they expressed them at the same levels as IL-36R^{+/+} microglia when stimulated with lipopolysaccharide (10 ng/ml; data not shown). Altogether, these results indicate that microglia have the potential to respond to IL-36 γ , at least *ex vivo*.

2.7.3 The IL-36 γ -IL-36R axis does not influence the course of active EAE

As IL-36 γ and IL-36R are strongly and chronically expressed in active EAE (**Fig. 2-1** and **2-2**) and as the resident macrophages of the CNS can potentially respond to IL-36 γ (**Fig. 2-3**), we hypothesized that the loss of these proteins would have an impact on the clinical course of active EAE. To address this possibility, we induced the disease in mice deficient or not in either IL-36 γ or IL-36R and then scored their symptoms daily for 21 days. As shown in **Figure 2-4**, the incidence, onset and severity of EAE were similar between the knockouts and their wild-type controls. To examine whether the genetic deletions had influenced the nature of the immune cells infiltrating the CNS, we killed all of the mice on day 21 and prepared single-cell suspensions from their spinal cords for flow cytometric analysis. Consistently with the behavioral observations, no intergenotype difference was observed in the number of microglia, macrophages, dendritic cells, neutrophils as well as of T and B cells (**Fig. 2-5**). Therefore, these results demonstrate that the IL-36 γ -IL-36R axis does not play a significant role in the autoimmune response involved in active EAE.

2.8 Discussion

As observed in other immunological diseases such as psoriasis [29,32,34,57,58], the present study shows that IL-36 γ and IL-36R are upregulated in 3 models of EAE. It also shows that IL-36 γ derives from neutrophils and can stimulate microglia to produce neutrophil-stimulating cytokines, which is consistent with previous studies showing that IL-36 γ induces both the production of such cytokines in other myeloid cells residing outside the CNS [31,38,40-42] and the recruitment of neutrophils [42]. Despite these observations, we demonstrate that neither IL-36 γ nor IL-36R plays a significant role in EAE, similarly to what was reported in murine models of arthritis [59,60] and mycobacterial infection [61].

The main question that arises is why IL-36 γ is expressed, but does not play a role in certain conditions. One hypothesis is that IL-36 γ , like other members of the IL-1 family, requires a second signal to be processed, activated and secreted. This signal would be present in psoriasis, but not in EAE and arthritis models. In support of this, it has been shown that IL-36 γ requires N-terminal truncation to be fully active [27]. However, it is unknown whether this truncation occurs *in vivo* and what would be the protease involved. Our work shows, for the first time to our knowledge, that the full-length IL-36 γ protein (193 amino acids, 22 kDa) is detectable *in vivo* (i.e. in neutrophils from EAE mice). As the truncated form is not detectable in the same conditions, it is likely that IL-36 γ remains stored under a pro-form in the cytoplasm of neutrophils during EAE. A second (non exclusive) hypothesis is that neutrophils release IL-36 γ during a cell death process such as NETosis, which occurs in psoriasis [62], but not likely in EAE. This possibility that IL-36 γ acts as an alarmin (i.e. an endogenous molecule that signals tissue and cell damage) is so far only supported by the observation that the

TLR3 agonist polyinosinic-polycytidylic acid concomitantly induces cell death and IL-36 γ release in keratinocyte cultures [35]. Finally, a third hypothesis is that the CNS, an immunoprivileged site, has a higher activation threshold to IL-36 γ due to a combination of mechanisms (e.g. via the secretion of IL-36 antagonists and the generation of intracellular signaling inhibitors such as SIGIRR [63]).

A positive aspect of this study is that we have identified microglia as a potential target of IL-36 γ . This suggests that IL-36 γ could contribute to neuroinflammation, perhaps by promoting neutrophil recruitment, in certain conditions that remain to be determined. Another positive aspect is that we have identified neutrophils as a major and exclusive source of IL-36 γ in nervous and hematopoietic tissues (i.e. brain, spinal cord, spleen, blood). According to previous studies, keratinocytes and other epithelial cells can also produce IL-36 γ in culture [30-34,64], but, to our knowledge, this remains to be confirmed *in vivo*. Therefore, it will be important in the future to determine whether neutrophils are a predominant source of IL-36 γ in epithelial inflammatory diseases (e.g. psoriasis, asthma) as they are in EAE.

In conclusion, this study demonstrates that components of the IL-36 signaling pathway are strongly expressed in EAE, but that they do not contribute to this pathology. Furthermore, by revealing that IL-36 γ is a neutrophil-specific marker in different tissues and that microglia have the potential to respond to this cytokine, this study opens up new research avenues for elucidating the biological function of IL-36 γ and its clinical significance.

2.9 Competing interests

The authors declare that they have no competing interest.

2.10 Acknowledgments

This work was supported by the Multiple Sclerosis Society of Canada and the Canadian Institutes for Health Research. L.B. received a Merit Scholarship from the *Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies*.

2.11 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;113:3190-7.
3. Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R, Stigliano E, Capello E, Mancardi GL et al. Dendritic cells in multiple sclerosis lesions: maturation stage, myelin uptake, and interaction with proliferating T cells. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2006;65:124-41.
4. Fischer HG, Reichmann G. Brain dendritic cells and macrophages/microglia in central nervous system inflammation. *J Immunol.* 2001;166:2717-26.
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. McMahon EJ, Bailey SL, Castenada CV, Waldner H, Miller SD. Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. *Nat Med.* 2005;11:335-9.
7. Greter M, Heppner FL, Lemos MP, Odermatt BM, Goebels N, Laufer T et al. Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Nat Med.* 2005;11:328-34.
8. Deshpande P, King IL, Segal BM. Cutting edge: CNS CD11c⁺ cells from mice with encephalomyelitis polarize Th17 cells and support CD25⁺CD4⁺ T cell-mediated immunosuppression, suggesting dual roles in the disease process. *J Immunol.* 2007;178:6695-9.
9. Bailey SL, Schreiner B, McMahon EJ, Miller SD. CNS myeloid DCs presenting endogenous myelin peptides 'preferentially' polarize CD4⁺ T(H)-17 cells in relapsing EAE. *Nat Immunol.* 2007;8:172-80.
10. Kivisakk P, Imitola J, Rasmussen S, Elyaman W, Zhu B, Ransohoff RM et al. Localizing central nervous system immune surveillance: meningeal antigen-presenting cells activate T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann Neurol.* 2009;65:457-69.
11. Bartholomaeus I, Kawakami N, Odoardi F, Schlager C, Miljkovic D, Ellwart JW et al. Effector T cell interactions with meningeal vascular structures in nascent autoimmune CNS lesions. *Nature.* 2009;462:94-8.
12. Wlodarczyk A, Lobner M, Cedile O, Owens T. Comparison of microglia and infiltrating CD11c(+) cells as antigen presenting cells for T cell proliferation and cytokine response. *J Neuroinflammation.* 2014;11:57.
13. 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;161:3767-75.

14. Heppner FL, Greter M, Marino D, Falsig J, Raivich G, Hovelmeyer N et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis. *Nat Med.* 2005;11:146-52.

15. Yamasaki R, Lu H, Butovsky O, Ohno N, Rietsch AM, Cialic R et al. Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. *J Exp Med.* 2014;211:1533-49.

16. 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;205:811-23.

17. 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;30:9074-83.

18. Roy M, Richard JF, Dumas A, Vallieres L. CXCL1 can be regulated by IL-6 and promotes granulocyte adhesion to brain capillaries during bacterial toxin exposure and encephalomyelitis. *J Neuroinflammation.* 2012;9:18.

19. Aube B, Levesque SA, Pare A, Chamma E, Kebir H, Gorina R et al. Neutrophils mediate blood-spinal cord barrier disruption in demyelinating neuroinflammatory diseases. *J Immunol.* 2014;193:2438-54.

20. Codarri L, Gyölvézi G, Tosevski V, Hesske L, Fontana A, Magnenat L et al. ROR γ t drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat Immunol.* 2011;12:560-7.

21. El-Behi M, Ciric B, Dai H, Yan Y, Cullimore M, Safavi F et al. The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nat Immunol.* 2011;12:568-75.

22. 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;205:1535-41.

23. Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood.* 2011;117:3720-32.

24. Dumas A, Amiable N, de Rivero Vaccari JP, Chae JJ, Keane RW, Lacroix S et al. The inflammasome pyrin contributes to pertussis toxin-induced IL-1 β synthesis, neutrophil intravascular crawling and autoimmune encephalomyelitis. *PLoS Pathog.* 2014;10:e1004150.

25. Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity.* 2013;39:1003-18.

26. Gunther S, Sundberg EJ. Molecular Determinants of Agonist and Antagonist Signaling through the IL-36 Receptor. *J Immunol.* 2014

27. Towne JE, Renshaw BR, Douangpanya J, Lipsky BP, Shen M, Gabel CA et al. Interleukin-36 (IL-36) ligands require processing for full agonist (IL-36alpha, IL-36beta, and IL-36gamma) or antagonist (IL-36Ra) activity. *J Biol Chem.* 2011;286:42594-602.
28. Lovenberg TW, Crowe PD, Liu C, Chalmers DT, Liu XJ, Liaw C et al. Cloning of a cDNA encoding a novel interleukin-1 receptor related protein (IL 1R-rp2). *J Neuroimmunol.* 1996;70:113-22.
29. Debets R, Timans JC, Homey B, Zurawski S, Sana TR, Lo S et al. Two novel IL-1 family members, IL-1 delta and IL-1 epsilon, function as an antagonist and agonist of NF-kappa B activation through the orphan IL-1 receptor-related protein 2. *J Immunol.* 2001;167:1440-6.
30. Vos JB, van Sterkenburg MA, Rabe KF, Schalkwijk J, Hiemstra PS, Datson NA. Transcriptional response of bronchial epithelial cells to *Pseudomonas aeruginosa*: identification of early mediators of host defense. *Physiol Genomics.* 2005;21:324-36.
31. Chustz RT, Nagarkar DR, Puposki JA, Favoreto SJ, Avila PC, Schleimer RP et al. Regulation and function of the IL-1 family cytokine IL-1F9 in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011;45:145-53.
32. Johnston A, Xing X, Guzman AM, Riblett M, Loyd CM, Ward NL et al. IL-1F5, -F6, -F8, and -F9: a novel IL-1 family signaling system that is active in psoriasis and promotes keratinocyte antimicrobial peptide expression. *J Immunol.* 2011;186:2613-22.
33. Muhr P, Zeitvogel J, Heitland I, Werfel T, Wittmann M. Expression of interleukin (IL)-1 family members upon stimulation with IL-17 differs in keratinocytes derived from patients with psoriasis and healthy donors. *Br J Dermatol.* 2011;165:189-93.
34. Carrier Y, Ma HL, Ramon HE, Napierata L, Small C, O'Toole M et al. Inter-regulation of Th17 cytokines and the IL-36 cytokines in vitro and in vivo: implications in psoriasis pathogenesis. *J Invest Dermatol.* 2011;131:2428-37.
35. Lian LH, Milora KA, Manupipatpong KK, Jensen LE. The double-stranded RNA analogue polyinosinic-polycytidylic acid induces keratinocyte pyroptosis and release of IL-36 γ . *J Invest Dermatol.* 2012;132:1346-53.
36. Bachmann M, Scheiermann P, Hardle L, Pfeilschifter J, Muhl H. IL-36gamma/IL-1F9, an innate T-bet target in myeloid cells. *J Biol Chem.* 2012;287:41684-96.
37. Gresnigt MS, Rosler B, Jacobs CW, Becker KL, Joosten LA, van der Meer JW et al. The IL-36 receptor pathway regulates *Aspergillus fumigatus*-induced Th1 and Th17 responses. *Eur J Immunol.* 2013;43:416-26.
38. Vigne S, Palmer G, Lamacchia C, Martin P, Talabot-Ayer D, Rodriguez E et al. IL-36R ligands are potent regulators of dendritic and T cells. *Blood.* 2011;118:5813-23.
39. Mutamba S, Allison A, Mahida Y, Barrow P, Foster N. Expression of IL-1Rrp2 by human myelomonocytic cells is unique to DCs and facilitates DC maturation by IL-1F8 and IL-1F9. *Eur J Immunol.* 2012;42:607-17.

40. Foster AM, Baliwag J, Chen CS, Guzman AM, Stoll SW, Gudjonsson JE et al. IL-36 Promotes Myeloid Cell Infiltration, Activation, and Inflammatory Activity in Skin. *J Immunol.* 2014;192:6053-61.
41. Towne JE, Garka KE, Renshaw BR, Virca GD, Sims JE. Interleukin (IL)-1F6, IL-1F8, and IL-1F9 signal through IL-1Rrp2 and IL-1RAcP to activate the pathway leading to NF-kappaB and MAPKs. *J Biol Chem.* 2004;279:13677-88.
42. Ramadas RA, Ewart SL, Medoff BD, LeVine AM. Interleukin-1 family member 9 stimulates chemokine production and neutrophil influx in mouse lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011;44:134-45.
43. Blumberg H, Dinh H, Trueblood ES, Pretorius J, Kugler D, Weng N et al. Opposing activities of two novel members of the IL-1 ligand family regulate skin inflammation. *J Exp Med.* 2007;204:2603-14.
44. Blumberg H, Dinh H, Dean CJ, Trueblood ES, Bailey K, Shows D et al. IL-1RL2 and its ligands contribute to the cytokine network in psoriasis. *J Immunol.* 2010;185:4354-62.
45. Onoufriadis A, Simpson MA, Pink AE, Di Meglio P, Smith CH, Pullabhatla V et al. Mutations in IL36RN/IL1F5 are associated with the severe episodic inflammatory skin disease known as generalized pustular psoriasis. *Am J Hum Genet.* 2011;89:432-7.
46. Sugiura K, Takeichi T, Kono M, Ogawa Y, Shimoyama Y, Muro Y et al. A novel IL36RN/IL1F5 homozygous nonsense mutation, p.Arg10X, in a Japanese patient with adult-onset generalized pustular psoriasis. *Br J Dermatol.* 2012;167:699-701.
47. Tortola L, Rosenwald E, Abel B, Blumberg H, Schafer M, Coyle AJ et al. Psoriasisiform dermatitis is driven by IL-36-mediated DC-keratinocyte crosstalk. *J Clin Invest.* 2012;122:3965-76.
48. Sugiura K, Takemoto A, Yamaguchi M, Takahashi H, Shoda Y, Mitsuma T et al. The majority of generalized pustular psoriasis without psoriasis vulgaris is caused by deficiency of interleukin-36 receptor antagonist. *J Invest Dermatol.* 2013;133:2514-21.
49. Farooq M, Nakai H, Fujimoto A, Fujikawa H, Matsuyama A, Kariya N et al. Mutation analysis of the IL36RN gene in 14 Japanese patients with generalized pustular psoriasis. *Hum Mutat.* 2013;34:176-83.
50. Kanazawa N, Nakamura T, Mikita N, Furukawa F. Novel IL36RN mutation in a Japanese case of early onset generalized pustular psoriasis. *J Dermatol.* 2013;40:749-51.
51. 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;28:10187-99.
52. Bedard A, Tremblay P, Chernomoretz A, Vallieres L. Identification of genes preferentially expressed by microglia and upregulated during cuprizone-induced inflammation. *Glia.* 2007;55:777-89.
53. Saura J, Tusell JM, Serratos J. High-yield isolation of murine microglia by mild trypsinization. *Glia.* 2003;44:183-9.

54. 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;38:287-93.
55. Bettelli E, Pagany M, Weiner HL, Linington C, Sobel RA, Kuchroo VK. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *J Exp Med*. 2003;197:1073-81.
56. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2013;13:159-75.
57. D'Erme AM, Wilsman-Theis D, Wagenpfeil J, Hölzel M, Ferring-Schmitt S, Sternberg S et al. IL-36 γ (IL-1F9) is a biomarker for psoriasis skin lesions. *J Invest Dermatol*. 2015;135:1025-32.
58. Keermann M, Köks S, Reimann E, Prans E, Abram K, Kingo K. Transcriptional landscape of psoriasis identifies the involvement of IL36 and IL36RN. *BMC Genomics*. 2015;16:322.
59. Lamacchia C, Palmer G, Rodriguez E, Martin P, Vigne S, Seemayer CA et al. The severity of experimental arthritis is independent of IL-36 receptor signaling. *Arthritis Res Ther*. 2013;15:R38.
60. Derer A, Groetsch B, Harre U, Böhm C, Towne J, Schett G et al. Blockade of IL-36 receptor signaling does not prevent from TNF-induced arthritis. *PLoS One*. 2014;9:e101954.
61. Segueni N, Vigne S, Palmer G, Bourigault ML, Olleros ML, Vesin D et al. Limited Contribution of IL-36 versus IL-1 and TNF Pathways in Host Response to Mycobacterial Infection. *PLoS One*. 2015;10:e0126058.
62. Pinegin B, Vorobjeva N, Pinegin V. Neutrophil extracellular traps and their role in the development of chronic inflammation and autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2015;14:633-40.
63. Costelloe C, Watson M, Murphy A, McQuillan K, Loscher C, Armstrong ME et al. IL-1F5 mediates anti-inflammatory activity in the brain through induction of IL-4 following interaction with SIGIRR/TIR8. *J Neurochem*. 2008;105:1960-9.
64. Kumar S, McDonnell PC, Lehr R, Tierney L, Tzimas MN, Griswold DE et al. Identification and initial characterization of four novel members of the interleukin-1 family. *J Biol Chem*. 2000;275:10308-14.
65. Ramadas RA, Li X, Shubitowski DM, Samineni S, Wills-Karp M, Ewart SL. IL-1 Receptor antagonist as a positional candidate gene in a murine model of allergic asthma. *Immunogenetics*. 2006;58:851-5.

2.3.10 Figures

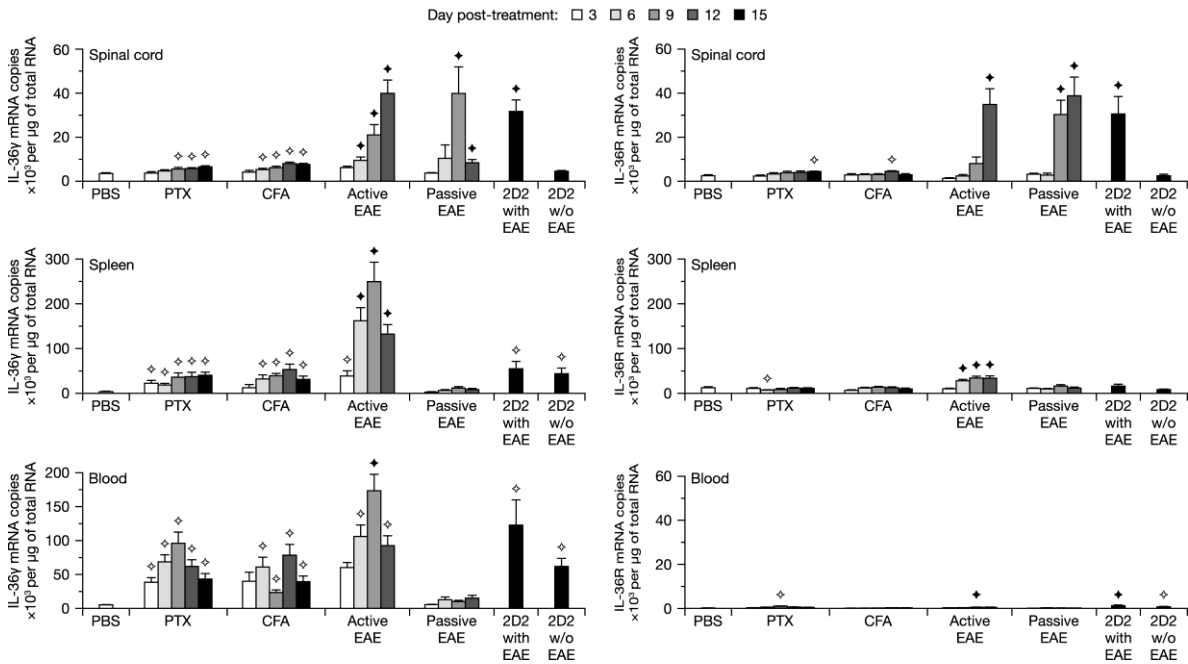


Figure 2-1. IL-36 γ and IL-36R are transcriptionally upregulated in 3 EAE models.

Quantification of the mRNAs encoding IL-36 γ and IL-36R by qRT-PCR in different tissues from mice killed at the indicated time points after induction of EAE by either active immunization with MOG peptide, passive transfer of encephalitogenic T cells or injection of PTX to 2D2 mice. Control non-transgenic mice were injected with PBS, PTX or CFA only. Stars indicate significant differences from the PBS group only (◇) or all the corresponding control groups (◆), as determined by Wilcoxon tests ($P \leq 0.038$). Sample size: 11-13 (PBS), 5-13 (PTX), 4-8 (CFA), 7-8 (active EAE), 5-8 (passive EAE), 6 (2D2 with EAE) or 5 (2D2 without [w/o] EAE).

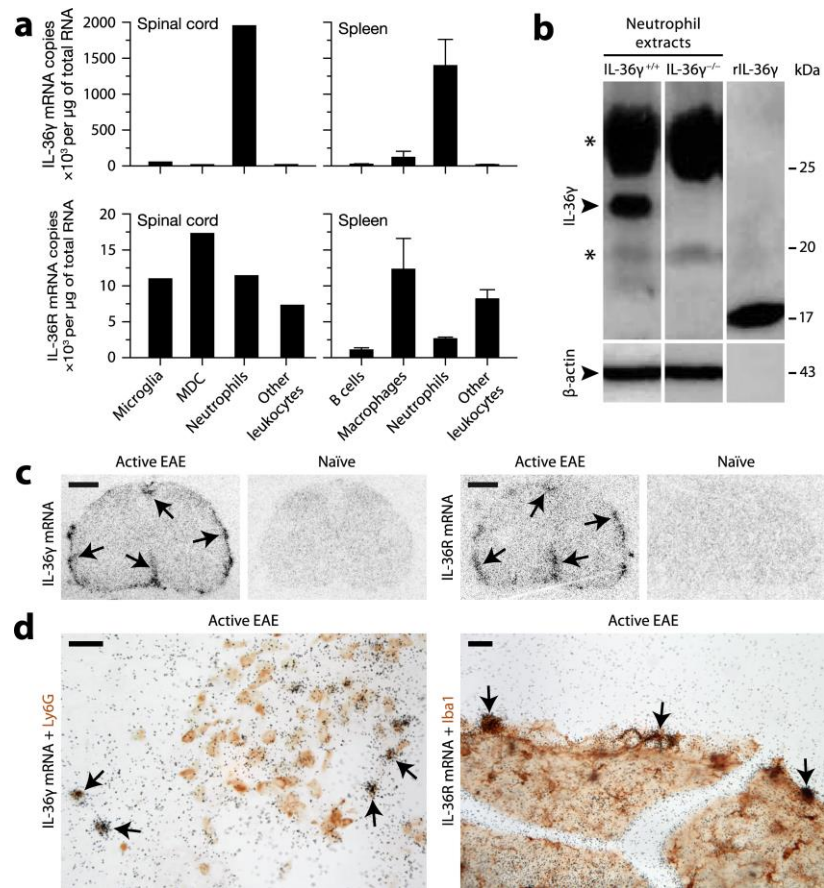


Figure 2-2. IL-36 γ is selectively expressed by neutrophils, while IL-36R is expressed by different leukocytes such as monocytic cells.

a, Quantification of IL-36 γ or IL-36R mRNA by qRT-PCR in different cells purified from the spinal cord or spleen of EAE mice by FACS using the following gating strategies: neutrophils, Ly6G⁺CD11b⁺CD45⁺CD3⁻CD19⁻; microglia, CD11b⁺CD45^{low}Ly6G⁻CD3⁻CD19⁻; monocyte-derived cells (MDC; comprising macrophages and CD11c⁺ dendritic cells), CD11b⁺CD45⁺CD11c^{+/}Ly6G⁻CD3⁻CD19⁻; other intraspinal leukocytes, CD45⁺CD3^{+/}CD19^{+/}CD11b⁻Ly6G⁻CD11c⁻; B cells, CD19⁺CD45⁺CD11b⁻Ly6G⁻CD3⁻; splenic macrophages, CD11b⁺CD45⁺CD11c⁻Ly6G⁻CD3⁻CD19⁻; other splenic leukocytes, CD45⁺CD3^{+/}CD11b^{+/}CD11c^{+/}Ly6G⁻CD19⁻. Sample size: spinal cord, one pooled sample of sorted cells from 4 mice; spleen, 5 non-pooled samples from individual mice.

b, Western blotting showing the full-length form of IL-36 γ (~22 kDa) in splenic neutrophils from a wild-type EAE mouse (IL-36 $\gamma^{+/+}$), but not from an IL-36 γ -deficient EAE mouse (IL-36 $\gamma^{-/-}$). Data are representative of at least 4 mice per group. The recombinant (truncated) form of IL-36 γ was used as a control (right lane). β -actin (lower panels) was used to control for protein loading. Asterisks indicate non-specific bands.

c, Autoradiograms showing in situ hybridization signals (arrows) for IL-36 γ or IL-36R mRNA in the spinal cord of mice killed on day 12 after active EAE induction, but not in naïve mice. Note the submeningeal distribution of the signals (representative of at least 5 mice). Scale bar = 500 μ m.

d, Double labeling for IL-36 γ or IL-36R mRNA (black grains, in situ hybridization) and cell type-specific markers (red-brown, immunohistochemistry) in CNS sections from EAE mice. Arrows show examples of double-labeled cells. Scale bar = 20 μ m.

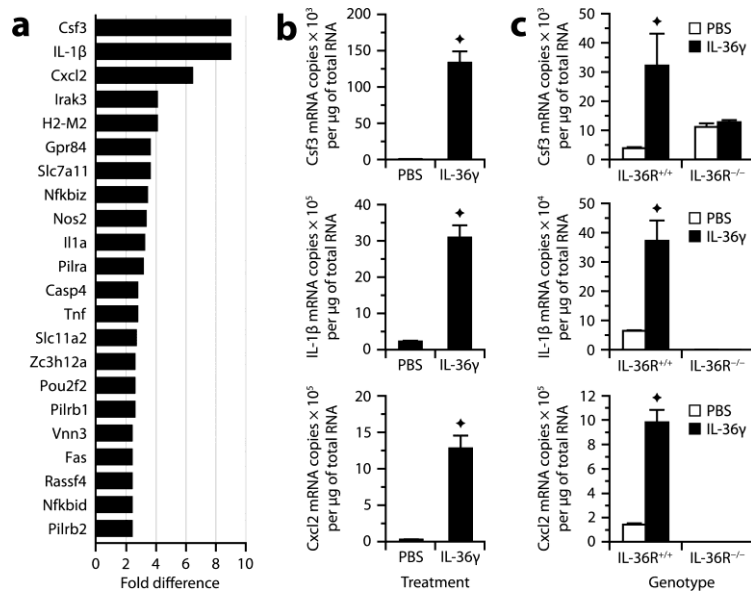


Figure 2-3. IL-36 γ stimulates the expression of inflammatory genes in microglial cultures.

a, Genes that were up-regulated ≥ 2.5 times in BV2 microglia treated for 6 h with recombinant IL-36 γ (100 ng/ml) compared to PBS, as determined using Affymetrix DNA microarrays (Student's t test, $P < 0.04$).

b, c, Quantitative PCR analysis confirming that Csf3, IL-1 β and Cxcl2 mRNAs were upregulated by IL-36 γ in BV2 cells (**b**) and primary microglia from IL-36R^{+/+} mice (**c**) (Wilcoxon test, $P < 0.005$). Note in **c** the absence of upregulation in primary microglia from IL-36R^{-/-} mice, confirming the specificity of the results.

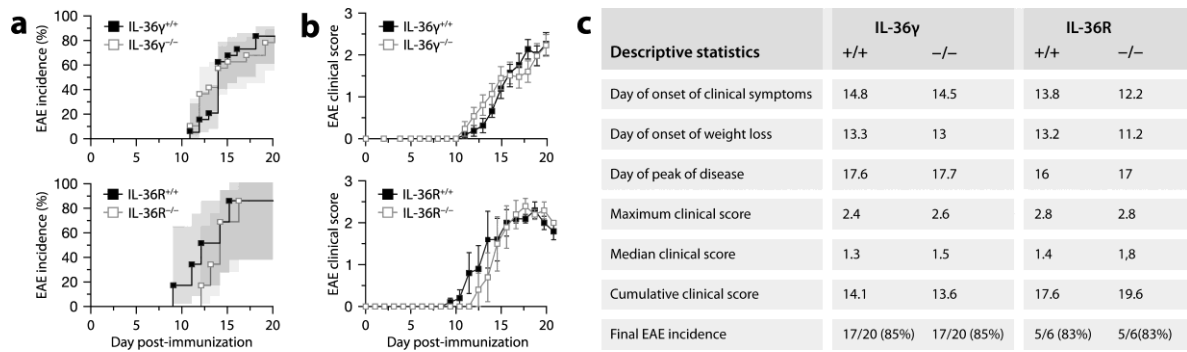


Figure 2-4. Neither IL-36 γ nor IL-36R is required for EAE development.

a, Kaplan-Meier curves showing EAE incidence in mice expressing (black squares) or lacking (white squares) IL-36 γ (upper graph) or IL-36R (bottom graph) after immunization with MOG. The graphs include all the mice tested. No significant intergenotype difference was detected (Wilcoxon tests, $P \geq 0.41$). Sample size: 20 (IL-36 γ ^{+/+}), 20 (IL-36 γ ^{-/-}), 6 (IL-36R^{+/+}) or 6 (IL-36R^{-/-}).

b, EAE severity in mice expressing (black squares) or lacking (white squares) IL-36 γ (upper graph) or IL-36R (bottom graph). The graphs include only mice that had developed clinical signs of EAE at the end of the study (i.e. 21 days). No significant intergenotype difference was detected (Wilcoxon tests, $P \geq 0.12$). Sample size: 17 (IL-36 γ ^{+/+}), 17 (IL-36 γ ^{-/-}), 5 (IL-36R^{+/+}) or 5 (IL-36R^{-/-}).

c, Additional statistics for EAE in mice expressing (+/+) or not (-/-) IL-36 γ or IL-36R. No significant intergenotype difference was detected in any of these parameters (Wilcoxon tests, $P \geq 0.34$). Sample size: 20 (IL-36 γ ^{+/+}), 20 (IL-36 γ ^{-/-}), 6 (IL-36R^{+/+}) or 6 (IL-36R^{-/-}).

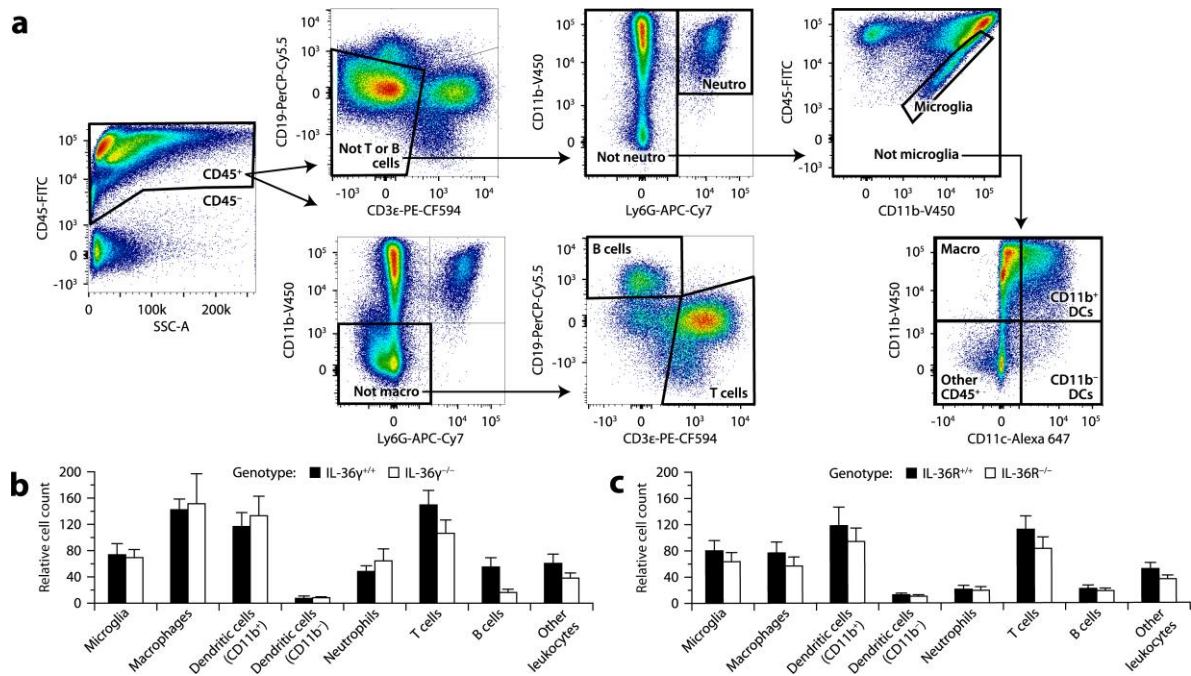


Figure 2-5. No difference in leukocyte recruitment in the spinal cord of EAE mice expressing or not IL-36 γ or IL-36R.

a, Gating strategy used for flow cytometric analysis. Dead cells and doublets were excluded. The data shown are from a representative wild-type EAE mouse.

b, c, Counts of immune cells in the spinal cord of IL-36 γ ^{-/-}, IL-36R^{-/-} or wild-type mice killed 21 days after immunization with MOG peptide. The counts were normalized to CD45⁻ cells used as an internal control. When the cells were collected, the animals had clinical scores ranging from 0.5 to 3. No significant difference was found between the genotypes (Wilcoxon tests, $P \geq 0.07$). Sample size: 6 (b) or 9 (c) mice per group.

2.3.11 Supplementary files

Supplementary Table 2-1. Primers used for genotyping.

Mouse strain	Allele	Forward primer	Reverse primer
2D2	Transgene	5'-cccgggcaaggctcagccatgctcctg-3'	5'-gcggccgcaattcccagagacatccctcc-3'
	Internal control	5'-ctaggccacagaattgaaagatct-3'	5'-gtaggtggaaattctagcatcatcc-3'
IL-36 γ ^{-/-}	Mutated	5'-ggcggattctgagttggag-3'	5'-gcagcgcatcgcttctatc-3'
	Wild-type	5'-ctgggctattgtatcttca-3'	5'-cacacctgctggccaagtc-3'
IL-36R ^{-/-}	Mutated	5'-gccctgaatgaactgcaggacg-3'	5'-cacggtagccaacgctatgtc-3'
	Wild-type	5'-gccgctacaccacaaccag-3'	5'-agtcagtagtcactgccactc-3'

Supplementary Table 2-2. Primers used for qRT-PCR.

mRNA	Forward primer	Reverse primer
Csf3	5'-aagctgtgcaccccgaggag-3'	5'-tggagctggccttaggcactgt-3'
Cxcl2	5'-atgcctgaagaccctgccaag-3'	5'-ggtcagttagccttgcccttg-3'
IL-1 β	5'-tcaaatctcgcagcagcacatc-3'	5'-ccagcaggttatcatcatcatccc-3'
IL-36R	5'-aaggaagtgagtatggaagaaggatc-3'	5'-ggtttgattccttcgtgctg-3'
IL-36 α	5'-ttccagtcactattaccttgctccc-3'	5'-gctccccatcctttgtgcaga-3'
IL-36 β	5'-ggcttcctccacaatcttg-3'	5'-accataccatctgttgagtca-3'
IL-36 γ	5'-caggccctgtgacagttcca-3'	5'-ttagcagcaaagtaggggttcatta-3'

Supplementary Table 2-3. Genes that were up-regulated ≥ 2 times in BV2 microglial cells cultured for 6h with recombinant IL-36 γ (100 ng/ml), as determined using Affymetrix DNA microarrays.

Probe Set ID	Gene Symbol	Gene Description	Hybridization signal				Mean		Fold difference	
			PBS	PBS	IL-36 γ	IL-36 γ	PBS	IL-36 γ	IL-36 γ /PBS	T test (P)
17256129	Csf3	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)	60,9	53,3	541,0	501,4	57,1	521,2	9,1	0,0019
17391565	IL-1 β	Interleukin 1 beta	759,6	705,5	6437,9	6834,3	732,6	6636,1	9,1	0,0011
17438995	Cxcl2	Chemokine (c-x-c motif) ligand 2	73,2	53,3	377,5	442,5	63,3	410,0	6,5	0,0095
17245399	Irak3	Interleukin-1 receptor-associated kinase 3	212,5	206,8	845,3	899,8	209,7	867,5	4,1	0,0012
17344873	H2-M2	Histocompatibility 2, m region locus 2	251,9	249,9	1034,2	1014,5	250,9	1024,3	4,1	0,0002
17322355	Gpr84	G protein-coupled receptor 84	378,0	429,5	1438,4	1655,1	403,8	1546,7	3,8	0,0094
17405082	Slc7a11	Solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, 204,9	198,2	198,2	780,8	741,0	201,6	760,9	3,8	0,0013
17330967	Nfkbiz	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhanc	162,2	195,1	684,3	615,4	178,7	649,8	3,6	0,0065
17253707	Nos2	Nitric oxide synthase 2, inducible	1060,9	965,7	3626,0	3497,8	1013,3	3561,9	3,5	0,0010
17391554	Il1a	Interleukin 1 alpha	2531,2	2520,7	8375,6	8810,6	2526,0	8593,1	3,4	0,0013
17454166	Pilra	Paired immunoglobulin-like type 2 receptor alpha	580,3	599,8	1874,4	2018,9	590,1	1946,6	3,3	0,0029
17514435	Casp4	Caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase	386,8	422,0	1168,2	1183,8	404,4	1176,0	2,9	0,0006
17344309	Tnf	Tumor necrosis factor	1003,0	1004,4	2779,0	3031,8	1003,7	2905,4	2,9	0,0044
17321683	Slc11a2	Solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal	442,1	419,7	1158,0	1216,4	430,9	1187,2	2,8	0,0017
17429933	Zc3h12a	Zinc finger ccch type containing 12a	222,1	261,7	686,3	637,4	241,9	661,9	2,7	0,0056
17487855	Pou2f2	Pou domain, class 2, transcription factor 2	122,5	130,2	387,2	300,3	126,4	343,7	2,7	0,0380
17454179	Pilrb1	Paired immunoglobulin-like type 2 receptor beta 1	339,2	396,3	1027,4	927,9	367,8	977,7	2,7	0,0087
17232152	Vnn3	Vanin 3	98,7	98,7	268,0	232,1	98,7	250,0	2,5	0,0138
17358797	Fas	Fas (tnf receptor superfamily member 6)	52,3	52,7	148,6	115,6	52,5	132,1	2,5	0,0404
17470060	Rassf4	Ras association (ralgds/af6) domain family member 4	446,3	434,9	1108,0	1073,5	440,6	1090,8	2,5	0,0008
17476372	Nfkbid	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhanc	443,9	464,9	1111,3	1128,5	454,4	1119,9	2,5	0,0004
17454187	Pilrb2	Paired immunoglobulin-like type 2 receptor beta 2	72,9	56,3	150,2	166,8	64,6	158,5	2,5	0,0153
17432674	Tnfrsf1b	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1	1799,9	1801,9	4489,3	4215,5	1800,9	4352,4	2,4	0,0029
17481556	Ppfbp2	Ptprf interacting protein, binding protein 2 (liprin beta 2	75,8	86,6	210,9	180,7	81,2	195,8	2,4	0,0190
17302475	Irg1	Immunoresponsive gene 1	3196,1	2996,0	7496,1	7238,8	3091,1	7367,5	2,4	0,0015
17218060	Ptgs2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	1862,7	2013,7	4551,6	4483,1	1938,2	4517,4	2,3	0,0010
17406279	Tlr2	Toll-like receptor 2	202,3	198,5	465,2	465,8	200,4	465,5	2,3	0,0001
17470627	Clec4e	C-type lectin domain family 4, member e	1068,3	1082,4	2436,3	2519,0	1075,4	2477,6	2,3	0,0009
17508523	Rab11fip1	Rab11 family interacting protein 1 (class i)	183,0	181,7	420,1	418,3	182,4	419,2	2,3	0,0000
17459196	Tnfp3	Tnfaip3 interacting protein 3	1451,5	1317,5	3090,0	3274,1	1384,5	3182,1	2,3	0,0040
17281219	Nfkbia	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhanc	639,1	618,4	1485,1	1396,0	628,8	1440,6	2,3	0,0032
17254047	Ccl7	Chemokine (c-c motif) ligand 7	1613,9	1672,5	3742,5	3739,8	1643,2	3741,2	2,3	0,0002
17266157	Cpd	Carboxypeptidase d	890,1	956,8	2048,9	2087,2	923,5	2068,1	2,2	0,0011
17512809	Hp	Haptoglobin	278,3	280,8	604,0	628,6	279,6	616,3	2,2	0,0013
17254166	Slfn2	Schlafen 2	496,6	534,3	1114,8	1110,9	515,5	1112,9	2,2	0,0010
17309981	Fyb	Fyn binding protein	540,2	532,6	1128,9	1172,2	536,4	1150,5	2,1	0,0013
17548123	Ehd1 // Ehd1	Eh-domain containing 1 // eh-domain containing 1	63,3	61,8	129,6	124,6	62,6	127,1	2,0	0,0016
17226771	Ikbbk	Inhibitor of kappab kinase epsilon	453,0	495,5	983,3	934,8	474,3	959,1	2,0	0,0044
17262855	Tnfp1	Tnfaip3 interacting protein 1	651,0	662,6	1336,4	1317,5	656,8	1326,9	2,0	0,0003
17410542	Nfkb1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhanc	683,1	717,3	1425,9	1399,4	700,2	1412,7	2,0	0,0009

Chapitre 3: La déficience en GPR84 réduit la microgliose, mais accélère la dégénération dendritique et le déclin cognitif dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer

3.1 Notes introductives et contributions

L'objectif de ce projet de recherche était d'évaluer le rôle du GPR84 dans le développement de la MA. Je suis deuxième auteure de cette étude qui a été publiée dans le journal *Brain, Behaviour and Immunity* et peut être retrouvée sous le lien suivant: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889159115000136>.

La conceptualisation et la demande de financement du projet ont été effectuées par Dr Luc Vallières. Ce projet a été initié avant mon arrivée au laboratoire par Dre Julie Audoy-Rémus. Elle s'est chargée du sacrifice, de la perfusion et de la coupe des cerveaux, ainsi que des résultats des Figures 3-1a-d, f-h, 3-3, 3-4. Dr Mohammed Filali a effectué tous les tests de comportement des souris (Figure 3-2). Dre Marie-Eve Tremblay et Cynthia Lecours ont fourni les résultats de microscopie électronique (Figure 3-5). De mon côté, j'ai produit les résultats des Figures 3-1e, 3-6. La rédaction du manuscrit, l'analyse statistique et la création des figures ont été exécutées par Dre Julie Audoy-Rémus et moi-même. Dr Luc Vallières a par la suite corrigé et amélioré le manuscrit.

3.2 Résumé

Dans les cerveaux des patients atteints de la MA, la microglie entoure les plaques d'A β , cependant son rôle reste encore controversé. Sous conditions inflammatoires, la microglie peut exprimer GPR84, un récepteur orphelin dont l'importance pathophysiologique reste inconnue. Dans cette étude, on rapporte que GPR84 est surexprimé par la microglie des souris transgéniques APP/PS1, un modèle de la MA. Les souris APP/PS1 déficientes en GPR84 démontrent un déclin cognitif accéléré ainsi qu'un nombre réduit de microglie, surtout autour des plaques d'A β . L'absence de GPR84 n'affecte pas la formation de ces plaques ni la neurogenèse hippocampale, mais facilite la dégénération dendritique. De plus, GPR84 n'influence pas la progression clinique d'autres maladies dans lesquelles son expression a été rapportée, i.e., l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) et l'endotoxémie. On conclut que le GPR84 joue un rôle bénéfique dans la pathologie d'amyloïde- β en régulant le recrutement de la microglie, une réponse affectant la dégénération dendritique et essentielle pour la prévention du déclin cognitif.

3.3 GPR84 deficiency reduces microgliosis, but accelerates dendritic degeneration and cognitive decline in a mouse model of Alzheimer's disease

Julie Audoy-Rémus¹, Lusine Bozoyan¹, Aline Dumas¹, Mohammed Filali¹, Cynthia Lecours¹, Steve Lacroix^{1,2}, Serge Rivest^{1,2}, Marie-Eve Tremblay^{1,2} & Luc Vallières^{1,2}

¹Axis of Neuroscience, University Hospital Center of Quebec, Quebec, QC, Canada;

²Department of Molecular Medicine, Laval University, Quebec, QC, Canada

2705 Laurier Boulevard, Quebec, QC, Canada, G1V 4G2

3.4 Abstract

Microglia surround the amyloid plaques that form in the brains of patients with Alzheimer's disease (AD), but their role is controversial. Under inflammatory conditions, these cells can express GPR84, an orphan receptor whose pathophysiological role is unknown. Here, we report that GPR84 is upregulated in microglia of APP/PS1 transgenic mice, a model of AD. Without GPR84, these mice display both accelerated cognitive decline and a reduced number of microglia, especially in areas surrounding plaques. The lack of GPR84 affects neither plaque formation nor hippocampal neurogenesis, but promotes dendritic degeneration. Furthermore, GPR84 does not influence the clinical progression of other diseases in which its expression has been reported, *i.e.*, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) and endotoxic shock. We conclude that GPR84 plays a beneficial role in amyloid pathology by acting as a sensor for a yet unknown ligand that promotes microglia recruitment, a response affecting dendritic degeneration and required to prevent further cognitive decline.

3.5 Introduction

The amyloid cascade hypothesis states that altered processing of amyloid precursor protein lead to the release of β -amyloid peptides (e.g., A β 42), which initiate the pathological process underlying AD (Tanzi and Bertram, 2005). These peptides can aggregate into soluble oligomers and then into insoluble fibrils that accumulate to form macroscopic amyloid plaques. Whether all of these forms are toxic and how they cause toxicity are questions that are still debated. A prevailing view is that the oligomers, more toxic than the fibrils, bind to and alter the function of certain membrane proteins, resulting in synaptic dysfunction, dendritic degeneration and neuronal death (Benilova et al., 2012).

Any brain damage, including that caused by β -amyloid, triggers activation of microglia, the resident immune cells of the CNS. These cells cluster around amyloid plaques, in which they extend cytoplasmic processes (Combs, 2009). The significance of this response is controversial, but one possibility is that microglia exert an overall beneficial effect, as suggested by behavioral studies showing that microglia depletion or genetic deletions affecting microglia accelerate cognitive decline in a model of AD (i.e., the APP/PS1 transgenic mouse) (Simard et al., 2006; Naert and Rivest, 2011; Song et al., 2011). However, this effect does not seem to be related to the ability of microglia to eliminate parenchymal amyloid plaques, as the latter were not affected (Grathwohl et al., 2009; Mildner et al., 2011) or only modestly (Simard et al., 2006; Tahara et al., 2006; Naert and Rivest, 2011; Song et al., 2011) in the above paradigms. An opposite possibility is that chronically activated microglia exert deleterious effects, for example, by phagocytosing neuronal elements and producing potentially neurotoxic molecules such as TNF (Tan et al., 1999; Tan et al., 2002; Fuhrmann et al., 2010; Lee et al., 2010; Weitz and Town, 2012). Further studies on the molecular mediators responsible for such effects are required to clarify the seemingly dichotomous roles of microglia in AD.

Activated microglia express GPR84, a seven-transmembrane domain receptor of the rhodopsin superfamily that shows limited similarity to other known receptors (Fredriksson et al., 2003; Foord et al., 2005). In the CNS, GPR84 expression is restricted to microglia and observed in different pathological conditions, including EAE, endotoxemia, cuprizone-induced demyelination and axotomy (Bedard et al., 2007; Bouchard et al., 2007; Gamo et al., 2008). In the periphery, GPR84 is mainly expressed by cells of the myeloid lineage, such as monocytes, macrophages and neutrophils (Yousefi et al., 2001; Wang et al., 2006; Suzuki et al., 2013). *In vitro* studies have revealed that GPR84 signals through a G_{i/o} pathway in response to hydroxylated (and to a lesser extent nonhydroxylated) medium-chain free fatty acids (FFAs) of 9 to 14 carbons in length (Wang et al., 2006; Suzuki et al., 2013). These can induce chemotaxis and amplify lipopolysaccharide (LPS)-induced cytokine production in myeloid cells (Wang et al., 2006; Suzuki et al., 2013). Nevertheless, the pathophysiological role of GPR84 and the nature of its endogenous ligand(s) remain unknown.

The goals of the present study were to: 1) examine the expression of GPR84 in APP/PS1 mice; and 2) determine its importance in this model and two others in which GPR84 expression has been reported, i.e., EAE and endotoxic shock (Bouchard et al., 2007). Our results reveal that GPR84 exerts no significant effect on the progression of the latter two diseases, but promotes microgliosis and dendritic homeostasis in APP/PS1 mice. Therefore, this study ascribes for the first time a role to GPR84 *in vivo*.

3.6 Materials and Methods

3.6.1 Animals

GPR84-deficient mice were obtained from DeltaOne (Deltagen) and bred with C57BL/6J mice (Jackson Laboratory) for at least 5 generations. These mice are reported to be indistinguishable from wild-type littermates under normal conditions (Venkataraman and Kuo, 2005). APP/PS1 transgenic mice (Borchelt et al., 1997b) (Jackson Laboratory, B6C3-Tg(APP695)3Dbo Tg(PSEN1)5Dbo/J) expressing a chimeric amyloid precursor protein (APPSwe) and human presenilin 1 (A246E variant) under the control of the mouse prion protein promoter were bred with GPR84-deficient mice for at least 3 generations. The genotypes were confirmed by PCR as recommended by the providers (primers used: GPR84, 5'-acagctcagatgccaaacttctcctg-3', 5'-tcctagagcaatgagacagagggtg-3' and 5'-gacgagttctctgaggggatcgatc-3'; APP, 5'-gactgaccactcgaccaggttctg-3' and 5'-cttgaagttggattctcatatccg-3'; PS1, 5'-aatagagaacggcaggagca-3' and 5'-gccatgagggcactaatcat-3'). The experiments were performed with the approval of our institutional animal ethics committee. Sex-matched and age-matched wild-type littermates were used as controls. EAE and LPS-treated mice were 2 months of age, whereas APP/PS1 mice were tested at 2-12 months of age.

3.6.2 EAE induction and clinical evaluation

Mice were subcutaneously injected into both flanks with a total of 200 μ l of emulsion containing 300 μ g of myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) peptide 35-55 (AnaSpec) dissolved in saline and mixed with an equal volume of complete Freund's adjuvant containing 500 μ g of killed *Mycobacterium tuberculosis* H37 RA (Difco Laboratories). The mice were also injected intraperitoneally with 20 μ g/kg of pertussis toxin (List Biological Laboratories) immediately and 2 days after immunization. The clinical signs of EAE were scored daily using the following scale: 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, dead or sacrificed for humane reasons.

3.6.3 LPS treatment and sickness behavior assessment

LPS from *Escherichia coli* O55:B5 (Sigma-Aldrich) was dissolved in pyrogen-free saline and injected intraperitoneally at a dose of 1 mg/kg. At the indicated time points, the mice were placed in the stem of a T-maze made of clear Plexiglas (stem: 64 × 12 cm; arms: 30 × 12 cm; height of the walls: 16 cm) and divided into thirteen segments (10 × 10 cm). The locomotor activity of the mice was evaluated by counting the number of rearings and segments crossed during a 4-min session. A segment was counted when crossed by the whole body, excluding the tail. The T-maze was cleaned after each session.

3.6.4 Cognitive analysis

The cognitive performance of APP/PS1 mice was evaluated in a T-maze (see specifications above) filled with water (23 ± 1°C) at a height of 12 cm and containing a platform (11 × 11 cm) submerged 1 cm beneath the surface at the end of one or both arms (Filali and Lalonde, 2009). A trial consisted of placing the mouse in the stem of the maze and allowing it to swim toward the left or right arm until it find a platform. If the platform was not found after 60 sec, the mouse was gently guided toward it. The mouse was allowed to rest for 20 sec on the platform after each trial and for 10 min in its cage after each 10-trial block. During the acquisition phase, 2 training trials were performed with a platform placed in both arms, and then a maximum of 48 additional trials were performed without the platform chosen during the second training trial. The acquisition phase was considered completed when the mouse passed the criterion of 5 consecutive errorless trials (correct turn and platform found within 60 sec). Two days later, the reversal phase was conducted using the same protocol, except that the platform was moved to the opposite arm and that there was no training. The number of trials-to-criterion and the time to reach the platform (escape time) were recorded.

3.6.5 Immunostaining

Immunohistochemistry was performed using rabbit anti-Iba1 (1:2000, Wako Chemicals), goat anti-doublecortin (DCX) (1:500, Santa Cruz Biotechnology) and rabbit anti-Ki67 (1:500, Abcam) antibodies, as described previously (Audoy-Remus et al., 2008).

3.6.6 *In situ* hybridization

Brain sections were analyzed for GPR84 mRNA by radioisotopic *in situ* hybridization as described previously (Bouchard et al., 2007).

3.6.7 Congo red staining

Free-floating sections were stained for 30 min in 0.5% Congo red diluted in 50% ethanol and differentiated (5-10 dips) in 0.01% NaOH diluted in 50% ethanol.

3.6.8 Stereological analyses

Systematically sampled sections (every 10th section) were examined in a blinded fashion using a Stereo Investigator system (Microbrightfield) coupled to a Nikon E800 microscope. To estimate the density of GPR84 mRNA⁺ cells (*in situ* hybridization) and immunostained cells (Iba1, DCX), we used the fractionator or optical fractionator method, respectively. The areas of interest were traced and then sampled using the following counting parameters: distance between counting frames, 200 × 200 μm (GPR84 mRNA⁺ and DCX⁺ cells) or 600 × 600 μm (Iba⁺ cells); frame size, 600 × 600 μm (GPR84 mRNA⁺ cells), 50 × 50 μm (DCX⁺ cells) or 100 × 100 μm (Iba⁺ cells); frame and guard zone thickness (optical fractionator only), 10 μm and ≥ 2 μm, respectively. Cells were counted if their body was at least partially located within the counting frame and did not touch the exclusion lines. Total count was converted into cell density taking into account the counting parameters and section thickness. In one analysis, Iba1⁺ cells were counted only if the cell body contacted an amyloid plaque. Given its small size, the population of Ki67⁺ cells was estimated using a modified approach in which all the profiles were counted within the traced areas without using counting frames. The size of Congo red⁺ plaques was estimated according the Cavalieri method. Using a 20× Plan Apochromat objective, a point grid of 10 × 10 μm was overlaid on each section, and the points that fell within the region of interest were counted. The counts were converted to area estimates taking into account sampling frequency, magnification, grid size, and section thickness. Plaques counts were expressed as number per mm².

3.6.9 Electron microscopy

Mice were anesthetized and perfused with PBS, followed by 3.5% acrolein (75 ml) and then 4% paraformaldehyde (150 ml) in 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4). The brains were postfixed in 4% paraformaldehyde for 1-2 h at 4°C and cut at 50 μm thickness in PBS using a vibratome. Sections containing the ventral part of the hippocampus or the prefrontal cortex were postfixed in 1% osmium tetroxide, dehydrated in ethanol and propylene oxide, embedded in Durcupan (Electron Microscopy Sciences) overnight at room temperature and laminated between ACLAR films (Electron Microscopy Sciences) by heating at 55°C for 48-72 hours. Areas of the CA1 region, approximately from Bregma -3.07 to -3.51 mm according to the Paxinos and Franklin's atlas (Paxinos and Franklin, 2012), or of the prefrontal cortex, approximately from Bregma

+2.93 to +2.45 mm, were excised from the films to prepare ultrathin sections (65-80 nm). The latter were examined using a Tecnai G2 Spirit BioTwin electron microscope (FEI) equipped with an Orca digital camera (Hamamatsu). An average of 9 sections (~60 nm thick) containing the CA1 pyramidal, radiatum and lacunosum-moleculare layers were examined per mouse. Pyramidal cell bodies showing signs of oxidative stress were observed, accompanied by degeneration of their dendrites in the radiatum and lacunosum-moleculare layers. For quantitative analysis, series of images were randomly taken at the level of the radiatum, excluding dystrophic tissue with amyloid deposition, at magnifications between 1900 and 4800 \times to obtain a total surface of >10000 μm^2 per mouse. Profiles of degenerating dendrites were counted and the results were expressed as number per area. These profiles were identified using a combination of established criteria for dendrites (*e.g.*, the presence of synaptic contacts and protuberances such as spines, filopodia and small branches (Peters et al., 1991)) and degenerating cellular elements (*e.g.*, condensed cytoplasm, plasma membrane ruffling, mitochondrial alteration and endoplasmic reticulum dilation (Tremblay et al., 2012)). In addition, approximately 9 sections containing the prefrontal cortex deep layers were examined in the same manner for the purpose of qualitative analysis.

3.6.10 Protein extraction

Hemi-forebrains were collected from saline-perfused mice as described previously (Lesne et al., 2006). Briefly, each was mechanically homogenized by 10 passages through a 20-gauge needle with 500 μl of buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 0.01% NP-40, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.1% SDS, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 \times protease inhibitor cocktail (Sigma)). After centrifugation of the homogenate at 3 000 rpm for 5 min, the supernatant (soluble, extracellular protein-enriched fraction) was collected and stored at -80°C until analysis.

3.6.11 Western blotting

Protein samples (30 μg) were electrophoretically separated in precast 10-20% Tris-Tricine polyacrylamide gels (Bio-Rad Laboratories) and transferred to polyvinylidene difluoride membranes (PerkinElmer). The latter were boiled for 10 min in PBS, blocked in Tris-buffered saline containing 0.05% Tween 20 and 5% skim milk, and incubated in the same buffer supplemented with anti-A β 42 antibody (clone 6E10, 1/1000, Covance). The membranes were stained using a horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (1:1000, Jackson ImmunoResearch) and the Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus kit (PerkinElmer). Membranes were stripped in 25 mM glycine-HCl (pH 2.0) containing 1% SDS and stained for β -actin using a mouse anti- β -actin antibody (MAB1501; 1:5000; Millipore). The integrated density of the bands corresponding

to A β 42 monomers was measured using a gel imaging system (scanner Agfa Arcus II; NIH ImageJ software, version 1.44o), subtracted from background and normalized to β -actin.

3.6.12 Statistical analyses

Data are expressed as mean \pm SE and were compared using one-way or two-way ANOVA (with or without repeated measures) and *post hoc* unpaired *t* tests or Wilcoxon rank-sum tests. Survival curves were analyzed using the log-rank test. All these tests used an alpha of 0.05 and were done with JMP software (SAS Institute).

3.7 Results

3.7.1 GPR84 is upregulated in microglia of APP/PS1 mice

We have reported that GPR84 is upregulated in microglia under the control of TNF and IL-1 β and during different pathological conditions such as EAE and endotoxemia (Bedard et al., 2007; Bouchard et al., 2007). To test our assumption that GPR84 would also be expressed in a neurodegenerative context, we analyzed, by *in situ* hybridization, brain sections from APP/PS1 transgenic mice killed at different ages. This technique was used because reliable immunostaining for GPR84 could not be achieved using commercially available antibodies. Virtually no hybridization signal for GPR84 mRNA was detected in wild-type mice (data not shown) and in APP/PS1 mice aged 2 or 3 months (**Fig. 3-1a**). In contrast, strong signals were observed in the hippocampus and cerebral cortex of older transgenic mice, and the number of positive cells increased with age (**Fig. 3-1b-e**). To confirm the identity of these cells, adjacent sections were double labeled for GPR84 mRNA and the microglia-specific marker Iba1 by combined *in situ* hybridization and immunohistochemistry followed or not by Congo red staining. We observed that the hybridization signals colocalized with Iba1 (**Fig. 3-1f**) and were generally distributed around or near Congo red⁺ amyloid plaques (**Fig. 3-1g**). Overall, these results indicate that microglia overexpress GPR84 chronically in response to β -amyloid.

3.7.2 GPR84 influences the clinical outcome in APP/PS1 mice, but not in mice suffering from EAE or endotoxic shock

To assess the importance of GPR84 in neuroimmune processes, we evaluated the behavioral effects of a targeted deletion of the GPR84 gene in mice: 1) subjected to EAE by immunization with a MOG peptide; 2) exposed to bacterial LPS; or 3) harboring the APP and PS1 transgenes. While no intergroup difference was

observed in the severity of EAE (**Fig. 3-2a**) and LPS-induced sickness behavior (**Fig. 3-2b**), a greater decline in cognitive performance was observed in APP/PS1 mice lacking GPR84 compared to APP/PS1 mice expressing GPR84 (**Fig. 3-2c**). Indeed, the decline was detectable earlier (i.e., at 4 months) and was more severe at least until the age of 8 months. Thereafter, the decline reached a plateau so that there was no difference anymore after a year. These results were neither attributable to a cognitive problem resulting exclusively from the GPR84 deletion, because the cognitive performance of GPR84-knockout mice lacking the APP and PS1 transgenes was comparable to that of wild-type mice, nor were they attributable to a swimming-related problem, because all of the mice manifested a similar swimming capacity and motivation to escape from the water during training sessions (data not shown). Therefore, we conclude that GPR84 is beneficial in a context of β -amyloid-induced toxicity, but has no apparent clinical impact in the context of EAE and LPS-induced sickness behavior.

3.7.3 GPR84 promotes the accumulation of microglia around amyloid plaques

Microgliosis is a typical response to neurodegenerative diseases and has been well documented in mouse models of AD (Combs, 2009). As previously reported in APP/PS1 mice and shown in **Figure 3-3a**, microglia are recruited to surround amyloid plaques and extend cytoplasmic processes toward them. To determine whether GPR84 plays a role in such recruitment, we estimated the number of ramified microglia immunostained for Iba1 in the cerebral cortex and hippocampus of APP/PS1 mice deficient or not in GPR84 using a stereological counting technique. We found reductions ranging from 16 to 32% in the number of microglia that contacted amyloid plaques in APP/PS1 mice lacking GPR84 at all ages analyzed (from 4 to 12 months) (**Fig. 3-3b**). There was also a small downward trend in the total number of microglia in the cortex and hippocampus, reaching statistical significance at some ages (**Fig. 3-3c**). No major difference in microglial morphology was observed between the groups. These results suggest that GPR84 contributes to the recruitment of microglia around amyloid plaques in the brain of APP/PS1 mice.

3.7.4 GPR84 does not affect β -amyloid deposition and accumulation

β -amyloid is responsible for the cognitive decline observed in APP/PS1 mice (Borchelt et al., 1997a). A predominant species is A β 42, which can aggregate to form insoluble amyloid deposits in the extracellular compartment (Burdick et al., 1992; Jarrett et al., 1993). To determine whether GPR84 influences β -amyloid deposition, we used stereological methods to estimate the number and size of amyloid plaques stained with Congo red in the cortex and hippocampus of APP/PS1 mice aged 4 to 12 months and expressing or not

GPR84. As shown in **Fig. 3-4a-c**, we observed age-related changes in both of these parameters, but no genotype-related change. To further examine whether GPR84 affects the accumulation of A β 42, which may also be toxic under non-aggregated forms, we estimated the amount of A β 42 monomers by Western blotting in extracellular protein-enriched fractions from the forebrain. Again, the results increased with age, but did not differ with genotype (**Fig. 3-4d-e**). Therefore, GPR84 does not seem to influence the metabolism of β -amyloid.

3.7.5 The lack of GPR84 increases β -amyloid-induced dendritic degeneration

It is known that β -amyloid induces dendritic degeneration in APP/PS1 mice (Tsai et al., 2004; Dikranian et al., 2012) and AD brains (Masliah et al., 1994; Scheff et al., 2007), but whether microglia exert a protective or deleterious role in this phenomenon is still a matter of speculation (Siskova and Tremblay, 2013). To assess whether microglial GPR84 influences dendritic degeneration, we examined the hippocampal CA1 stratum radiatum of 6 month-old APP/PS1 mice expressing or not GPR84 using electron microscopy. This dendritic layer was chosen because of its involvement in spatial learning tasks (Tsien et al., 1996), such as the water T-maze, and because it is the site of synaptic changes that have been well documented in mouse models of AD (Spires and Hyman, 2004; Spires-Jones and Knaflo, 2012). In addition, it has recently been reported that dendritic degeneration in this region is associated with hyperexcitability and neuronal circuit dysfunction in APP/PS1 mice (Siskova et al., 2014). As expected, we observed many degenerating dendrites in our APP/PS1 mice (**Fig. 3-5a-f**), but not in aged-matched wild-type controls. Proximal to distal dendrites showed typical features of degeneration, including a condensed, electron-dense cytoplasm, frequent ruffling of the plasma membrane, dilation of the endoplasmic reticulum and mitochondrial dysfunction, as previously described during normal aging and β -amyloid deposition (Oster-Granite et al., 1996; Tremblay et al., 2012). Similar degenerating elements were observed in the CA1 stratum lacunosum-moleculare, which contains the distal dendritic trees of the same pyramidal cells, and in the deep layers of the prefrontal cortex (not shown). Quantitative analysis at the level of the stratum radiatum revealed a 2.5-fold increase in the number of degenerating dendritic profiles in APP/PS1 mice lacking GPR84 compared to APP/PS1 mice expressing this gene (**Fig. 3-5c**). This result indicates that the absence of GPR84 in microglia compromises the integrity of neuronal circuits in APP/PS1 mice.

3.7.6 The lack of GPR84 does not affect adult hippocampal neurogenesis

Neurogenesis in the adult hippocampal dentate gyrus plays a role in spatial learning (Zhang et al., 2008; Clelland et al., 2009; Deng et al., 2010; Arruda-Carvalho et al., 2011) and is affected by inflammation (Vallieres

et al., 2002; Ekdahl et al., 2003; Monje et al., 2003; Belarbi and Rosi, 2013) and transgenic expression of APP/PS1 (Verret et al., 2007; Demars et al., 2010). To rule out the possibility that the cognitive deficit driven by the loss of GPR84 in APP/PS1 mice is due to impaired neurogenesis, we examined the proliferation and differentiation of neural progenitors in the granular layer of the dentate gyrus in APP/PS1 mice expressing or not GPR84. While a decrease in the number of cells expressing the proliferation marker Ki67 or the neuroblast marker DCX was observed with age, no intergenotype difference was detected (**Fig. 3-6**). Therefore, the poorer cognitive performance resulting from the absence of GPR84 in the APP/PS1 background is not attributable to a defect in adult hippocampal neurogenesis.

3.8 Discussion

Two main findings emerge from the present work. First, microglia increase their expression of GPR84 not only upon EAE, endotoxemia and nerve injury, as previously reported (Bedard et al., 2007; Bouchard et al., 2007; Gamo et al., 2008), but also in a neurodegenerative context. GPR84 can therefore be considered as a general “activation” marker for microglia. Second, GPR84 contributes to β -amyloid-induced microgliosis, a response that is required to promote dendritic homeostasis and prevent further cognitive decline. As discussed below, these findings help to understand the role of GPR84 *in vivo* and the importance of microglia in AD.

One question that arises is how microglia protect from β -amyloid toxicity? Our results indicate that GPR84 influences neither the formation or elimination of β -amyloid plaques, nor the concentration of soluble A β 42, one of the most abundant and toxic form of β -amyloid. This is in agreement with previous studies showing that microglia do not affect the plaques (Grathwohl et al., 2009; Mildner et al., 2011) or at best modestly (Simard et al., 2006; Tahara et al., 2006; Naert and Rivest, 2011; Song et al., 2011). Furthermore, our results reveal a higher number of degenerating dendrites in the absence of GPR84, leading us to infer that a microglial response regulated by GPR84 is required to protect dendrites from further degeneration. Alternatively, it is possible that the absence of GPR84 reduces the ability of microglia to remove degenerating dendrites, which may affect neuronal plasticity and thus cognition. The importance of microglia in neuronal plasticity is increasingly appreciated (Tremblay and Majewska, 2011; Tremblay et al., 2011; Blank and Prinz, 2013; Wake et al., 2013), but further work is needed to elucidate the mechanism by which they influence AD progression.

Another important question is what ligand(s) bind to GPR84 *in vivo*? Previous studies have identified medium-chain FFAs of 9 to 14 carbons in length and two other organic molecules (6-n-octylaminouracil and 3,3'-diindolylmethane) as agonists of GPR84 *in vitro* (Wang et al., 2006; Suzuki et al., 2013). The hydroxylated forms of these FFAs were found to be more effective than the nonhydroxylated ones (Suzuki et al., 2013).

Derived from the diet or the hydrolysis of triglycerides, FFAs serve as an energy source. They can also be hydroxylated and incorporated into sphingolipids (Hama, 2010). The latter are especially abundant in the nervous system, in which they represent a major component of myelin (Dupree and Pomicter, 2010). Sphingolipids play not only a structural role, but also contribute to cell signaling and adhesion (Hannun and Obeid, 2008). As lipid dysregulation is an important feature of AD (Benilova et al., 2012; Walter and van Echten-Deckert, 2013), it is tempting to speculate that FFA metabolites, generated in response to β -amyloid, could act as danger signals. GPR84 could play a central role in the ability of microglia to perceive these signals and trigger an appropriate response (e.g., chemotaxis, as supported by Suzuki et al., 2013). This is likely as there are many examples of lipid molecules that bind to G-protein-coupled receptors on immune cells, including other fatty acids, arachidonic acid metabolites and lysophospholipids (Kostenis, 2004). Further work will be required to identify the endogenous GPR84 ligands and go beyond speculation.

In conclusion, this study: 1) identifies for the first time a pathophysiological role of GPR84; 2) provides an *in vivo* model in which to search for endogenous GPR84 ligands; and 3) supports the concept that microglia exert a modest, but beneficial effect in AD. Future studies on GPR84 may help to clarify the link between lipid dysregulation and neuroinflammation in AD.

3.9 Conflict of interest

No conflict of interest is declared by the authors.

3.10 Acknowledgments

This work was supported by grants from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR), the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and the Multiple Sclerosis Society of Canada. LV and SL received *Chercheur-Boursier Sénior* awards from the *Fonds de recherche du Québec – Santé*. JAR was supported by a CIHR Strategic Training Program Grant in genomics. LB received a Merit Scholarship from the *Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies*. MET was funded by the Banting Research Foundation and the Scottish Rite Charitable Foundation of Canada. We thank Pierrot Tremblay, Julie Pagé and Martin Parent for technical assistance.

3.11 References

- Arruda-Carvalho, M., Sakaguchi, M., Akers, K.G., Josselyn, S.A., Frankland, P.W., 2011. Posttraining ablation of adult-generated neurons degrades previously acquired memories. *J. Neurosci.* 31, 15113–15127.
- Audoy-Remus, J., Richard, J.F., 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.
- Bedard, A., Tremblay, P., Chernomoretz, A., Vallieres, L., 2007. Identification of genes preferentially expressed by microglia and upregulated during cuprizone-induced inflammation. *Glia* 55, 777–789.
- Belarbi, K., Rosi, S., 2013. Modulation of adult-born neurons in the inflamed hippocampus. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 145.
- Benilova, I., Karran, E., De Strooper, B., 2012. The toxic Abeta oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat. Neurosci.* 15, 349–357.
- Blank, T., Prinz, M., 2013. Microglia as modulators of cognition and neuropsychiatric disorders. *Glia* 61, 62–70.
- Borchelt, D.R., Ratovitski, T., van Lare, J., Lee, M.K., Gonzales, V., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Price, D.L., Sisodia, S.S., 1997a. Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron* 19, 939–945.
- Borchelt, D.R., Ratovitski, T., van Lare, J., Lee, M.K., Gonzales, V., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Price, D.L., Sisodia, S.S., 1997b. Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron* 19, 939–945.
- Bouchard, C., Page, J., Bedard, A., Tremblay, P., Vallieres, L., 2007. G protein-coupled receptor 84, a microglia-associated protein expressed in neuroinflammatory conditions. *Glia* 55, 790–800.
- Burdick, D., Soreghan, B., Kwon, M., Kosmoski, J., Knauer, M., Henschen, A., Yates, J., Cotman, C., Glabe, C., 1992. Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs. *J. Biol. Chem.* 267, 546–554.
- Clelland, C.D., Choi, M., Romberg, C., Clemenson, G.D.J., Fagniere, A., Tyers, P., Jessberger, S., Saksida, L.M., Barker, R.A., Gage, F.H., Bussey, T.J., 2009. A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science* 325, 210–213.
- Combs, C.K., 2009. Inflammation and microglia actions in Alzheimer's disease. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 4, 380–388.
- Demars, M., Hu, Y.S., Gadadhar, A., Lazarov, O., 2010. Impaired neurogenesis is an early event in the etiology of familial Alzheimer's disease in transgenic mice. *J. Neurosci. Res.* 88, 2103–2117.
- Deng, W., Aimone, J.B., Gage, F.H., 2010. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 339–350.

Dikranian, K., Kim, J., Stewart, F.R., Levy, M.A., Holtzman, D.M., 2012. Ultrastructural studies in APP/PS1 mice expressing human ApoE isoforms: implications for Alzheimer's disease. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 5, 482–495.

Dupree, J.L., Pomicter, A.D., 2010. Myelin, DIGs, and membrane rafts in the central nervous system. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 91, 118–129.

Ekdahl, C.T., Claasen, J.H., Bonde, S., Kokaia, Z., Lindvall, O., 2003. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 13632–13637.

Filali, M., Lalonde, R., 2009. Age-related cognitive decline and nesting behavior in an APP^{swe}/PS1 bigenic model of Alzheimer's disease. *Brain Res* 1292, 93–99.

Foord, S.M., Bonner, T.I., Neubig, R.R., Rosser, E.M., Pin, J.P., Davenport, A.P., Spedding, M., Harmar, A.J., 2005. International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list. *Pharmacol. Rev.* 57, 279–288.

Fredriksson, R., Lagerstrom, M.C., Lundin, L.G., Schiöth, H.B., 2003. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.* 63, 1256–1272.

Fuhrmann, M., Bittner, T., Jung, C.K., Burgold, S., Page, R.M., Mitteregger, G., Haass, C., LaFerla, F.M., Kretschmar, H., Herms, J., 2010. Microglial Cx3cr1 knockout prevents neuron loss in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* 13, 411–413.

Gamo, K., Kiryu-Seo, S., Konishi, H., Aoki, S., Matsushima, K., Wada, K., Kiyama, H., 2008. G-protein-coupled receptor screen reveals a role for chemokine receptor CCR5 in suppressing microglial neurotoxicity. *J. Neurosci.* 28, 11980–11988.

Grathwohl, S.A., Kalin, R.E., Bolmont, T., Prokop, S., Winkelmann, G., Kaeser, S.A., Odenthal, J., Radde, R., Eldh, T., Gandy, S., Aguzzi, A., Staufenbiel, M., Mathews, P.M., Wolburg, H., Heppner, F.L., Jucker, M., 2009. Formation and maintenance of Alzheimer's disease beta-amyloid plaques in the absence of microglia. *Nat. Neurosci.* 12, 1361–1363.

Hama, H., 2010. Fatty acid 2-Hydroxylation in mammalian sphingolipid biology. *Biochim. Biophys. Acta* 1801, 405–414.

Hannun, Y.A., Obeid, L.M., 2008. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 139–150.

Jarrett, J.T., Berger, E.P., Lansbury, P.T.J., 1993. The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 32, 4693–4697.

Kostenis, E., 2004. A glance at G-protein-coupled receptors for lipid mediators: a growing receptor family with remarkably diverse ligands. *Pharmacol. Ther.* 102, 243–257.

Lee, S., Varvel, N.H., Konerth, M.E., Xu, G., Cardona, A.E., Ransohoff, R.M., Lamb, B.T., 2010. CX3CR1 deficiency alters microglial activation and reduces beta-amyloid deposition in two Alzheimer's disease mouse models. *Am J Pathol* 177, 2549–2562.

- Lesne, S., Koh, M.T., Kotilinek, L., Kaye, R., Glabe, C.G., Yang, A., Gallagher, M., Ashe, K.H., 2006. A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 440, 352–357.
- Masliah, E., Mallory, M., Hansen, L., DeTeresa, R., Alford, M., Terry, R., 1994. Synaptic and neuritic alterations during the progression of Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 174, 67–72.
- Mildner, A., Schlevogt, B., Kierdorf, K., Bottcher, C., Erny, D., Kummer, M.P., Quinn, M., Bruck, W., Bechmann, I., Heneka, M.T., Priller, J., Prinz, M., 2011. Distinct and non-redundant roles of microglia and myeloid subsets in mouse models of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 31, 11159–11171.
- Monje, M.L., Toda, H., Palmer, T.D., 2003. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science* 302, 1760–1765.
- Naert, G., Rivest, S., 2011. CC chemokine receptor 2 deficiency aggravates cognitive impairments and amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 31, 6208–6220.
- Oster-Granite, M.L., McPhie, D.L., Greenan, J., Neve, R.L., 1996. Age-dependent neuronal and synaptic degeneration in mice transgenic for the C terminus of the amyloid precursor protein. *J. Neurosci.* 16, 6732–6741.
- Paxinos, G., Franklin, K.B.J., 2012. Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Fourth Edition. Academic Press, Orlando.
- Peters, A., Palay, S.L., Webster, H.D., 1991. Fine Structure of the Nervous System: Neurons and Their Supporting Cells. Oxford University Press, New York.
- Scheff, S.W., Price, D.A., Schmitt, F.A., DeKosky, S.T., Mufson, E.J., 2007. Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Neurology* 68, 1501–1508.
- Simard, A.R., Soulet, D., Gowing, G., Julien, J.P., Rivest, S., 2006. Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron* 49, 489–502.
- Siskova, Z., Justus, D., Kaneko, H., Friedrichs, D., Henneberg, N., Beutel, T., Pitsch, J., Schoch, S., Becker, A., von der Kammer, H., Remy, S., 2014. Dendritic Structural Degeneration Is Functionally Linked to Cellular Hyperexcitability in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Neuron* 84, 1023–1033.
- Siskova, Z., Tremblay, M.E., 2013. Microglia and synapse: interactions in health and neurodegeneration. *Neural. Plast.* 2013, 425845.
- Song, M., Jin, J., Lim, J.E., Kou, J., Pattanayak, A., Rehman, J.A., Kim, H.D., Tahara, K., Lalonde, R., Fukuchi, K., 2011. TLR4 mutation reduces microglial activation, increases Abeta deposits and exacerbates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neuroinflammation* 8, 92.
- Spires-Jones, T., Knafo, S., 2012. Spines, plasticity, and cognition in Alzheimer's model mice. *Neural Plast* 2012, 319836.
- Spires, T.L., Hyman, B.T., 2004. Neuronal structure is altered by amyloid plaques. *Rev Neurosci* 15, 267–278.

Suzuki, M., Takaishi, S., Nagasaki, M., Onozawa, Y., Iino, I., Maeda, H., Komai, T., Oda, T., 2013. Medium-chain fatty acid-sensing receptor, GPR84, is a proinflammatory receptor. *J. Biol. Chem.* 288, 10684–10691.

Tahara, K., Kim, H.D., Jin, J.J., Maxwell, J.A., Li, L., Fukuchi, K., 2006. Role of toll-like receptor signalling in Abeta uptake and clearance. *Brain* 129, 3006–3019.

Tan, J., Town, T., Crawford, F., Mori, T., DelleDonne, A., Crescentini, R., Obregon, D., Flavell, R.A., Mullan, M.J., 2002. Role of CD40 ligand in amyloidosis in transgenic Alzheimer's mice. *Nat Neurosci* 5, 1288–1293.

Tan, J., Town, T., Paris, D., Mori, T., Suo, Z., Crawford, F., Mattson, M.P., Flavell, R.A., Mullan, M., 1999. Microglial activation resulting from CD40-CD40L interaction after beta-amyloid stimulation. *Science* 286, 2352–2355.

Tanzi, R.E., Bertram, L., 2005. Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell* 120, 545–555.

Tremblay, M.E., Majewska, A.K., 2011. A role for microglia in synaptic plasticity? *Commun. Integr. Biol.* 4, 220–222.

Tremblay, M.E., Stevens, B., Sierra, A., Wake, H., Bessis, A., Nimmerjahn, A., 2011. The role of microglia in the healthy brain. *J. Neurosci.* 31, 16064–16069.

Tremblay, M.E., Zettel, M.L., Ison, J.R., Allen, P.D., Majewska, A.K., 2012. Effects of aging and sensory loss on glial cells in mouse visual and auditory cortices. *Glia* 60, 541–558.

Tsai, J., Grutzendler, J., Duff, K., Gan, W.B., 2004. Fibrillar amyloid deposition leads to local synaptic abnormalities and breakage of neuronal branches. *Nat. Neurosci.* 7, 1181–1183.

Tsien, J.Z., Huerta, P.T., Tonegawa, S., 1996. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* 87, 1327–1338.

Vallieres, L., Campbell, I.L., Gage, F.H., Sawchenko, P.E., 2002. Reduced hippocampal neurogenesis in adult transgenic mice with chronic astrocytic production of interleukin-6. *J. Neurosci.* 22, 486–492.

Venkataraman, C., Kuo, F., 2005. The G-protein coupled receptor, GPR84 regulates IL-4 production by T lymphocytes in response to CD3 crosslinking. *Immunol Lett*

Verret, L., Jankowsky, J.L., Xu, G.M., Borchelt, D.R., Rampon, C., 2007. Alzheimer's-type amyloidosis in transgenic mice impairs survival of newborn neurons derived from adult hippocampal neurogenesis. *J. Neurosci.* 27, 6771–6780.

Wake, H., Moorhouse, A.J., Miyamoto, A., Nabekura, J., 2013. Microglia: actively surveying and shaping neuronal circuit structure and function. *Trends Neurosci.* 36, 209–217.

Walter, J., van Echten-Deckert, G., 2013. Cross-talk of membrane lipids and Alzheimer-related proteins. *Mol. Neurodegener.* 8, 34.

Wang, J., Wu, X., Simonavicius, N., Tian, H., Ling, L., 2006. Medium chain fatty acids as ligands for orphan G protein-coupled receptor GPR84. *J. Biol. Chem.*

Weitz, T.M., Town, T., 2012. Microglia in Alzheimer's Disease: It's All About Context. *Int J Alzheimers Dis* 2012, 314185.

Yousefi, S., Cooper, P.R., Potter, S.L., Mueck, B., Jarai, G., 2001. Cloning and expression analysis of a novel G-protein-coupled receptor selectively expressed on granulocytes. *J. Leukoc. Biol.* 69, 1045–1052.

Zhang, C.L., Zou, Y., He, W., Gage, F.H., Evans, R.M., 2008. A role for adult TLX-positive neural stem cells in learning and behaviour. *Nature* 451, 1004–1007.

3.11 Figures

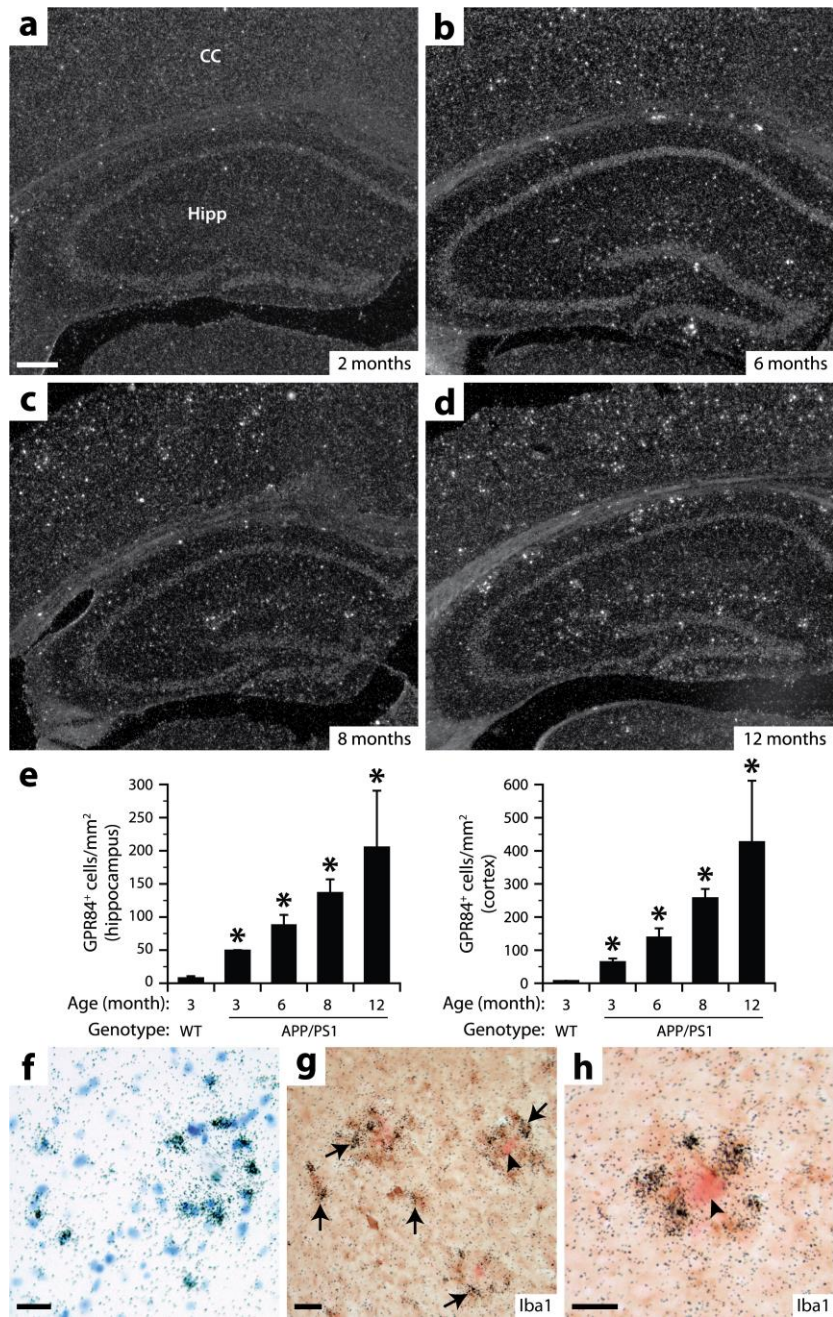


Figure 3-1. Expression of GPR84 mRNA in the brains of APP/PS1 transgenic mice.

a-d, Dark-field micrographs showing in situ hybridization signals for GPR84 mRNA in the cerebral cortex (CC) and hippocampus (Hipp) of APP/PS1 mice killed at the indicated ages. Scale bar = 250 μm .

e, Stereological analysis revealed increased numbers of GPR84 mRNA+ cells in the brain of APP/PS1 mice compared to wild-types. *Significantly different from the wild types (ANOVA followed by post hoc Student's t tests: $P < 0.05$). Sample size: 3 per group.

f, Bright-field image showing hybridization signals (black grains) for GPR84 mRNA at higher magnification in an 8 month-old APP/PS1 mouse. Blue, thionin counterstaining. Scale bar = 25 μm .

g, h, Micrographs at different magnifications showing hybridization signals for GPR84 mRNA (black grains) colocalized with Iba1 immunostaining (microglia, brown) and located around Congo red-stained amyloid plaques (arrowheads) in cortical sections of a 8 month-old APP/PS1 mouse. Arrows, examples of double-labeled cells. Scale bars = 25 μm .

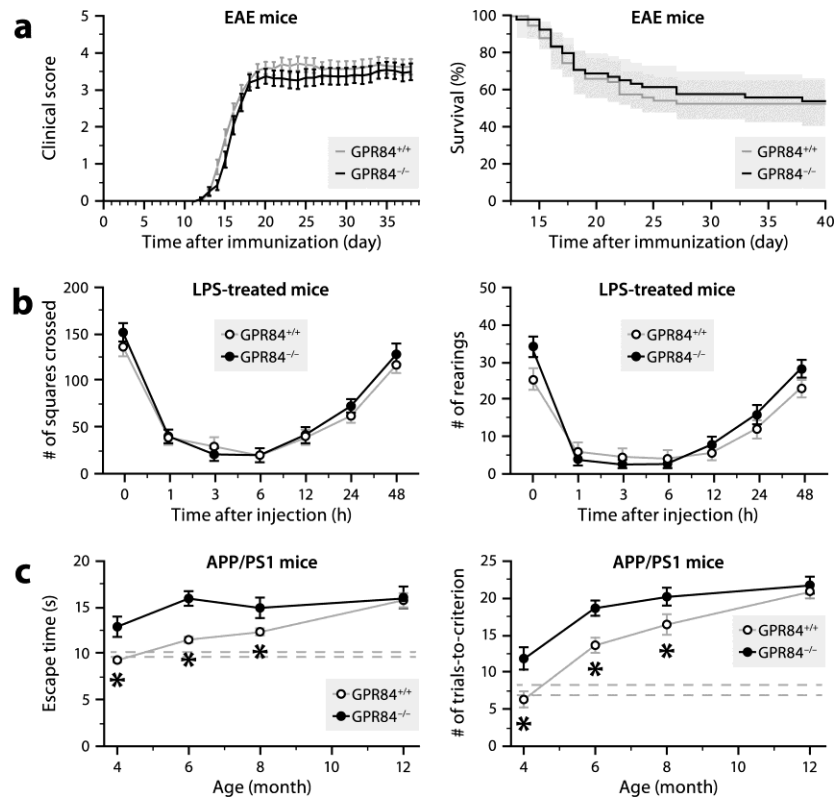


Figure 3-2. Clinical assessment of GPR84 knockout and wild-type mice in three disease models.

a, No intergroup difference in disease severity was detected in mice with chronic EAE induced by immunization with a MOG peptide (left panel, Wilcoxon rank sum tests: $P > 0.1$; right panel, log-rank test: $P = 0.77$). Sample size: 54 knockouts and 59 wild types.

b, No intergroup difference in locomotor activity (an indicator of sickness) was detected in mice injected intraperitoneally with LPS (1 mg/kg), as evaluated by counting the number of segments crossed and rearings in a T-maze (two-way ANOVA with repeated measures: $P = 0.3$ (left panel) or 0.2 (right panel)). Sample size: 16 knockouts and 18 wild types.

c, A deficit in spatial learning was detected in APP/PS1 transgenic mice lacking GPR84, as indicated by the escape time and number of trials-to-criterion recorded during the reversal learning phase in a water T-maze. The dashed lines indicate the error bars of non-APP/PS1 mice at 4 months of age. *Significantly different from APP/PS1 mice deficient in GPR84 (Wilcoxon post hoc tests: $P \leq 0.02$ (left panel) or 0.04 (right panel)). Sample size: 20 knockouts and 26 wild types.

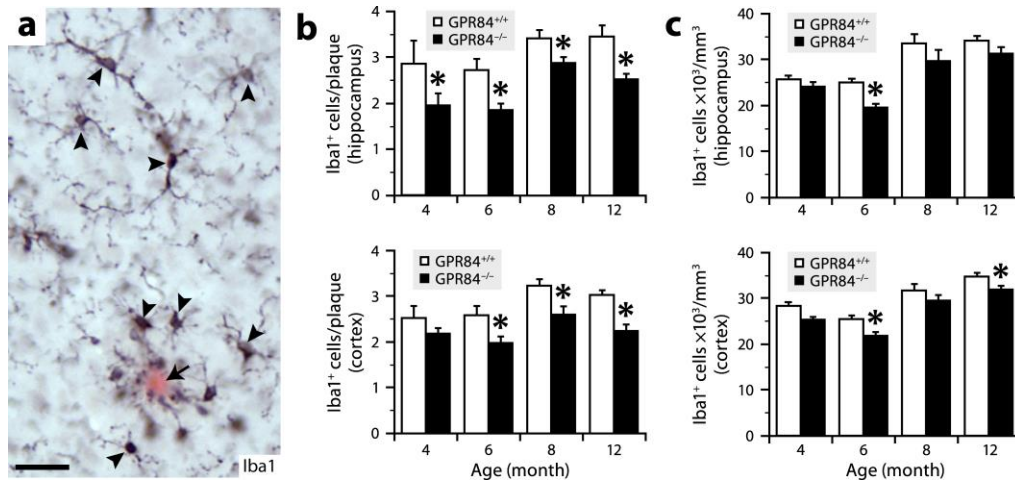


Figure 3-3. Microgliosis in APP/PS1 transgenic mice deficient or not in GPR84.

a, Cortical section immunostained for Iba1 (microglia, arrowheads) and counterstained with Congo red (amyloid plaque, arrow). Scale bar = 25 μm .

b, A reduced number of microglia per amyloid plaque was observed in both the hippocampus and cortex of APP/PS1 mice lacking GPR84. *Significantly different from the wild types (two-way ANOVA: $P \leq 0.0001$ for genotype or < 0.0008 for age; post hoc Student's t tests: $P < 0.05$). Sample size: 6-12 per group.

c, Stereological analysis revealed a reduced density of microglia in the hippocampus and cortex of APP/PS1 mice lacking GPR84. *Significantly different from the wild types (two-way ANOVA: $P \leq 0.0015$ for genotype or < 0.0001 for age; post hoc Student's t tests: $P < 0.05$). Sample size: 6-12 per group.

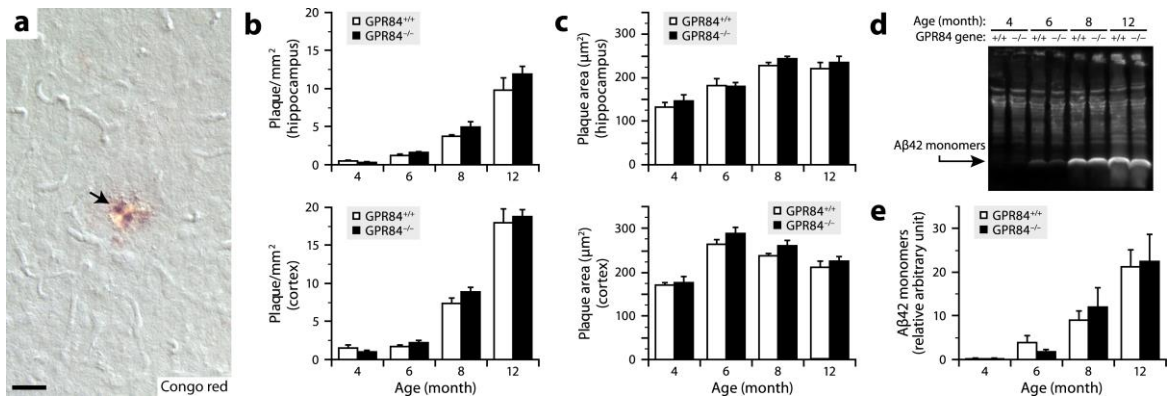


Figure 3-4. Amyloid burden in APP/PS1 transgenic mice deficient or not in GPR84.

a, Nomarski micrograph of a cortical section stained with Congo red showing an amyloid plaque (arrow). Scale bar = 25 μm.

b, c, Stereological analyses revealed no difference in the number and area of plaques in the hippocampus and cortex of APP/PS1 mice lacking GPR84 (two-way ANOVA: $P > 0.05$ for genotype or < 0.0001 for age). Sample size: 6-14 per group.

d, e, Western blotting revealed no intergenotypic difference in the amount of Aβ42 monomers in brain extracts enriched for extracellular proteins (two-way ANOVA: $P = 0.82$ for genotype or < 0.0001 for age). Sample size: 4-9 per group.

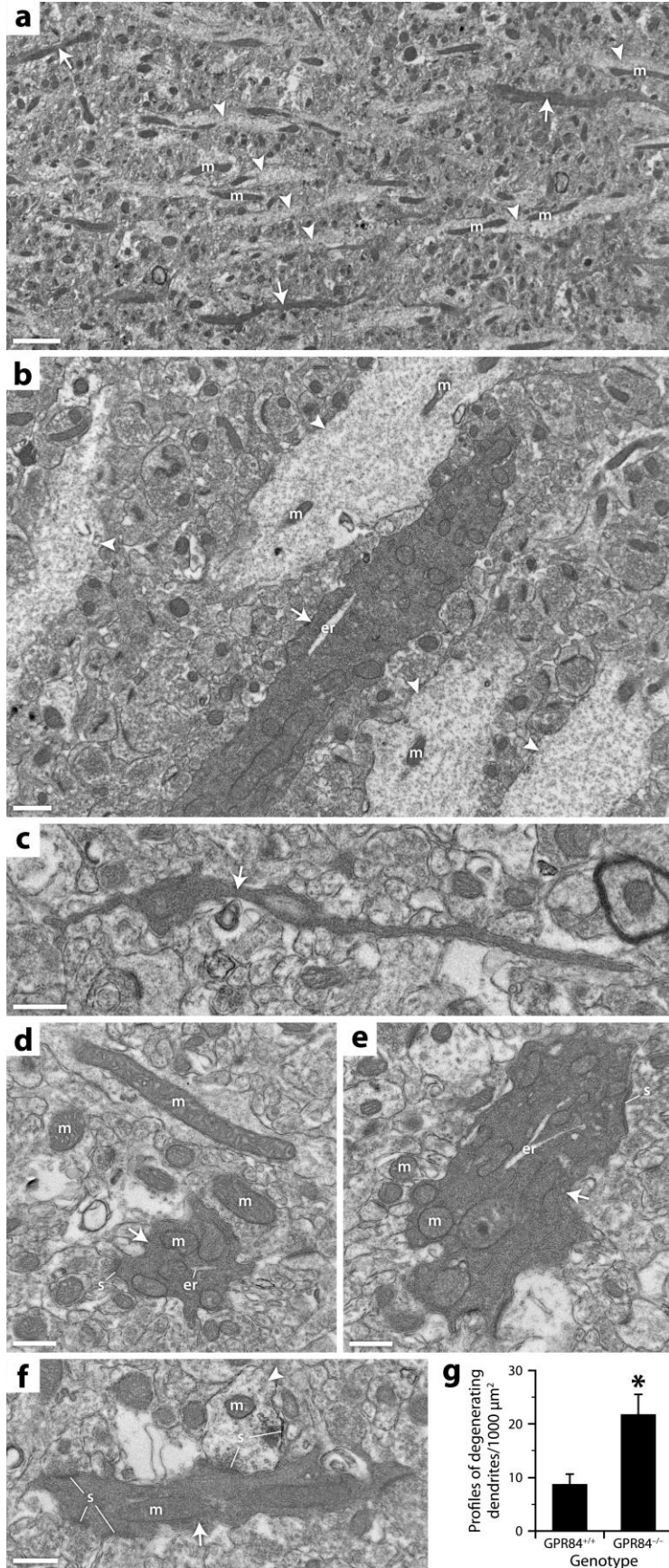


Figure 3-5. Dendritic degeneration in APP/PS1 mice deficient or not in GPR84.

a-f, Electron micrographs of degenerating dendrites (arrows) in the hippocampal CA1 stratum radiatum of 6 month-old APP/PS1 mice. Note their condensed cytoplasm and dilated endoplasmic reticulum, which are a typical signs of degeneration, compared to those of normal dendrites (arrowheads). Abbreviations: er, endoplasmic reticulum; m, mitochondria; s, synapse. Scale bars = 2 μ m (a) or 500 nm (b-f).

g, Quantification, using images taken from the stratum radiatum, revealed an increased number of degenerating dendritic profiles in APP/PS1 mice lacking GPR84 compared to APP/PS1 mice expressing this gene (Student's t test: $P = 0.012$). Sample size: 5 per group.

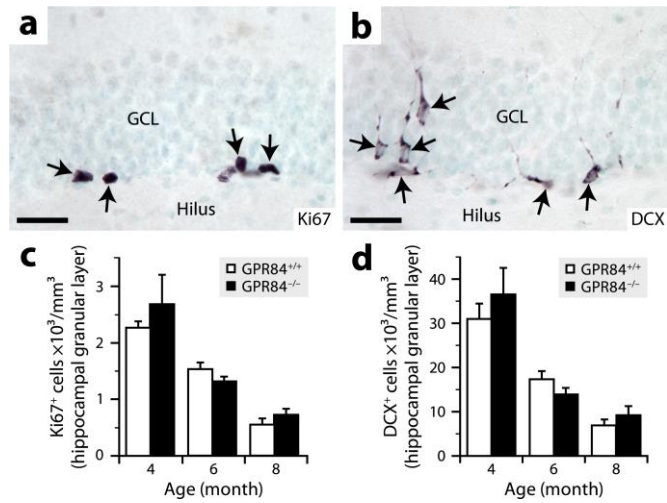


Figure 3-6. Hippocampal neurogenesis in APP/PS1 transgenic mice lacking or not GPR84.

a, b, Sections showing the granule cell layer (GCL) of the dentate gyrus immunostained (black) for Ki67, a marker of proliferating cells, or DCX, a marker of newborn neurons. Counterstaining = methyl green. Scale bar = 25 μ m.

c, d, Stereological data showing no intergenotype difference in the number of Ki67⁺ or DCX⁺ cells. Two-way ANOVA: Ki67, $P = 0.59$ (genotype), < 0.0001 (age) or $= 0.52$ (interaction); DCX, $P = 0.56$ (genotype), < 0.0001 (age) or $= 0.45$ (interaction). Sample size: 6-9 per group.

Chapitre 4: Discussion générale et conclusions

La neuroinflammation est caractérisée par l'activation des cellules immunitaires du SNC et l'infiltration des leucocytes périphériques. Chaque pathologie a une signature spécifique de réponse inflammatoire et les mêmes cellules immunitaires peuvent exercer divers effets dépendamment du contexte. L'action des cellules immunitaires est principalement médiée par des molécules sécrétées appelées cytokines qui se lient à des récepteurs présentés par d'autres cellules et dirigent ainsi la réaction inflammatoire. L'influence des réponses immunitaires dans la physiopathologie du SNC reste encore peu connue étant donné la complexité du cocktail inflammatoire relâché lors d'affections chroniques. Bien qu'une multitude de fonctions soit attribuée aux cellules myéloïdes pendant les pathologies touchant le SNC, le rôle et le mécanisme d'action de chaque type cellulaire restent à identifier. Les travaux effectués au cours de mon doctorat contribuent à l'avancée des connaissances concernant le rôle des cellules myéloïdes durant la neuroinflammation. Ainsi, nous avons étudié le rôle de deux médiateurs inflammatoires dérivés des cellules myéloïdes dans les maladies neurodégénératives : l'IL-36 γ , dont l'expression s'est révélée spécifique aux neutrophiles durant l'EAE et le GPR84, un récepteur spécifique à la microglie dans le SNC. Ici, nous démontrons que l'IL-36 γ est bien en mesure d'activer la microglie via son récepteur IL-36R mais ne joue pas de rôle dans l'EAE active. En ce qui concerne le GPR84, nos résultats l'impliquent comme un acteur important dans la progression de la MA en retardant la dégénérescence dendritique et les déficits cognitifs. Ces données démontrent l'action de nouvelles molécules effectrices dérivées des cellules myéloïdes lors des pathologies neuroinflammatoires.

4.1 IL-36 γ et l'inflammation

Bien que l'implication de la signalisation IL-36/IL-36R ait été étudiée dans les réactions inflammatoires périphériques, nous sommes les premiers à explorer son rôle dans le SNC. Nos résultats montrent que les cytokines IL-36 et leur récepteur IL-36R voient leurs niveaux augmenter au cours de l'EAE. Cette surexpression de l'IL-36 a aussi été rapportée dans les modèles du psoriasis, de l'asthme, de l'arthrite et de la colite (Blumberg et al., 2007; Carrier et al., 2011; Tortola et al., 2012; Medina-Contreras et al., 2015). Cependant, l'action de l'IL-36 semble être différente dans ces modèles. Ainsi, dans notre modèle d'EAE active, la déficience en IL-36 γ ou en IL-36R n'a pas affecté le recrutement d'aucune population leucocytaire dans le SNC (Bozoyan et al., 2015). Cependant, durant les pathologies de la peau, l'IL-36 induit une expansion des cellules Th17, régule l'axe pathologique IL-23/IL-17/IL-22, favorise le recrutement des neutrophiles et le développement du psoriasis (Blumberg et al., 2007; Carrier et al., 2011; Tortola et al., 2012). Récemment, une autre étude a rapporté un rôle majeur de l'IL-36 dans la résolution du dommage intestinal impliquant l'action bénéfique des neutrophiles (Medina-Contreras et al., 2015). Ils ont révélé que l'expression

de l'IL-36 γ , mais pas celle de l'IL-36 α ou β , est augmentée à la suite de l'inflammation intestinale dans un modèle de colite induit par DSS (*dextran sodium sulfate*). De manière similaire au rôle pro-inflammatoire de l'IL-36 dans le psoriasis, la colite s'est montrée moins sévère chez les souris IL-36R⁻ comparées aux souris sauvages (Medina-Contreras et al., 2015). Néanmoins, l'absence de l'IL-36R a prolongé la cicatrisation des plaies mécaniques générées dans l'intestin dû à la réduction du nombre de neutrophiles dans la plaie des souris déficientes (Medina-Contreras et al., 2015). Ces résultats combinés avec nos études suggèrent une régulation différentielle des neutrophiles par l'IL-36 γ dans le SNC et dans d'autres organes. Il serait donc primordial d'étudier l'axe IL-36/IL-36R dans d'autres modèles neuroinflammatoires tels que les souris 2D2 ou encore des modèles de méningite bactérienne pour mieux caractériser son action dans le SNC.

Comme dans les modèles d'arthrite (Lamacchia et al., 2013; Derer et al., 2014) et d'infection pulmonaire (Segueni et al., 2015), nous démontrons que l'absence de l'IL-36 γ ou de l'IL-36R n'affecte pas la sévérité ni la progression de l'EAE. Il pourrait y avoir plusieurs hypothèses pour expliquer l'effet limité de l'IL-36 dans ces modèles:

- Premièrement, les mécanismes de sécrétion des formes actives des cytokines IL-36 ainsi que le processus de leur externalisation ne sont pas complètement élucidés. Les études *in vitro* suggèrent que de façon similaire à l'IL-1 β , l'IL-36 requiert un clivage pour être activée. La protéase qui en est responsable n'est pas encore identifiée *in vivo*, mais il serait tentant de spéculer qu'elle est présente dans certains tissus, comme la peau et les intestins, et manquante dans le SNC, les articulations et les voies respiratoires. Il serait aussi envisageable que les neutrophiles expriment cette protéase uniquement dans certaines conditions. Cette différence d'expression de la protéase selon l'organe et le contexte concorderait avec l'impact de l'IL-36 dans divers modèles pathologiques.
- Deuxièmement, les mécanismes précis de la stimulation de l'IL-36 restent encore peu connus. Jensen et collègues ont rapporté que l'expression de l'IL-36 γ est stimulée spécifiquement par les agonistes de TLR3, l'acide polyinosinique-polycytidylique, et de TLR5, la flagelline, dans les keratinocytes en culture (Lian et al., 2012). D'autre part, des études suggèrent que notre modèle d'EAE active est plutôt TLR4- et TLR9-dépendant (Marta et al., 2009). Il est intrigant de savoir que dans notre modèle d'EAE l'augmentation des niveaux de l'IL-36 γ dans le SNC et la rate semble être due à l'infiltration des neutrophiles et non à sa surexpression par les cellules. Ainsi, le nombre de neutrophiles infiltrés, mesuré par le transcrit de Ly6G, corrèle avec le nombre de transcrits de l'IL-36 γ détectés dans le tissu (résultats non publiés). Bien que la surexpression des cytokines IL-36 n'ait jamais été explorée dans le psoriasis, il serait tentant de penser que leur expression y est significativement stimulée, contrairement aux modèles d'EAE.
- Troisièmement, compte tenu de la fine régulation de l'action des cytokines IL-36, les niveaux des antagonistes et des agonistes devraient également être évalués dans différents contextes et organes. Il est

intéressant de noter que l'inflammation diminue les niveaux de SIGIRR, un régulateur négatif de l'IL-36 (Wald et al., 2003; Costelloe et al., 2008), et les souris déficientes en SIGIRR répondent plus fortement à l'IL-1 (Wald et al., 2003). Les différences significatives de l'action stimulatrice de l'IL-1 par rapport à l'IL-36 sur la production de certains médiateurs pro-inflammatoires (comme l'IL-6) (Magne et al., 2006) et le rôle essentiel de l'axe de l'IL-1 dans la progression de l'arthrite, des infections pulmonaires et de l'EAE (Matsuki et al., 2006; Lamacchia et al., 2013; Aube et al., 2014; Derer et al., 2014; Dumas et al., 2014; Segueni et al., 2015) pourraient potentiellement dissimuler l'implication complémentaire de la cytokine IL-36 dans ces pathologies.

Dans notre modèle d'EAE active, l'isolation spécifique de chaque population leucocytaire par cytométrie en flux nous a permis d'identifier les neutrophiles comme la source majeure de l'IL-36 γ dans la moelle épinière et la rate (Bozoyan et al., 2015). L'étude de Denning et collègues associe l'expression de l'IL-36 γ avec les macrophages périphériques dans leur modèle de colite (Medina-Contreras et al., 2015). Toutefois, l'expression de l'IL-36 γ par la population des neutrophiles infiltrants n'a jamais été explorée dans leur étude et ne pourrait pas être exclue (Medina-Contreras et al., 2015). Dans le psoriasis et l'asthme, les kératinocytes et les tissus épithéliaux sont considérés comme étant la source d'IL-36 γ . Cette supposition est basée sur l'expression de l'IL-36 γ dans différentes lignées épithéliales/épidermales (Kumar et al., 2000; Carrier et al., 2011; Chustz et al., 2011; Johnston et al., 2011); ainsi que sur les évidences que les cellules épithéliales de la peau et des voies respiratoires des patients expriment l'IL-36 γ *in vitro* suite à la stimulation avec des facteurs inflammatoires (Vos et al., 2005; Muhr et al., 2011). En effet, dans le psoriasis et l'asthme, les niveaux de l'IL-36 γ augmentent dans les loci inflammatoires dans la peau et les voies respiratoires, respectivement (Johnston et al., 2011; Ramadas et al., 2011). Néanmoins, aucune étude, chez l'homme ni la souris, n'a clairement démontré une colocalisation de la protéine IL-36 γ dans des cellules épithéliales/épidermales *in vivo*. Il serait donc crucial de réévaluer la(les) population(s) cellulaire(s) qui exprime(nt) l'IL-36 γ dans ces pathologies.

4.2 Rôle des neutrophiles dans les maladies démyélinisantes auto-immunes

Les agents thérapeutiques actuellement utilisés pour la SEP ciblent uniquement les lymphocytes. Certains de ces traitements bloquent le recrutement ou la mobilisation des lymphocytes (natalizumab et fingolimod, respectivement), d'autres déplètent les lymphocytes de la circulation (alemtuzumab et ocrelizumab) et diminuent ainsi le risque de rechutes de la SEP récurrente rémittente. Toutefois, aucun de ces agents immunomodulateurs n'est efficace pour renverser la progression de la pathologie ni améliorer l'état des patients souffrant des formes progressives de la SEP, soulignant le besoin de nouvelles approches thérapeutiques. De plus en plus d'études impliquent les cellules myéloïdes et les facteurs critiques pour la

survie, l'expansion, l'activation et la mobilisation de ces dernières dans la SEP. C'est pour cette raison que les molécules dérivées des cellules myéloïdes doivent être explorées comme des sources alternatives de biomarqueurs et de cibles thérapeutiques.

Dans le Chapitre 2 de cette thèse, j'ai caractérisé la première cytokine spécifique aux neutrophiles au cours du développement de l'EAE. Bien qu'elle ne semble avoir aucun impact dans l'initiation ou la progression de la pathologie (Bozoyan et al., 2015), il serait important de continuer à étudier le rôle spécifique des neutrophiles dans les maladies inflammatoires. En effet, les neutrophiles sont impliqués dans plusieurs pathologies inflammatoires du SNC. Par exemple, lors de la méningite bactérienne et la NMO le recrutement massif des neutrophiles est associé avec des dommages tissulaires irréversibles (Koedel et al., 2010; Jacob et al., 2012; Saadoun et al., 2012). Les neutrophiles sont aussi des cellules critiques dans le développement de l'EAE. Leur rôle dans les processus neuroinflammatoires de la SEP reste controversé puisqu'ils n'ont pas encore été détectés dans les tissus du SNC. Toutefois, plusieurs évidences indirectes plaident en faveur d'une implication des neutrophiles dans la SEP. Ainsi, la chimiokine IL-8, qui attire les neutrophiles, a été détectée dans le LCR des patients SEP (Ishizu et al., 2005; Campbell et al., 2010). De plus, les niveaux élevés d'IL-17A corrèlent positivement avec le nombre de neutrophiles dans les échantillons de LCR obtenus de patients en rechute (Kostic et al., 2014). En effet, la fonction principale des cellules Th17, les cellules effectrices cruciales de la SEP et l'EAE, demeure la sécrétion des facteurs activant les neutrophiles comme le G-CSF et les chimiokines ELR+ CXC (Pelletier et al., 2010; Becher and Segal, 2011). Les transcrits codant pour le G-CSF sont exprimés dans les lésions SEP (Lock et al., 2002) et l'administration du G-CSF est associée à des rechutes de symptômes (Openshaw et al., 2000; Burt et al., 2001). Les niveaux de CXCL1, CXCL5 et l'élastase des neutrophiles montrent également une belle corrélation avec les examens cliniques et radiologiques du SNC dans la SEP (Rumble et al., 2015). De façon intéressante, CXCL5 corrèle positivement avec la formation de nouvelles lésions chez les patients (Rumble et al., 2015). En accord avec toutes ces études, il a récemment été rapporté que les neutrophiles sont plus nombreux et sont dans un état actif chez les patients SEP comparé aux individus sains (Naegele et al., 2012). En récapitulant toutes ces données, nous pouvons conclure que l'absence des neutrophiles du SNC chez les patients SEP pourrait être due au biais de la disponibilité du tissu aux phases aiguës de la maladie. En accord avec cette hypothèse, mes observations montrent que le nombre de neutrophiles diminue aussi au cours de l'EAE chez les souris ayant une maladie très avancée, proche de paralysie complète. D'autre part, les neutrophiles pourraient changer leur profil durant la pathologie rendant leur détection impossible avec des marqueurs utilisés actuellement. Il est donc primordial de mieux caractériser les facteurs des neutrophiles, car ils pourraient servir de nouveaux biomarqueurs dans la SEP ou d'autres maladies inflammatoires démyélinisantes.

La génération récente de la souris *Catchup* permet d'étudier spécifiquement le rôle des neutrophiles. Cette souris transgénique *knock-in* exprime la recombinaise Cre dans le locus Ly6G qui est hautement spécifique aux neutrophiles (Hasenberg et al., 2015). En exploitant la recombinaison Cre-LoxP, il serait possible de cibler et moduler l'expression de gènes d'intérêt dans les neutrophiles et d'explorer leurs différentes fonctions. De plus, l'utilisation du même système Cre-loxP permettrait d'étudier le destin des neutrophiles. Ces approches révéleraient l'implication des neutrophiles dans diverses conditions physiopathologiques.

4.3 GPR84 et microglie

Dans le Chapitre 3 de cette thèse, on a exploré le rôle du GPR84 chez la souris APP/PS1. On a observé que l'expression du GPR84 augmente graduellement sur la microglie durant la maladie. Similairement à nos résultats, plusieurs équipes ont rapporté la hausse des niveaux du GPR84 dans des conditions neuroinflammatoires comme l'EAE, l'endotoxémie et les lésions de nerfs (Bedard et al., 2007; Bouchard et al., 2007; Gamo et al., 2008; Nicol et al., 2015). L'ensemble de ces études suggère que le GPR84 peut être considéré comme un marqueur d'activation général pour la microglie/macrophage.

Nos résultats démontrent que la déficience du GPR84 diminue l'activation et le recrutement de la microglie autour des plaques d'A β et accélère la dégénérescence dendritique chez les souris APP/PS1. En conditions physiologiques, un ligand se lierait au GPR84 et permettrait l'immunosurveillance adéquate, la phagocytose et/ou la réparation du tissu nerveux par la microglie. En absence du GPR84, la détection des signaux de danger, comme l'accumulation de l'amyloïde- β , serait compromise ce qui conduirait à l'accumulation de dendrites en dégénérescence; toutefois, nous n'avons pas élucidé les mécanismes d'action précis du GPR84. Trois mécanismes pourraient être envisageables:

(1) les voies de signalisation activées par le GPR84 rendraient plus efficace l'élimination et/ou la neutralisation de l'amyloïde- β toxique. Nos résultats suggèrent un rôle protecteur du GPR84 exprimé par la microglie suite à la toxicité d'A β ; toutefois, le GPR84 n'affecte pas la formation, ni l'élimination des plaques d'amyloïde- β . Ces données sont en accord avec d'autres études démontrant que la microglie ne phagocyte pas ou peu l'A β et que les cellules du système immunitaire périphérique sont plus efficaces pour l'éliminer (Simard et al., 2006; Grathwohl et al., 2009; Mildner et al., 2009). Cependant, il est très intéressant de mentionner que la phagocytose des plaques n'est pas le seul moyen qui pourrait diminuer la toxicité de l'A β . En effet, les lipides ont la capacité d'interagir avec les fibrilles inertes d'A β , les déstabiliser et resolubiliser les rendant toxiques pour les neurones (Martins et al., 2008). Ainsi, l'injection d'une suspension de lipides synthétiques mélangée à des fibrilles d'A β diffuse rapidement dans le cerveau et cause des troubles cognitifs chez les souris. Le ligand

endogène du GPR84 n'est pas encore connu; toutefois, le GPR84 s'active par des acides gras de moyenne chaîne *in vitro*. Prenant en compte que les acides gras sont des produits dérivés de lipides et que le déséquilibre du métabolisme lipidique est une caractéristique importante de la MA, il serait tentant de spéculer que le GPR84 lierait les lipides libres dans le parenchyme du SNC, empêchant leur interaction avec les plaques d'A β et aurait ainsi un effet neuroprotecteur. De ce fait, en plus de révéler une nouvelle cible thérapeutique potentielle pour la MA, notre étude fournit un modèle *in vivo* pour essayer de définir le ligand du GPR84 en utilisant par exemple les méthodes de spectrométrie de masse.

(2) la déficience du GPR84 réduirait la capacité de la microglie à éliminer les dendrites en dégénérescence. Cette hypothèse est en accord avec le fait que la microglie a la capacité d'éliminer de façon efficace des débris cellulaires comme la myéline (Lampron et al., 2015). De plus, le processus de la phagocytose par la microglie a été rapporté comme stimulant une réponse anti-inflammatoire en réduisant, par exemple, la relâche de l'IL-1 β et de TNF α (Liu et al., 2006), ce qui pourrait contribuer à la préservation des dendrites.

(3) la réponse microgliale régulée par GPR84 aurait un rôle anti-inflammatoire dans la maladie d'Alzheimer. Les évidences antérieures rapportent que l'activation du récepteur GPR84 entraîne une réponse pro-inflammatoire (Wang et al., 2006; Suzuki et al., 2013; Nicol et al., 2015). Toutefois, le GPR84 est exprimé par différents types cellulaires en culture dans toutes ces études. (Wang et al., 2006) et (Suzuki et al., 2013) étudient la signalisation du GPR84 exprimé sur des cellules CHO (*Chinese Hamster Ovary*). D'autre part, la source cellulaire du GPR84 suite à la lésion du nerf sciatique sont les macrophages périphériques (Nicol et al., 2015), contrairement à la microglie dans le SNC de notre modèle d'Alzheimer. Il est important de savoir que l'action d'un même GPCR pourrait différer selon le contexte et le répertoire d'autres GPCR présents dans la cellule activée. Ainsi, les récepteurs couplés aux protéines G ont la capacité de former des hétéromères et leur dimérisation peut engendrer des voies de signalisation différentes de celles activées uniquement avec le récepteur donné (Beaulieu et al., 2015; Kern et al., 2015). Il serait envisageable d'assigner divers rôles au GPR84 selon s'il agit sous forme de monomère ou s'il est hétéromérisé avec un autre récepteur. En accord avec cette hypothèse, l'activation de certains GPCR sur la microglie tels que CCR5 et CX3CR1 protégerait les neurones grâce à une réponse anti-inflammatoire (Cardona et al., 2006; Gamo et al., 2008).

Dans notre modèle de la MA, le nombre de la microglie Iba1⁺ autour des plaques d'A β diminue significativement dans le cortex et l'hippocampe des souris déficientes en GPR84 à tous les âges examinés. Ceci pourrait être dû à une déficience d'activation de la microglie par l'A β puisque l'absence du GPR84 induit des changements très modestes au niveau du nombre total de microglie dans le cerveau excluant la possibilité d'une prolifération microgliale affectée. Cette hypothèse est d'ailleurs supportée par l'étude de McMahon et collègues. Dans leur modèle de neuropathie périphérique, la prolifération des macrophages Iba1⁺

résidents sur le site de lésion au niveau du nerf sciatique n'est pas affectée chez les souris GPR84^{-/-} (Nicol et al., 2015). Cependant, les auteurs rapportent que la déficience en GPR84 induit un profil anti-inflammatoire des macrophages supporté par l'augmentation de l'expression de l'IL-10 et la diminution de celle d'IL-6, TNF α , CCL2 et CCL3. Ces résultats indiquent que le GPR84 régulerait l'état d'activation de macrophages/microglie Iba1⁺ et non leur nombre dans le tissu lésé.

Il faudrait aussi examiner les caractéristiques de la maturation et de l'aspect moléculaire de la fonction microgliale en absence du GPR84. Il a récemment été rapporté que le GPR43, un autre récepteur orphelin couplé à la protéine G s'activant par des acides gras de courte chaîne, serait essentiel pour la maturation et la fonction de la microglie. La déficience du GPR43 (appelé aussi FFAR2) n'affecte pas la densité de la microglie, mais entraîne des malformations majeures telles qu'une augmentation de la longueur dendritique, de la complexité des prolongements et du volume total de la cellule microgliale (Erny et al., 2015). La même étude a montré que ces malformations de la microglie sont présentes aussi chez des souris axéniques (*germ-free*) qui sont privées de tout microorganisme même ceux de l'intestin. De plus, chez ces souris la maturation de la microglie, caractérisée par l'augmentation du pourcentage de la microglie CD115⁺, F4/80⁺ et CD31⁺, semble affectée (Erny et al., 2015; Kierdorf et al., 2013). Suite à une activation LPS ou une contamination virale cette microglie immature présente des perturbations de la réponse immunitaire innée comparée à la microglie des souris élevées dans des conditions SPS (sans pathogènes spécifiques) (Erny et al., 2015). Cette réponse dérégulée est surtout caractérisée par une induction atténuée de facteurs pro-inflammatoires tels que TNF α , IL-1 β et M-CSF (*macrophage-stimulating colony factor*). Toutefois, les souris GPR43^{-/-} n'ont jamais été étudiées dans le cadre des maladies neuroinflammatoires permettant de comprendre l'impact de la dérégulation de l'immunité innée chez ces souris. De plus, les auteurs n'ont jamais évalué comment l'état de maturation de la microglie pouvait affecter les fonctions cognitives des souris. De façon similaire au GPR43, la déficience du GPR84 dans le cerveau pourrait affecter la maturation et la fonction microgliale, déréguler la réponse immunitaire dans notre modèle d'Alzheimer et expliquer l'effet neurotoxique que nous avons observé. Cette hypothèse valoriserait l'implication de la signalisation des acides gras via GPR43 ou GPR84 durant la maturation et l'activation de la microglie pour acquérir des propriétés ciblant la protection du SNC. Tout de même, il serait important de noter que selon nos données du labyrinthe aquatique en forme de T, la déficience du GPR84 seule ne semble pas affecter au moins certains aspects cognitifs chez les souris à l'âge de six mois (non publiés). Plus d'études seront nécessaires pour clarifier les mécanismes d'actions du GPR84 dans la neuroinflammation.

En conclusion, nos travaux ont permis d'approfondir les connaissances sur l'action des cellules myéloïdes dans des conditions neuroinflammatoires telles que la sclérose en plaques et la maladie d'Alzheimer. La poursuite des études dans ce domaine de recherche est essentielle afin de préciser l'action de chaque population leucocytaire dans le SNC afin de mieux apprécier l'impact de l'activation du système immunitaire inné sur la progression des maladies neurodégénératives. Ainsi, le savoir généré par ces études permettra d'envisager des interventions ciblant les molécules spécifiques, comme le GPR84, pour contrer la neurodégénérescence et réparer le tissu nerveux à la suite des blessures.

Bibliographie

Abi Abdallah, DS, Egan, CE, Butcher, BA, Denkers, EY (2011) Mouse neutrophils are professional antigen-presenting cells programmed to instruct Th1 and Th17 T-cell differentiation. *Int Immunol*, 23:317–326.

Ajami, B, Bennett, JL, Krieger, C, McNagny, KM, Rossi, FM (2011) Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool. *Nat Neurosci*, 14:1142–1149.

Akiyama, H, Arai, T, Kondo, H, Tanno, E, Haga, C, Ikeda, K (2000) Cell mediators of inflammation in the Alzheimer disease brain. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 14 Suppl 1:S47–S53.

Akiyama, H, Kondo, H, Mori, H, Kametani, F, Nishimura, T, Ikeda, K, Kato, M, McGeer, PL (1996) The amino-terminally truncated forms of amyloid beta-protein in brain macrophages in the ischemic lesions of Alzheimer's disease patients. *Neurosci Lett*, 219:115–118.

Alvarez, JI, Cayrol, R, Prat, A (2011) Disruption of central nervous system barriers in multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta*, 1812:252–264.

Alvarez, JI, Saint-Laurent, O, Godschalk, A, Terouz, S, Briels, C, Larouche, S, Bourbonniere, L, Laroche, C, Prat, A (2015) Focal disturbances in the blood-brain barrier are associated with formation of neuroinflammatory lesions. *Neurobiol Dis*, 74:14–24.

Anandasabapathy, N, Victora, GD, Meredith, M, Feder, R, Dong, B, Kluger, C, Yao, K, Dustin, ML, Nussenzweig, MC, Steinman, RM, Liu, K (2011) Flt3L controls the development of radiosensitive dendritic cells in the meninges and choroid plexus of the steady-state mouse brain. *J Exp Med*, 208:1695–1705.

Ascherio, A, Munger, KL (2007) Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann Neurol*, 61:288–299.

Aspelund, A, Antila, S, Proulx, ST, Karlsten, TV, Karaman, S, Detmar, M, Wiig, H, Alitalo, K (2015) A dural lymphatic vascular system that drains brain interstitial fluid and macromolecules. *J Exp Med*, 212:991–999.

Aube, B, Levesque, SA, Pare, A, Chamma, E, Kebir, H, Gorina, R, Lecuyer, MA, Alvarez, JI, De Koninck, Y, Engelhardt, B, Prat, A, Cote, D, Lacroix, S (2014) Neutrophils mediate blood-spinal cord barrier disruption in demyelinating neuroinflammatory diseases. *J Immunol*, 193:2438–2454.

Auffray, C, Fogg, DK, Narni-Mancinelli, E, Senechal, B, Trouillet, C, Saederup, N, Leemput, J, Bigot, K, Campisi, L, Abitbol, M, Molina, T, Charo, I, Hume, DA, Cumano, A, Lauvau, G, Geissmann, F (2009) CX3CR1⁺ CD115⁺ CD135⁺ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation. *J Exp Med*, 206:595–606.

Ballard, C, Gauthier, S, Corbett, A, Brayne, C, Aarsland, D, Jones, E (2011) Alzheimer's disease. *Lancet*, 377:1019–1031.

Bamberger, ME, Harris, ME, McDonald, DR, Husemann, J, Landreth, GE (2003) A cell surface receptor complex for fibrillar beta-amyloid mediates microglial activation. *J Neurosci*, 23:2665–2674.

- Baron, R, Babcock, AA, Nemirovsky, A, Finsen, B, Monsonego, A (2014) Accelerated microglial pathology is associated with Abeta plaques in mouse models of Alzheimer's disease. *Aging Cell*, 13:584–595.
- Barrow, CJ, Zagorski, MG (1991) Solution structures of beta peptide and its constituent fragments: relation to amyloid deposition. *Science*, 253:179–182.
- Bartholomaeus, I, Kawakami, N, Odoardi, F, Schlager, C, Miljkovic, D, Ellwart, JW, Klinkert, WE, Flugel-Koch, C, Issekutz, TB, Wekerle, H, Flugel, A (2009) Effector T cell interactions with meningeal vascular structures in nascent autoimmune CNS lesions. *Nature*, 462:94–98.
- Beaulieu, JM, Espinoza, S, Gainetdinov, RR (2015) Dopamine receptors - IUPHAR Review 13. *Br J Pharmacol*, 172:1–23.
- Becher, B, Segal, BM (2011) T(H)17 cytokines in autoimmune neuro-inflammation. *Curr Opin Immunol*, 23:707–712.
- Bechmann, I, Galea, I, Perry, VH (2007) What is the blood-brain barrier (not)? *Trends Immunol*, 28:5–11.
- Bedard, A, Tremblay, P, Chernomorez, A, Vallieres, L (2007) Identification of genes preferentially expressed by microglia and upregulated during cuprizone-induced inflammation. *Glia*, 55:777–789.
- Bennouna, S, Bliss, SK, Curiel, TJ, Denkers, EY (2003) Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. *J Immunol*, 171:6052–6058.
- Berglof, E, Andre, R, Renshaw, BR, Allan, SM, Lawrence, CB, Rothwell, NJ, Pinteaux, E (2003) IL-1Rrp2 expression and IL-1F9 (IL-1H1) actions in brain cells. *J Neuroimmunol*, 139:36–43.
- Bettelli, E, Pagany, M, Weiner, HL, Lington, C, Sobel, RA, Kuchroo, VK (2003) Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *J Exp Med*, 197:1073–1081.
- Bittner, T, Burgold, S, Dorostkar, MM, Fuhrmann, M, Wegenast-Braun, BM, Schmidt, B, Kretzschmar, H, Herms, J (2012) Amyloid plaque formation precedes dendritic spine loss. *Acta Neuropathol*, 124:797–807.
- Bjarnadottir, TK, Gloriam, DE, Hellstrand, SH, Kristiansson, H, Fredriksson, R, Schioth, HB (2006) Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse. *Genomics*, 88:263–273.
- Blennow, K, de Leon, MJ, Zetterberg, H (2006) Alzheimer's disease. *Lancet*, 368:387–403.
- Blumberg, H, Dinh, H, Dean, CJ, Trueblood, ES, Bailey, K, Shows, D, Bhagavathula, N, Aslam, MN, Varani, J, Towne, JE, Sims, JE (2010) IL-1RL2 and its ligands contribute to the cytokine network in psoriasis. *J Immunol*, 185:4354–4362.
- Blumberg, H, Dinh, H, Trueblood, ES, Pretorius, J, Kugler, D, Weng, N, Kanaly, ST, Towne, JE, Willis, CR, Kuechle, MK, Sims, JE, Peschon, JJ (2007) Opposing activities of two novel members of the IL-1 ligand family regulate skin inflammation. *J Exp Med*, 204:2603–2614.

Boche, D, Perry, VH, Nicoll, JA (2013) Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 39:3–18.

Borregaard, N (2010) Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*, 33:657–670.

Bouchard, C, Page, J, Bedard, A, Tremblay, P, Vallieres, L (2007) G protein-coupled receptor 84, a microglia-associated protein expressed in neuroinflammatory conditions. *Glia*, 55:790–800.

Bozoyan, L, Dumas, A, Patenaude, A, Vallieres, L (2015) Interleukin-36gamma is expressed by neutrophils and can activate microglia, but has no role in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflammation*, 12:173.

Braak, H, Braak, E (1991) Demonstration of amyloid deposits and neurofibrillary changes in whole brain sections. *Brain Pathol*, 1:213–216.

Brown, DA, Sawchenko, PE (2007) Time course and distribution of inflammatory and neurodegenerative events suggest structural bases for the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Comp Neurol*, 502:236–260.

Buljevac, D, Flach, HZ, Hop, WC, Hijdra, D, Laman, JD, Savelkoul, HF, van Der Meche, FG, van Doorn, PA, Hintzen, RQ (2002) Prospective study on the relationship between infections and multiple sclerosis exacerbations. *Brain*, 125:952–960.

Burt, RK, Fassas, A, Snowden, J, van Laar, JM, Kozak, T, Wulffraat, NM, Nash, RA, Dunbar, CE, Arnold, R, Prentice, G, Bingham, S, Marmont, AM, McSweeney, PA (2001) Collection of hematopoietic stem cells from patients with autoimmune diseases. *Bone Marrow Transplant*, 28:1–12.

Butovsky, O, Jedrychowski, MP, Moore, CS, Cialic, R, Lanser, AJ, Gabriely, G, Koeglsperger, T, Dake, B, Wu, PM, Doykan, CE, Fanek, Z, Liu, L, Chen, Z, Rothstein, JD, Ransohoff, RM, Gygi, SP, Antel, JP, Weiner, HL (2014) Identification of a unique TGF-beta-dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat Neurosci*, 17:131–143.

Cameron, B, Landreth, GE (2010) Inflammation, microglia, and Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*, 37:503–509.

Campbell, SJ, Meier, U, Mardiguiian, S, Jiang, Y, Littleton, ET, Bristow, A, Relton, J, Connor, TJ, Anthony, DC (2010) Sickness behaviour is induced by a peripheral CXC-chemokine also expressed in multiple sclerosis and EAE. *Brain Behav Immun*, 24:738–746.

Cardona, AE, Pioro, EP, Sasse, ME, Kostenko, V, Cardona, SM, Dijkstra, IM, Huang, D, Kidd, G, Dombrowski, S, Dutta, R, Lee, JC, Cook, DN, Jung, S, Lira, SA, Littman, DR, Ransohoff, RM (2006) Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat Neurosci*, 9:917–924.

Carlson, T, Kroenke, M, Rao, P, Lane, TE, Segal, B (2008) The Th17-ELR+ CXC chemokine pathway is essential for the development of central nervous system autoimmune disease. *J Exp Med*, 205:811–823.

Carrier, Y, Ma, HL, Ramon, HE, Napierata, L, Small, C, O'Toole, M, Young, DA, Fouser, LA, Nickerson-Nutter, C, Collins, M, Dunussi-Joannopoulos, K, Medley, QG (2011) Inter-regulation of Th17 cytokines and the IL-36 cytokines in vitro and in vivo: implications in psoriasis pathogenesis. *J Invest Dermatol*, 131:2428–2437.

Chakrabarty, P, Ceballos-Diaz, C, Beccard, A, Janus, C, Dickson, D, Golde, TE, Das, P (2010a) IFN-gamma promotes complement expression and attenuates amyloid plaque deposition in amyloid beta precursor protein transgenic mice. *J Immunol*, 184:5333–5343.

Chakrabarty, P, Herring, A, Ceballos-Diaz, C, Das, P, Golde, TE (2011) Hippocampal expression of murine TNFalpha results in attenuation of amyloid deposition in vivo. *Mol Neurodegener*, 6:16.

Chakrabarty, P, Jansen-West, K, Beccard, A, Ceballos-Diaz, C, Levites, Y, Verbeeck, C, Zubair, AC, Dickson, D, Golde, TE, Das, P (2010b) Massive gliosis induced by interleukin-6 suppresses Abeta deposition in vivo: evidence against inflammation as a driving force for amyloid deposition. *FASEB J*, 24:548–559.

Chakrabarty, P, Li, A, Ceballos-Diaz, C, Eddy, JA, Funk, CC, Moore, B, DiNunno, N, Rosario, AM, Cruz, PE, Verbeeck, C, Sacino, A, Nix, S, Janus, C, Price, ND, Das, P, Golde, TE (2015) IL-10 alters immunoproteostasis in APP mice, increasing plaque burden and worsening cognitive behavior. *Neuron*, 85:519–533.

Chakrabarty, P, Tianbai, L, Herring, A, Ceballos-Diaz, C, Das, P, Golde, TE (2012) Hippocampal expression of murine IL-4 results in exacerbation of amyloid deposition. *Mol Neurodegener*, 7:36.

Chinnery, HR, Ruitenber, MJ, McMenamin, PG (2010) Novel characterization of monocyte-derived cell populations in the meninges and choroid plexus and their rates of replenishment in bone marrow chimeric mice. *J Neuropathol Exp Neurol*, 69:896–909.

Chiu, IM, Morimoto, ET, Goodarzi, H, Liao, JT, O’Keeffe, S, Phatnani, HP, Muratet, M, Carroll, MC, Levy, S, Tavazoie, S, Myers, RM, Maniatis, T (2013) A neurodegeneration-specific gene-expression signature of acutely isolated microglia from an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Cell Rep*, 4:385–401.

Cho, SH, Sun, B, Zhou, Y, Kauppinen, TM, Halabisky, B, Wes, P, Ransohoff, RM, Gan, L (2011) CX3CR1 protein signaling modulates microglial activation and protects against plaque-independent cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem*, 286:32713–32722.

Choi, S, Schwartz, RH (2007) Molecular mechanisms for adaptive tolerance and other T cell anergy models. *Semin Immunol*, 19:140–152.

Christy, AL, Walker, ME, Hessner, MJ, Brown, MA (2013) Mast cell activation and neutrophil recruitment promotes early and robust inflammation in the meninges in EAE. *J Autoimmun*, 42:50–61.

Chung, H, Brazil, MI, Soe, TT, Maxfield, FR (1999) Uptake, degradation, and release of fibrillar and soluble forms of Alzheimer’s amyloid beta-peptide by microglial cells. *J Biol Chem*, 274:32301–32308.

Chung, Y, Chang, SH, Martinez, GJ, Yang, XO, Nurieva, R, Kang, HS, Ma, L, Watowich, SS, Jetten, AM, Tian, Q, Dong, C (2009) Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity*, 30:576–587.

Chustz, RT, Nagarkar, DR, Puposki, JA, Favoreto, SJ, Avila, PC, Schleimer, RP, Kato, A (2011) Regulation and function of the IL-1 family cytokine IL-1F9 in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 45:145–153.

- Codarri, L, Gyulveszi, G, Tosevski, V, Hesske, L, Fontana, A, Magnenat, L, Suter, T, Becher, B (2011) ROR γ drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat Immunol*, 12:560–567.
- Colton, CA, Mott, RT, Sharpe, H, Xu, Q, Van Nostrand, WE, Vitek, MP (2006) Expression profiles for macrophage alternative activation genes in AD and in mouse models of AD. *J Neuroinflammation*, 3:27.
- Costelloe, C, Watson, M, Murphy, A, McQuillan, K, Loscher, C, Armstrong, ME, Garlanda, C, Mantovani, A, O'Neill, LA, Mills, KH, Lynch, MA (2008) IL-1F5 mediates anti-inflammatory activity in the brain through induction of IL-4 following interaction with SIGIRR/TIR8. *J Neurochem*, 105:1960–1969.
- Croxford, AL, Kurschus, FC, Waisman, A (2011) Mouse models for multiple sclerosis: historical facts and future implications. *Biochim Biophys Acta*, 1812:177–183.
- D'Andrea, MR, Cole, GM, Ard, MD (2004) The microglial phagocytic role with specific plaque types in the Alzheimer disease brain. *Neurobiol Aging*, 25:675–683.
- Dale, RC, Banwell, B, Bar-Or, A, Brilot, F (2012) Autoantibodies against aquaporin-4 and myelin oligodendrocyte glycoprotein in paediatric CNS demyelination: Recent developments and future directions. *Mult Scler Relat Disord*, 1:116–122.
- Dalmau, I, Vela, JM, Gonzalez, B, Finsen, B, Castellano, B (2003) Dynamics of microglia in the developing rat brain. *J Comp Neurol*, 458:144–157.
- Davalos, D, Grutzendler, J, Yang, G, Kim, JV, Zuo, Y, Jung, S, Littman, DR, Dustin, ML, Gan, WB (2005) ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci*, 8:752–758.
- De Filippo, K, Dudeck, A, Hasenberg, M, Nye, E, van Rooijen, N, Hartmann, K, Gunzer, M, Roers, A, Hogg, N (2013) Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation. *Blood*, 121:4930–4937.
- Debets, R, Timans, JC, Homey, B, Zurawski, S, Sana, TR, Lo, S, Wagner, J, Edwards, G, Clifford, T, Menon, S, Bazan, JF, Kastelein, RA (2001) Two novel IL-1 family members, IL-1 delta and IL-1 epsilon, function as an antagonist and agonist of NF-kappa B activation through the orphan IL-1 receptor-related protein 2. *J Immunol*, 167:1440–1446.
- Derer, A, Groetsch, B, Harre, U, Bohm, C, Towne, J, Schett, G, Frey, S, Hueber, AJ (2014) Blockade of IL-36 receptor signaling does not prevent from TNF-induced arthritis. *PLoS One*, 9:e101954.
- Dinareello, CA, Simon, A, van der Meer, JW (2012) Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nat Rev Drug Discov*, 11:633–652.
- Dumas, A, Amiabile, N, de Rivero Vaccari, JP, Chae, JJ, Keane, RW, Lacroix, S, Vallieres, L (2014) The inflammasome pyrin contributes to pertussis toxin-induced IL-1beta synthesis, neutrophil intravascular crawling and autoimmune encephalomyelitis. *PLoS Pathog*, 10:e1004150.
- Durafourt, BA, Moore, CS, Zammit, DA, Johnson, TA, Zaguia, F, Guiot, MC, Bar-Or, A, Antel, JP (2012) Comparison of polarization properties of human adult microglia and blood-derived macrophages. *Glia*, 60:717–727.
- El Khoury, JB, Moore, KJ, Means, TK, Leung, J, Terada, K, Toft, M, Freeman, MW, Luster, AD (2003) CD36 mediates the innate host response to beta-amyloid. *J Exp Med*, 197:1657–1666.

Erny, D, Hrabe de Angelis, AL, Jaitin, D, Wieghofer, P, Staszewski, O, David, E, Keren-Shaul, H, Mhlakoi, T, Jakobshagen, K, Buch, T, Schwierzeck, V, Utermohlen, O, Chun, E, Garrett, WS, McCoy, KD, Diefenbach, A, Staeheli, P, Stecher, B, Amit, I, Prinz, M (2015) Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nat Neurosci*, 18:965–977.

Farooq, M, Nakai, H, Fujimoto, A, Fujikawa, H, Matsuyama, A, Kariya, N, Aizawa, A, Fujiwara, H, Ito, M, Shimomura, Y (2013) Mutation analysis of the IL36RN gene in 14 Japanese patients with generalized pustular psoriasis. *Hum Mutat*, 34:176–183.

Fife, BT, Huffnagle, GB, Kuziel, WA, Karpus, WJ (2000) CC chemokine receptor 2 is critical for induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*, 192:899–905.

Finder, VH, Glockshuber, R (2007) Amyloid-beta aggregation. *Neurodegener Dis*, 4:13–27.

Fletcher, JM, Lalor, SJ, Sweeney, CM, Tubridy, N, Mills, KH (2010) T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol*, 162:1–11.

Foster, AM, Baliwag, J, Chen, CS, Guzman, AM, Stoll, SW, Gudjonsson, JE, Ward, NL, Johnston, A (2014) IL-36 promotes myeloid cell infiltration, activation, and inflammatory activity in skin. *J Immunol*, 192:6053–6061.

Frackowiak, J, Wisniewski, HM, Wegiel, J, Merz, GS, Iqbal, K, Wang, KC (1992) Ultrastructure of the microglia that phagocytose amyloid and the microglia that produce beta-amyloid fibrils. *Acta Neuropathol*, 84:225–233.

Frey, S, Derer, A, Messbacher, ME, Baeten, DL, Bugatti, S, Montecucco, C, Schett, G, Hueber, AJ (2013) The novel cytokine interleukin-36alpha is expressed in psoriatic and rheumatoid arthritis synovium. *Ann Rheum Dis*, 72:1569–1574.

Frohman, EM, Racke, MK, Raine, CS (2006) Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med*, 354:942–955.

Fujita, T, Matsuoka, T, Honda, T, Kabashima, K, Hirata, T, Narumiya, S (2011) A GPR40 agonist GW9508 suppresses CCL5, CCL17, and CXCL10 induction in keratinocytes and attenuates cutaneous immune inflammation. *J Invest Dermatol*, 131:1660–1667.

Fulton, RB, Hamilton, SE, Xing, Y, Best, JA, Goldrath, AW, Hogquist, KA, Jameson, SC (2015) The TCR's sensitivity to self peptide-MHC dictates the ability of naive CD8(+) T cells to respond to foreign antigens. *Nat Immunol*, 16:107–117.

Gamo, K, Kiryu-Seo, S, Konishi, H, Aoki, S, Matsushima, K, Wada, K, Kiyama, H (2008) G-protein-coupled receptor screen reveals a role for chemokine receptor CCR5 in suppressing microglial neurotoxicity. *J Neurosci*, 28:11980–11988.

Garlanda, C, Dinarello, CA, Mantovani, A (2013) The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity*, 39:1003–1018.

Garlanda, C, Mantovani, A (2013) Ligands and receptors of the interleukin-1 family in immunity and disease. *Front Immunol*, 4:396.

Gaupp, S, Pitt, D, Kuziel, WA, Cannella, B, Raine, CS (2003) Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in CCR2(-/-) mice: susceptibility in multiple strains. *Am J Pathol*, 162:139–150.

Geissmann, F, Manz, MG, Jung, S, Sieweke, MH, Merad, M, Ley, K (2010) Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*, 327:656–661.

Ginhoux, F, Greter, M, Leboeuf, M, Nandi, S, See, P, Gokhan, S, Mehler, MF, Conway, SJ, Ng, LG, Stanley, ER, Samokhvalov, IM, Merad, M (2010) Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*, 330:841–845.

Goldacre, MJ, Wotton, CJ, Seagroatt, V, Yeates, D (2004) Multiple sclerosis after infectious mononucleosis: record linkage study. *J Epidemiol Community Health*, 58:1032–1035.

Goldenberg, MM (2012) Multiple sclerosis review. *P T*, 37:175–184.

Gowran, A, Noonan, J, Campbell, VA (2011) The multiplicity of action of cannabinoids: implications for treating neurodegeneration. *CNS Neurosci Ther*, 17:637–644.

Grathwohl, SA, Kalin, RE, Bolmont, T, Prokop, S, Winkelmann, G, Kaeser, SA, Odenthal, J, Radde, R, Eldh, T, Gandy, S, Aguzzi, A, Staufenbiel, M, Mathews, PM, Wolburg, H, Heppner, FL, Jucker, M (2009) Formation and maintenance of Alzheimer's disease beta-amyloid plaques in the absence of microglia. *Nat Neurosci*, 12:1361–1363.

Gresnigt, MS, Rosler, B, Jacobs, CW, Becker, KL, Joosten, LA, van der Meer, JW, Netea, MG, Dinarello, CA, van de Veerdonk, FL (2013) The IL-36 receptor pathway regulates *Aspergillus fumigatus*-induced Th1 and Th17 responses. *Eur J Immunol*, 43:416–426.

Greter, M, Heppner, FL, Lemos, MP, Odermatt, BM, Goebels, N, Laufer, T, Noelle, RJ, Becher, B (2005) Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Nat Med*, 11:328–334.

Griffin, WS, Sheng, JG, Royston, MC, Gentleman, SM, McKenzie, JE, Graham, DI, Roberts, GW, Mrak, RE (1998) Glial-neuronal interactions in Alzheimer's disease: the potential role of a 'cytokine cycle' in disease progression. *Brain Pathol*, 8:65–72.

Guillot-Sestier, MV, Doty, KR, Gate, D, Rodriguez, JJ, Leung, BP, Rezai-Zadeh, K, Town, T (2015) IL10 deficiency rebalances innate immunity to mitigate Alzheimer-like pathology. *Neuron*, 85:534–548.

Haass, C (2004) Take five--BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *EMBO J*, 23:483–488.

Haass, C, Selkoe, DJ (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8:101–112.

Halle, A, Hornung, V, Petzold, GC, Stewart, CR, Monks, BG, Reinheckel, T, Fitzgerald, KA, Latz, E, Moore, KJ, Golenbock, DT (2008) The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat Immunol*, 9:857–865.

Handel, AE, Williamson, AJ, Disanto, G, Handunnetthi, L, Giovannoni, G, Ramagopalan, SV (2010) An updated meta-analysis of risk of multiple sclerosis following infectious mononucleosis. *PLoS One*, 5

Hara, T, Kashihara, D, Ichimura, A, Kimura, I, Tsujimoto, G, Hirasawa, A (2014) Role of free fatty acid receptors in the regulation of energy metabolism. *Biochim Biophys Acta*, 1841:1292–1300.

Hardy, J, Selkoe, DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297:353–356.

Harper, JD, Lansbury, PTJ (1997) Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. *Annu Rev Biochem*, 66:385–407.

Hasenberg, A, Hasenberg, M, Mann, L, Neumann, F, Borkenstein, L, Stecher, M, Kraus, A, Engel, DR, Klingberg, A, Seddigh, P, Abdullah, Z, Klebow, S, Engelmann, S, Reinhold, A, Brandau, S, Seeling, M, Waisman, A, Schraven, B, Gothert, JR, Nimmerjahn, F, Gunzer, M (2015) Catchup: a mouse model for imaging-based tracking and modulation of neutrophil granulocytes. *Nat Methods*, 12:445–452.

Herges, K, de Jong, BA, Kolkowitz, I, Dunn, C, Mandelbaum, G, Ko, RM, Maini, A, Han, MH, Killestein, J, Polman, C, Goodyear, AL, Dunn, J, Steinman, L, Axtell, RC (2012) Protective effect of an elastase inhibitor in a neuromyelitis optica-like disease driven by a peptide of myelin oligodendroglial glycoprotein. *Mult Scler*, 18:398–408.

Hernan, MA, Zhang, SM, Lipworth, L, Olek, MJ, Ascherio, A (2001) Multiple sclerosis and age at infection with common viruses. *Epidemiology*, 12:301–306.

Hickman, SE, Allison, EK, El Khoury, J (2008) Microglial dysfunction and defective beta-amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. *J Neurosci*, 28:8354–8360.

Hickman, SE, Kingery, ND, Ohsumi, TK, Borowsky, ML, Wang, LC, Means, TK, El Khoury, J (2013) The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing. *Nat Neurosci*, 16:1896–1905.

Hogquist, KA, Baldwin, TA, Jameson, SC (2005) Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat Rev Immunol*, 5:772–782.

Hogquist, KA, Jameson, SC (2014) The self-obsession of T cells: how TCR signaling thresholds affect fate 'decisions' and effector function. *Nat Immunol*, 15:815–823.

Holmoy, T, Hestvik, AL (2008) Multiple sclerosis: immunopathogenesis and controversies in defining the cause. *Curr Opin Infect Dis*, 21:271–278.

Huang, DR, Wang, J, Kivisakk, P, Rollins, BJ, Ransohoff, RM (2001) 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*, 193:713–726.

Huitinga, I, van Rooijen, N, de Groot, CJ, Uitdehaag, BM, Dijkstra, CD (1990) Suppression of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats after elimination of macrophages. *J Exp Med*, 172:1025–1033.

Ishizu, T, Osoegawa, M, Mei, FJ, Kikuchi, H, Tanaka, M, Takakura, Y, Minohara, M, Murai, H, Mihara, F, Taniwaki, T, Kira, J (2005) Intrathecal activation of the IL-17/IL-8 axis in opticospinal multiple sclerosis. *Brain*, 128:988–1002.

Izickson, L, Klein, RS, Charo, IF, Weiner, HL, Luster, AD (2000) Resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis in mice lacking the CC chemokine receptor (CCR)2. *J Exp Med*, 192:1075–1080.

Jacob, A, Saadoun, S, Kitley, J, Leite, M, Palace, J, Schon, F, Papadopoulos, MC (2012) Detrimental role of granulocyte-colony stimulating factor in neuromyelitis optica: clinical case and histological evidence. *Mult Scler*, 18:1801–1803.

Jakubzick, C, Gautier, EL, Gibbings, SL, Sojka, DK, Schlitzer, A, Johnson, TE, Ivanov, S, Duan, Q, Bala, S, Condon, T, van Rooijen, N, Grainger, JR, Belkaid, Y, Ma'ayan, A, Riches, DW, Yokoyama, WM, Ginhoux, F, Henson, PM, Randolph, GJ (2013) Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. *Immunity*, 39:599–610.

Jiao, Y, Fryer, JP, Lennon, VA, Jenkins, SM, Quek, AM, Smith, CY, McKeon, A, Costanzi, C, Iorio, R, Weinshenker, BG, Wingerchuk, DM, Shuster, EA, Lucchinetti, CF, Pittock, SJ (2013) Updated estimate of AQP4-IgG serostatus and disability outcome in neuromyelitis optica. *Neurology*, 81:1197–1204.

Jimenez, S, Baglietto-Vargas, D, Caballero, C, Moreno-Gonzalez, I, Torres, M, Sanchez-Varo, R, Ruano, D, Vizueté, M, Gutierrez, A, Vitorica, J (2008) Inflammatory response in the hippocampus of PS1M146L/APP751SL mouse model of Alzheimer's disease: age-dependent switch in the microglial phenotype from alternative to classic. *J Neurosci*, 28:11650–11661.

Johnston, A, Xing, X, Guzman, AM, Riblett, M, Loyd, CM, Ward, NL, Wohn, C, Prens, EP, Wang, F, Maier, LE, Kang, S, Voorhees, JJ, Elder, JT, Gudjonsson, JE (2011) IL-1F5, -F6, -F8, and -F9: a novel IL-1 family signaling system that is active in psoriasis and promotes keratinocyte antimicrobial peptide expression. *J Immunol*, 186:2613–2622.

Kallendrusch, S, Kremzow, S, Nowicki, M, Grabiec, U, Winkelmann, R, Benz, A, Kraft, R, Bechmann, I, Dehghani, F, Koch, M (2013) The G protein-coupled receptor 55 ligand I-alpha-lysophosphatidylinositol exerts microglia-dependent neuroprotection after excitotoxic lesion. *Glia*, 61:1822–1831.

Kanazawa, N, Nakamura, T, Mikita, N, Furukawa, F (2013) Novel IL36RN mutation in a Japanese case of early onset generalized pustular psoriasis. *J Dermatol*, 40:749–751.

Kang, Z, Altuntas, CZ, Gulen, MF, Liu, C, Giltiay, N, Qin, H, Liu, L, Qian, W, Ransohoff, RM, Bergmann, C, Stohlman, S, Tuohy, VK, Li, X (2010) Astrocyte-restricted ablation of interleukin-17-induced Act1-mediated signaling ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *Immunity*, 32:414–425.

Kawakami, N, Lassmann, S, Li, Z, Odoardi, F, Ritter, T, Ziemssen, T, Klinkert, WE, Ellwart, JW, Bradl, M, Krivacic, K, Lassmann, H, Ransohoff, RM, Volk, HD, Wekerle, H, Linington, C, Flugel, A (2004) The activation status of neuroantigen-specific T cells in the target organ determines the clinical outcome of autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*, 199:185–197.

Kern, A, Mavrikaki, M, Ullrich, C, Albarran-Zeckler, R, Brantley, AF, Smith, RG (2015) Hippocampal Dopamine/DRD1 Signaling Dependent on the Ghrelin Receptor. *Cell*, 163:1176–1190.

Kierdorf, K, Erny, D, Goldmann, T, Sander, V, Schulz, C, Perdiguero, EG, Wieghofer, P, Heinrich, A, Riemke, P, Holscher, C, Muller, DN, Luckow, B, Brouwer, T, Debowski, K, Fritz, G, Opdenakker, G, Diefenbach, A, Biber, K, Heikenwalder, M, Geissmann, F, Rosenbauer, F, Prinz, M (2013) Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nat Neurosci*, 16:273–280.

King, IL, Dickendesher, TL, Segal, BM (2009) Circulating Ly-6C⁺ myeloid precursors migrate to the CNS and play a pathogenic role during autoimmune demyelinating disease. *Blood*, 113:3190–3197.

- Kivisakk, P, Imitola, J, Rasmussen, S, Elyaman, W, Zhu, B, Ransohoff, RM, Khoury, SJ (2009) Localizing central nervous system immune surveillance: meningeal antigen-presenting cells activate T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann Neurol*, 65:457–469.
- Koedel, U, Klein, M, Pfister, HW (2010) New understandings on the pathophysiology of bacterial meningitis. *Curr Opin Infect Dis*, 23:217–223.
- Koenigsnecht-Talboo, J, Landreth, GE (2005) Microglial phagocytosis induced by fibrillar beta-amyloid and IgGs are differentially regulated by proinflammatory cytokines. *J Neurosci*, 25:8240–8249.
- Kolaczowska, E, Kubes, P (2013) Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 13:159–175.
- Kostic, M, Dzopalic, T, Zivanovic, S, Zivkovic, N, Cvetanovic, A, Stojanovic, I, Vojinovic, S, Marjanovic, G, Savic, V, Colic, M (2014) IL-17 and glutamate excitotoxicity in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Scand J Immunol*, 79:181–186.
- Krabbe, G, Halle, A, Matyash, V, Rinnenthal, JL, Eom, GD, Bernhardt, U, Miller, KR, Prokop, S, Kettenmann, H, Heppner, FL (2013) Functional impairment of microglia coincides with Beta-amyloid deposition in mice with Alzheimer-like pathology. *PLoS One*, 8:e60921.
- Kraft, AD, Harry, GJ (2011) Features of microglia and neuroinflammation relevant to environmental exposure and neurotoxicity. *Int J Environ Res Public Health*, 8:2980–3018.
- Kroenke, MA, Carlson, TJ, Andjelkovic, AV, Segal, BM (2008) 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*, 205:1535–1541.
- Kroenke, MA, Chensue, SW, Segal, BM (2010) EAE mediated by a non-IFN-gamma/non-IL-17 pathway. *Eur J Immunol*, 40:2340–2348.
- Kumar, S, McDonnell, PC, Lehr, R, Tierney, L, Tzimas, MN, Griswold, DE, Capper, EA, Tal-Singer, R, Wells, GI, Doyle, ML, Young, PR (2000) Identification and initial characterization of four novel members of the interleukin-1 family. *J Biol Chem*, 275:10308–10314.
- Kurschus, FC (2015) T cell mediated pathogenesis in EAE: Molecular mechanisms. *Biomed J*, 38:183–193.
- Kutzelnigg, A, Lucchinetti, CF, Stadelmann, C, Bruck, W, Rauschka, H, Bergmann, M, Schmidbauer, M, Parisi, JE, Lassmann, H (2005) Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain*, 128:2705–2712.
- LaFerla, FM, Green, KN, Oddo, S (2007) Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*, 8:499–509.
- Lagerstrom, MC, Schioth, HB (2008) Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 7:339–357.
- Lamacchia, C, Palmer, G, Rodriguez, E, Martin, P, Vigne, S, Seemayer, CA, Talabot-Ayer, D, Towne, JE, Gabay, C (2013) The severity of experimental arthritis is independent of IL-36 receptor signaling. *Arthritis Res Ther*, 15:R38.

Lampron, A, Larochelle, A, Laflamme, N, Prefontaine, P, Plante, MM, Sanchez, MG, Yong, VW, Stys, PK, Tremblay, ME, Rivest, S (2015) Inefficient clearance of myelin debris by microglia impairs remyelinating processes. *J Exp Med*, 212:481–495.

Lassmann, H (2011) Pathophysiology of inflammation and tissue injury in multiple sclerosis: what are the targets for therapy. *J Neurol Sci*, 306:167–169.

Latz, E, Xiao, TS, Stutz, A (2013) Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol*, 13:397–411.

Legoux, FP, Lim, JB, Cauley, AW, Dikiy, S, Ertelt, J, Mariani, TJ, Sparwasser, T, Way, SS, Moon, JJ (2015) CD4(+) T Cell Tolerance to Tissue-Restricted Self Antigens Is Mediated by Antigen-Specific Regulatory T Cells Rather Than Deletion. *Immunity*, 43:896–908.

Lennon, VA, Kryzer, TJ, Pittock, SJ, Verkman, AS, Hinson, SR (2005) IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *J Exp Med*, 202:473–477.

Ley, K (2014) The second touch hypothesis: T cell activation, homing and polarization. *F1000Res*, 3:37.

Lian, LH, Milora, KA, Manupipatpong, KK, Jensen, LE (2012) The double-stranded RNA analogue polyinosinic-polycytidylic acid induces keratinocyte pyroptosis and release of IL-36gamma. *J Invest Dermatol*, 132:1346–1353.

Lisak, RP (2007) Neurodegeneration in multiple sclerosis: defining the problem. *Neurology*, 68:S5–12; discussion S43.

Liu, L, Darnall, L, Hu, T, Choi, K, Lane, TE, Ransohoff, RM (2010) Myelin repair is accelerated by inactivating CXCR2 on nonhematopoietic cells. *J Neurosci*, 30:9074–9083.

Liu, Y, Hao, W, Letiembre, M, Walter, S, Kulanga, M, Neumann, H, Fassbender, K (2006) Suppression of microglial inflammatory activity by myelin phagocytosis: role of p47-PHOX-mediated generation of reactive oxygen species. *J Neurosci*, 26:12904–12913.

Liu, Y, Walter, S, Stagi, M, Cherny, D, Letiembre, M, Schulz-Schaeffer, W, Heine, H, Penke, B, Neumann, H, Fassbender, K (2005) LPS receptor (CD14): a receptor for phagocytosis of Alzheimer's amyloid peptide. *Brain*, 128:1778–1789.

Lock, C, Hermans, G, Pedotti, R, Brendolan, A, Schadt, E, Garren, H, Langer-Gould, A, Strober, S, Cannella, B, Allard, J, Klonowski, P, Austin, A, Lad, N, Kaminski, N, Galli, SJ, Oksenberg, JR, Raine, CS, Heller, R, Steinman, L (2002) Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med*, 8:500–508.

Lopes, KO, Sparks, DL, Streit, WJ (2008) Microglial dystrophy in the aged and Alzheimer's disease brain is associated with ferritin immunoreactivity. *Glia*, 56:1048–1060.

Louveau, A, Smirnov, I, Keyes, TJ, Eccles, JD, Rouhani, SJ, Peske, JD, Derecki, NC, Castle, D, Mandell, JW, Lee, KS, Harris, TH, Kipnis, J (2015) Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature*, 523:337–341.

Lovenberg, TW, Crowe, PD, Liu, C, Chalmers, DT, Liu, XJ, Liaw, C, Clevenger, W, Oltersdorf, T, De Souza, EB, Maki, RA (1996) Cloning of a cDNA encoding a novel interleukin-1 receptor related protein (IL 1R-rp2). *J Neuroimmunol*, 70:113–122.

Lucin, KM, O'Brien, CE, Bieri, G, Czirr, E, Moshier, KI, Abbey, RJ, Mastroeni, DF, Rogers, J, Spencer, B, Masliah, E, Wyss-Coray, T (2013) Microglial beclin 1 regulates retromer trafficking and phagocytosis and is impaired in Alzheimer's disease. *Neuron*, 79:873–886.

Magne, D, Palmer, G, Barton, JL, Mezin, F, Talabot-Ayer, D, Bas, S, Duffy, T, Noger, M, Guerne, PA, Nicklin, MJ, Gabay, C (2006) The new IL-1 family member IL-1F8 stimulates production of inflammatory mediators by synovial fibroblasts and articular chondrocytes. *Arthritis Res Ther*, 8:R80.

Majumdar, A, Chung, H, Dolios, G, Wang, R, Asamoah, N, Lobel, P, Maxfield, FR (2008) Degradation of fibrillar forms of Alzheimer's amyloid beta-peptide by macrophages. *Neurobiol Aging*, 29:707–715.

Mandrekar, S, Jiang, Q, Lee, CY, Koenigsnecht-Talboo, J, Holtzman, DM, Landreth, GE (2009) Microglia mediate the clearance of soluble A β through fluid phase macropinocytosis. *J Neurosci*, 29:4252–4262.

Mantovani, A, Cassatella, MA, Costantini, C, Jaillon, S (2011) Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*, 11:519–531.

Marrakchi, S, Guigue, P, Renshaw, BR, Puel, A, Pei, XY, Fraitag, S, Zribi, J, Bal, E, Cluzeau, C, Chrabieh, M, Towne, JE, Douangpanya, J, Pons, C, Mansour, S, Serre, V, Makni, H, Mahfoudh, N, Fakhfakh, F, Bodemer, C, Feingold, J, Hadj-Rabia, S, Favre, M, Genin, E, Sahbatou, M, Munnich, A, Casanova, JL, Sims, JE, Turki, H, Bachelez, H, Smahi, A (2011) Interleukin-36-receptor antagonist deficiency and generalized pustular psoriasis. *N Engl J Med*, 365:620–628.

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.

Marta, M, Meier, UC, Lobell, A (2009) Regulation of autoimmune encephalomyelitis by toll-like receptors. *Autoimmun Rev*, 8:506–509.

Martinon, F, Mayor, A, Tschopp, J (2009) The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol*, 27:229–265.

Martins, IC, Kuperstein, I, Wilkinson, H, Maes, E, Vanbrabant, M, Jonckheere, W, Van Gelder, P, Hartmann, D, D'Hooge, R, De Strooper, B, Schymkowitz, J, Rousseau, F (2008) Lipids revert inert A β amyloid fibrils to neurotoxic protofibrils that affect learning in mice. *EMBO J*, 27:224–233.

Marx, F, Blasko, I, Pavelka, M, Grubeck-Loebenstien, B (1998) The possible role of the immune system in Alzheimer's disease. *Exp Gerontol*, 33:871–881.

Maslowski, KM, Vieira, AT, Ng, A, Kranich, J, Sierro, F, Yu, D, Schilter, HC, Rolph, MS, Mackay, F, Artis, D, Xavier, RJ, Teixeira, MM, Mackay, CR (2009) Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*, 461:1282–1286.

Masters, SL, O'Neill, LA (2011) Disease-associated amyloid and misfolded protein aggregates activate the inflammasome. *Trends Mol Med*, 17:276–282.

Masui, R, Sasaki, M, Funaki, Y, Ogasawara, N, Mizuno, M, Iida, A, Izawa, S, Kondo, Y, Ito, Y, Tamura, Y, Yanamoto, K, Noda, H, Tanabe, A, Okaniwa, N, Yamaguchi, Y, Iwamoto, T, Kasugai, K (2013) G protein-coupled receptor 43 moderates gut inflammation through cytokine regulation from mononuclear cells. *Inflamm Bowel Dis*, 19:2848–2856.

Matousek, SB, Ghosh, S, Shafteel, SS, Kyrkanides, S, Olschowka, JA, O'Banion, MK (2012) Chronic IL-1beta-mediated neuroinflammation mitigates amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease without inducing overt neurodegeneration. *J Neuroimmune Pharmacol*, 7:156–164.

Matsuki, T, Nakae, S, Sudo, K, Horai, R, Iwakura, Y (2006) Abnormal T cell activation caused by the imbalance of the IL-1/IL-1R antagonist system is responsible for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Int Immunol*, 18:399–407.

McColl, SR, Staykova, MA, Wozniak, A, Fordham, S, Bruce, J, Willenborg, DO (1998) Treatment with anti-granulocyte antibodies inhibits the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 161:6421–6426.

McDonald, DR, Brunden, KR, Landreth, GE (1997) Amyloid fibrils activate tyrosine kinase-dependent signaling and superoxide production in microglia. *J Neurosci*, 17:2284–2294.

McGeer, PL, McGeer, EG (1998) Mechanisms of cell death in Alzheimer disease—immunopathology. *J Neural Transm Suppl*, 54:159–166.

McGowan, E, Pickford, F, Kim, J, Onstead, L, Eriksen, J, Yu, C, Skipper, L, Murphy, MP, Beard, J, Das, P, Jansen, K, Delucia, M, Lin, WL, Dolios, G, Wang, R, Eckman, CB, Dickson, DW, Hutton, M, Hardy, J, Golde, T (2005) Abeta42 is essential for parenchymal and vascular amyloid deposition in mice. *Neuron*, 47:191–199.

McHugh, D, Hu, SS, Rimmerman, N, Juknat, A, Vogel, Z, Walker, JM, Bradshaw, HB (2010) N-arachidonoyl glycine, an abundant endogenous lipid, potently drives directed cellular migration through GPR18, the putative abnormal cannabidiol receptor. *BMC Neurosci*, 11:44.

McMenamin, PG (1999) Distribution and phenotype of dendritic cells and resident tissue macrophages in the dura mater, leptomeninges, and choroid plexus of the rat brain as demonstrated in wholmount preparations. *J Comp Neurol*, 405:553–562.

Meda, L, Baron, P, Prat, E, Scarpini, E, Scarlato, G, Cassatella, MA, Rossi, F (1999) Proinflammatory profile of cytokine production by human monocytes and murine microglia stimulated with beta-amyloid[25-35]. *J Neuroimmunol*, 93:45–52.

Meda, L, Cassatella, MA, Szendrei, GI, Otvos, LJ, Baron, P, Villalba, M, Ferrari, D, Rossi, F (1995) Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma. *Nature*, 374:647–650.

Medina-Contreras, O, Harusato, A, Nishio, H, Flannigan, KL, Ngo, V, Leoni, G, Neumann, PA, Geem, D, Lili, LN, Ramadas, RA, Chassaing, B, Gewirtz, AT, Kohlmeier, JE, Parkos, CA, Towne, JE, Nusrat, A, Denning, TL (2015) Cutting Edge: IL-36 Receptor Promotes Resolution of Intestinal Damage. *J Immunol*,

Metzger, TC, Anderson, MS (2011) Control of central and peripheral tolerance by Aire. *Immunol Rev*, 241:89–103.

Meyer-Luehmann, M, Spires-Jones, TL, Prada, C, Garcia-Alloza, M, de Calignon, A, Rozkalne, A, Koenigsnecht-Talboo, J, Holtzman, DM, Bacskai, BJ, Hyman, BT (2008) Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature*, 451:720–724.

Mildner, A, Mack, M, Schmidt, H, Bruck, W, Djukic, M, Zabel, MD, Hille, A, Priller, J, Prinz, M (2009) CCR2+Ly-6Chi monocytes are crucial for the effector phase of autoimmunity in the central nervous system. *Brain*, 132:2487–2500.

Mildner, A, Schlevogt, B, Kierdorf, K, Bottcher, C, Erny, D, Kummer, MP, Quinn, M, Bruck, W, Bechmann, I, Heneka, MT, Priller, J, Prinz, M (2011) Distinct and non-redundant roles of microglia and myeloid subsets in mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 31:11159–11171.

Miller, DH, Leary, SM (2007) Primary-progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurol*, 6:903–912.

Miller, SD, McMahon, EJ, Schreiner, B, Bailey, SL (2007) Antigen presentation in the CNS by myeloid dendritic cells drives progression of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann N Y Acad Sci*, 1103:179–191.

Miron, VE, Boyd, A, Zhao, JW, Yuen, TJ, Ruckh, JM, Shadrach, JL, van Wijngaarden, P, Wagers, AJ, Williams, A, Franklin, RJ, French-Constant, C (2013) M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. *Nat Neurosci*, 16:1211–1218.

Mohammad, MG, Tsai, VW, Ruitenber, MJ, Hassanpour, M, Li, H, Hart, PH, Breit, SN, Sawchenko, PE, Brown, DA (2014) Immune cell trafficking from the brain maintains CNS immune tolerance. *J Clin Invest*, 124:1228–1241.

Muhr, P, Zeitvogel, J, Heitland, I, Werfel, T, Wittmann, M (2011) Expression of interleukin (IL)-1 family members upon stimulation with IL-17 differs in keratinocytes derived from patients with psoriasis and healthy donors. *Br J Dermatol*, 165:189–193.

Mutamba, S, Allison, A, Mahida, Y, Barrow, P, Foster, N (2012) Expression of IL-1Rrp2 by human myelomonocytic cells is unique to DCs and facilitates DC maturation by IL-1F8 and IL-1F9. *Eur J Immunol*, 42:607–617.

Naegele, M, Tillack, K, Reinhardt, S, Schippling, S, Martin, R, Sospedra, M (2012) Neutrophils in multiple sclerosis are characterized by a primed phenotype. *J Neuroimmunol*, 242:60–71.

Neumann, H, Wekerle, H (2013) Brain microglia: watchdogs with pedigree. *Nat Neurosci*, 16:253–255.

Nicklin, MJ, Barton, JL, Nguyen, M, FitzGerald, MG, Duff, GW, Kornman, K (2002) A sequence-based map of the nine genes of the human interleukin-1 cluster. *Genomics*, 79:718–725.

Nicol, LS, Dawes, JM, La Russa, F, Didangelos, A, Clark, AK, Gentry, C, Grist, J, Davies, JB, Malcangio, M, McMahon, SB (2015) The role of G-protein receptor 84 in experimental neuropathic pain. *J Neurosci*, 35:8959–8969.

Nimmerjahn, A, Kirchhoff, F, Helmchen, F (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, 308:1314–1318.

Njie, EG, Boelen, E, Stassen, FR, Steinbusch, HW, Borchelt, DR, Streit, WJ (2012) Ex vivo cultures of microglia from young and aged rodent brain reveal age-related changes in microglial function. *Neurobiol Aging*, 33:195.e1–195.12.

Odobasic, D, Kitching, AR, Yang, Y, O'Sullivan, KM, Muljadi, RC, Edgton, KL, Tan, DS, Summers, SA, Morand, EF, Holdsworth, SR (2013) Neutrophil myeloperoxidase regulates T-cell-driven tissue inflammation in mice by inhibiting dendritic cell function. *Blood*, 121:4195–4204.

Oh da, Y, Walenta, E, Akiyama, TE, Lagakos, WS, Lackey, D, Pessentheiner, AR, Sasik, R, Hah, N, Chi, TJ, Cox, JM, Powels, MA, Di Salvo, J, Sinz, C, Watkins, SM, Armando, AM, Chung, H, Evans, RM, Quehenberger, O, McNelis, J, Bogner-Strauss, JG, Olefsky, JM (2014) A Gpr120-selective agonist improves insulin resistance and chronic inflammation in obese mice. *Nat Med*, 20:942–947.

Oh, DY, Talukdar, S, Bae, EJ, Imamura, T, Morinaga, H, Fan, W, Li, P, Lu, WJ, Watkins, SM, Olefsky, JM (2010) GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell*, 142:687–698.

Onoufriadis, A, Simpson, MA, Pink, AE, Di Meglio, P, Smith, CH, Pullabhatla, V, Knight, J, Spain, SL, Nestle, FO, Burden, AD, Capon, F, Trembath, RC, Barker, JN (2011) Mutations in IL36RN/IL1F5 are associated with the severe episodic inflammatory skin disease known as generalized pustular psoriasis. *Am J Hum Genet*, 89:432–437.

Openshaw, H, Stuve, O, Antel, JP, Nash, R, Lund, BT, Weiner, LP, Kashyap, A, McSweeney, P, Forman, S (2000) Multiple sclerosis flares associated with recombinant granulocyte colony-stimulating factor. *Neurology*, 54:2147–2150.

Orre, M, Kamphuis, W, Osborn, LM, Jansen, AH, Kooijman, L, Bossers, K, Hol, EM (2014) Isolation of glia from Alzheimer's mice reveals inflammation and dysfunction. *Neurobiol Aging*, 35:2746–2760.

Paolicelli, RC, Bolasco, G, Pagani, F, Maggi, L, Scianni, M, Panzanelli, P, Giustetto, M, Ferreira, TA, Guiducci, E, Dumas, L, Ragozzino, D, Gross, CT (2011) Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science*, 333:1456–1458.

Paresce, DM, Ghosh, RN, Maxfield, FR (1996) Microglial cells internalize aggregates of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein via a scavenger receptor. *Neuron*, 17:553–565.

Pelletier, M, Maggi, L, Micheletti, A, Lazzeri, E, Tamassia, N, Costantini, C, Cosmi, L, Lunardi, C, Annunziato, F, Romagnani, S, Cassatella, MA (2010) Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood*, 115:335–343.

Pereira, WL, Reiche, EM, Kallaur, AP, Kaimen-Maciel, DR (2015) Epidemiological, clinical, and immunological characteristics of neuromyelitis optica: A review. *J Neurol Sci*, 355:7–17.

Perlmutter, LS, Barron, E, Chui, HC (1990) Morphologic association between microglia and senile plaque amyloid in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 119:32–36.

Ponomarev, ED, Shriver, LP, Maresz, K, Dittel, BN (2005) Microglial cell activation and proliferation precedes the onset of CNS autoimmunity. *J Neurosci Res*, 81:374–389.

Preissler, J, Grosche, A, Lede, V, Le Duc, D, Krugel, K, Matyash, V, Szulzewsky, F, Kallendrusch, S, Immig, K, Kettenmann, H, Bechmann, I, Schoneberg, T, Schulz, A (2015) Altered microglial phagocytosis in GPR34-deficient mice. *Glia*, 63:206–215.

Prinz, M, Priller, J (2014) Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. *Nat Rev Neurosci*, 15:300–312.

- Prinz, M, Priller, J, Sisodia, SS, Ransohoff, RM (2011) Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration. *Nat Neurosci*, 14:1227–1235.
- Prodinger, C, Bunse, J, Kruger, M, Schiefenhover, F, Brandt, C, Laman, JD, Greter, M, Immig, K, Heppner, F, Becher, B, Bechmann, I (2011) CD11c-expressing cells reside in the juxtavascular parenchyma and extend processes into the glia limitans of the mouse nervous system. *Acta Neuropathol*, 121:445–458.
- Prokop, S, Miller, KR, Heppner, FL (2013) Microglia actions in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, 126:461–477.
- Radde, R, Bolmont, T, Kaeser, SA, Coomaraswamy, J, Lindau, D, Stoltze, L, Calhoun, ME, Jaggi, F, Wolburg, H, Gengler, S, Haass, C, Ghetti, B, Czech, C, Holscher, C, Mathews, PM, Jucker, M (2006) Abeta42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO Rep*, 7:940–946.
- Ramadas, RA, Ewart, SL, Iwakura, Y, Medoff, BD, LeVine, AM (2012) IL-36alpha exerts pro-inflammatory effects in the lungs of mice. *PLoS One*, 7:e45784.
- Ramadas, RA, Ewart, SL, Medoff, BD, LeVine, AM (2011) Interleukin-1 family member 9 stimulates chemokine production and neutrophil influx in mouse lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 44:134–145.
- Ramadas, RA, Sadeghnejad, A, Karmaus, W, Arshad, SH, Matthews, S, Huebner, M, Kim, DY, Ewart, SL (2007) Interleukin-1R antagonist gene and pre-natal smoke exposure are associated with childhood asthma. *Eur Respir J*, 29:502–508.
- Ramagopalan, SV, Valdar, W, Dymant, DA, DeLuca, GC, Yee, IM, Giovannoni, G, Ebers, GC, Sadovnick, AD (2009) Association of infectious mononucleosis with multiple sclerosis. A population-based study. *Neuroepidemiology*, 32:257–262.
- Ransohoff, RM (2009) Chemokines and chemokine receptors: standing at the crossroads of immunobiology and neurobiology. *Immunity*, 31:711–721.
- Ransohoff, RM, Brown, MA (2012) Innate immunity in the central nervous system. *J Clin Invest*, 122:1164–1171.
- Ransohoff, RM, El Khoury, J (2015) Microglia in Health and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*,
- Ransohoff, RM, Engelhardt, B (2012) The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nat Rev Immunol*, 12:623–635.
- Ransohoff, RM, Perry, VH (2009) Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol*, 27:119–145.
- Rathinam, VA, Vanaja, SK, Fitzgerald, KA (2012) Regulation of inflammasome signaling. *Nat Immunol*, 13:333–342.
- Reddy, J, Waldner, H, Zhang, X, Illes, Z, Wucherpfennig, KW, Sobel, RA, Kuchroo, VK (2005) Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells contribute to gender differences in susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 175:5591–5595.

Reed-Geaghan, EG, Savage, JC, Hise, AG, Landreth, GE (2009) CD14 and toll-like receptors 2 and 4 are required for fibrillar A β -stimulated microglial activation. *J Neurosci*, 29:11982–11992.

Richard, JF, Roy, M, Audoy-Remus, J, Tremblay, P, Vallieres, L (2011) Crawling phagocytes recruited in the brain vasculature after pertussis toxin exposure through IL6, ICAM1 and ITGalphaM. *Brain Pathol*, 21:661–671.

Rogers, JT, Leiter, LM, McPhee, J, Cahill, CM, Zhan, SS, Potter, H, Nilsson, LN (1999) Translation of the alzheimer amyloid precursor protein mRNA is up-regulated by interleukin-1 through 5'-untranslated region sequences. *J Biol Chem*, 274:6421–6431.

Roy, M, Richard, JF, Dumas, A, Vallieres, L (2012) CXCL1 can be regulated by IL-6 and promotes granulocyte adhesion to brain capillaries during bacterial toxin exposure and encephalomyelitis. *J Neuroinflammation*, 9:18.

Rumble, JM, Huber, AK, Krishnamoorthy, G, Srinivasan, A, Giles, DA, Zhang, X, Wang, L, Segal, BM (2015) Neutrophil-related factors as biomarkers in EAE and MS. *J Exp Med*, 212:23–35.

Saadoun, S, Waters, P, MacDonald, C, Bell, BA, Vincent, A, Verkman, AS, Papadopoulos, MC (2012) Neutrophil protease inhibition reduces neuromyelitis optica-immunoglobulin G-induced damage in mouse brain. *Ann Neurol*, 71:323–333.

Sakaguchi, S, Yamaguchi, T, Nomura, T, Ono, M (2008) Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*, 133:775–787.

Sayed, BA, Christy, AL, Walker, ME, Brown, MA (2010) Meningeal mast cells affect early T cell central nervous system infiltration and blood-brain barrier integrity through TNF: a role for neutrophil recruitment? *J Immunol*, 184:6891–6900.

Schafer, DP, Lehrman, EK, Kautzman, AG, Koyama, R, Mardinly, AR, Yamasaki, R, Ransohoff, RM, Greenberg, ME, Barres, BA, Stevens, B (2012) Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron*, 74:691–705.

Schmid, CD, Melchior, B, Masek, K, Puntambekar, SS, Danielson, PE, Lo, DD, Sutcliffe, JG, Carson, MJ (2009) Differential gene expression in LPS/IFN γ activated microglia and macrophages: in vitro versus in vivo. *J Neurochem*, 109 Suppl 1:117–125.

Scholz, M, Cinatl, J, Schadel-Hopfner, M, Windolf, J (2007) Neutrophils and the blood-brain barrier dysfunction after trauma. *Med Res Rev*, 27:401–416.

Schroder, K, Tschopp, J (2010) The inflammasomes. *Cell*, 140:821–832.

Schwartz, M, Baruch, K (2014) Breaking peripheral immune tolerance to CNS antigens in neurodegenerative diseases: boosting autoimmunity to fight-off chronic neuroinflammation. *J Autoimmun*, 54:8–14.

Segal, BM (2014) Stage-specific immune dysregulation in multiple sclerosis. *J Interferon Cytokine Res*, 34:633–640.

Segueni, N, Vigne, S, Palmer, G, Bourigault, ML, Olleros, ML, Vesin, D, Garcia, I, Ryffel, B, Quesniaux, VF, Gabay, C (2015) Limited Contribution of IL-36 versus IL-1 and TNF Pathways in Host Response to Mycobacterial Infection. *PLoS One*, 10:e0126058.

- Serafini, B, Columba-Cabezas, S, Di Rosa, F, Aloisi, F (2000) Intracerebral recruitment and maturation of dendritic cells in the onset and progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol*, 157:1991–2002.
- Serafini, B, Rosicarelli, B, Magliozzi, R, Stigliano, E, Aloisi, F (2004) Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain Pathol*, 14:164–174.
- Serneels, L, Van Biervliet, J, Craessaerts, K, Dejaegere, T, Horre, K, Van Houtvin, T, Esselmann, H, Paul, S, Schafer, MK, Berezovska, O, Hyman, BT, Sprangers, B, Sciot, R, Moons, L, Jucker, M, Yang, Z, May, PC, Karran, E, Wiltfang, J, D’Hooge, R, De Strooper, B (2009) gamma-Secretase heterogeneity in the Aph1 subunit: relevance for Alzheimer’s disease. *Science*, 324:639–642.
- Shaftel, SS, Carlson, TJ, Olschowka, JA, Kyrkanides, S, Matousek, SB, O’Banion, MK (2007) Chronic interleukin-1beta expression in mouse brain leads to leukocyte infiltration and neutrophil-independent blood brain barrier permeability without overt neurodegeneration. *J Neurosci*, 27:9301–9309.
- Shechter, R, London, A, Schwartz, M (2013a) Orchestrated leukocyte recruitment to immune-privileged sites: absolute barriers versus educational gates. *Nat Rev Immunol*, 13:206–218.
- Shechter, R, Miller, O, Yovel, G, Rosenzweig, N, London, A, Ruckh, J, Kim, KW, Klein, E, Kalchenko, V, Bendel, P, Lira, SA, Jung, S, Schwartz, M (2013b) Recruitment of beneficial M2 macrophages to injured spinal cord is orchestrated by remote brain choroid plexus. *Immunity*, 38:555–569.
- Shechter, R, Schwartz, M (2013) CNS sterile injury: just another wound healing? *Trends Mol Med*, 19:135–143.
- Shemer, A, Jung, S (2015) Differential roles of resident microglia and infiltrating monocytes in murine CNS autoimmunity. *Semin Immunopathol*, 37:613–623.
- Sheng, JG, Bora, SH, Xu, G, Borchelt, DR, Price, DL, Koliatsos, VE (2003) Lipopolysaccharide-induced-neuroinflammation increases intracellular accumulation of amyloid precursor protein and amyloid beta peptide in APP^{swe} transgenic mice. *Neurobiol Dis*, 14:133–145.
- Sibley, WA, Bamford, CR, Clark, K (1985) Clinical viral infections and multiple sclerosis. *Lancet*, 1:1313–1315.
- Sierra, A, Encinas, JM, Deudero, JJ, Chancey, JH, Enikolopov, G, Overstreet-Wadiche, LS, Tsirka, SE, Matic-Savatic, M (2010) Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell*, 7:483–495.
- Sierra, A, Tremblay, ME, Wake, H (2014) Never-resting microglia: physiological roles in the healthy brain and pathological implications. *Front Cell Neurosci*, 8:240.
- Simard, AR, Soulet, D, Gowing, G, Julien, JP, Rivest, S (2006) Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer’s disease. *Neuron*, 49:489–502.
- Sims, JE, Smith, DE (2010) The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat Rev Immunol*, 10:89–102.
- Singh, P, Hu, P, Hoggatt, J, Moh, A, Pelus, LM (2012) Expansion of bone marrow neutrophils following G-CSF administration in mice results in osteolineage cell apoptosis and mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells. *Leukemia*, 26:2375–2383.

- Sonderegger, I, Iezzi, G, Maier, R, Schmitz, N, Kurrer, M, Kopf, M (2008) GM-CSF mediates autoimmunity by enhancing IL-6-dependent Th17 cell development and survival. *J Exp Med*, 205:2281–2294.
- Soulika, AM, Lee, E, McCauley, E, Miers, L, Bannerman, P, Pleasure, D (2009) Initiation and progression of axonopathy in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci*, 29:14965–14979.
- Starr, TK, Jameson, SC, Hogquist, KA (2003) Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol*, 21:139–176.
- Steinbach, K, Piedavent, M, Bauer, S, Neumann, JT, Friese, MA (2013) Neutrophils amplify autoimmune central nervous system infiltrates by maturing local APCs. *J Immunol*, 191:4531–4539.
- Steinman, L, Zamvil, SS (2006) How to successfully apply animal studies in experimental allergic encephalomyelitis to research on multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 60:12–21.
- Stewart, CR, Stuart, LM, Wilkinson, K, van Gils, JM, Deng, J, Halle, A, Rayner, KJ, Boyer, L, Zhong, R, Frazier, WA, Lacy-Hulbert, A, El Khoury, J, Golenbock, DT, Moore, KJ (2010) CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat Immunol*, 11:155–161.
- Streit, WJ, Sammons, NW, Kuhns, AJ, Sparks, DL (2004) Dystrophic microglia in the aging human brain. *Glia*, 45:208–212.
- Stromnes, IM, Goverman, JM (2006a) Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc*, 1:1810–1819.
- Stromnes, IM, Goverman, JM (2006b) Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc*, 1:1952–1960.
- Sugiura, K, Takeichi, T, Kono, M, Ogawa, Y, Shimoyama, Y, Muro, Y, Akiyama, M (2012) A novel IL36RN/IL1F5 homozygous nonsense mutation, p.Arg10X, in a Japanese patient with adult-onset generalized pustular psoriasis. *Br J Dermatol*, 167:699–701.
- Sugiura, K, Takemoto, A, Yamaguchi, M, Takahashi, H, Shoda, Y, Mitsuma, T, Tsuda, K, Nishida, E, Togawa, Y, Nakajima, K, Sakakibara, A, Kawachi, S, Shimizu, M, Ito, Y, Takeichi, T, Kono, M, Ogawa, Y, Muro, Y, Ishida-Yamamoto, A, Sano, S, Matsue, H, Morita, A, Mizutani, H, Iizuka, H, Muto, M, Akiyama, M (2013) The majority of generalized pustular psoriasis without psoriasis vulgaris is caused by deficiency of interleukin-36 receptor antagonist. *J Invest Dermatol*, 133:2514–2521.
- Sutton, C, Brereton, C, Keogh, B, Mills, KH, Lavelle, EC (2006) A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*, 203:1685–1691.
- Suzuki, M, Takaishi, S, Nagasaki, M, Onozawa, Y, Iino, I, Maeda, H, Komai, T, Oda, T (2013) Medium-chain fatty acid-sensing receptor, GPR84, is a proinflammatory receptor. *J Biol Chem*, 288:10684–10691.
- Tanzi, RE, Moir, RD, Wagner, SL (2004) Clearance of Alzheimer's Abeta peptide: the many roads to perdition. *Neuron*, 43:605–608.

Taylor, SL, Renshaw, BR, Garka, KE, Smith, DE, Sims, JE (2002) Genomic organization of the interleukin-1 locus. *Genomics*, 79:726–733.

Tortola, L, Rosenwald, E, Abel, B, Blumberg, H, Schafer, M, Coyle, AJ, Renauld, JC, Werner, S, Kisielow, J, Kopf, M (2012) Psoriasiform dermatitis is driven by IL-36-mediated DC-keratinocyte crosstalk. *J Clin Invest*, 122:3965–3976.

Towne, JE, Garka, KE, Renshaw, BR, Virca, GD, Sims, JE (2004) Interleukin (IL)-1F6, IL-1F8, and IL-1F9 signal through IL-1Rrp2 and IL-1RAcP to activate the pathway leading to NF-kappaB and MAPKs. *J Biol Chem*, 279:13677–13688.

Towne, JE, Renshaw, BR, Douangpanya, J, Lipsky, BP, Shen, M, Gabel, CA, Sims, JE (2011) Interleukin-36 (IL-36) ligands require processing for full agonist (IL-36alpha, IL-36beta, and IL-36gamma) or antagonist (IL-36Ra) activity. *J Biol Chem*, 286:42594–42602.

Tran, EH, Hoekstra, K, van Rooijen, N, Dijkstra, CD, Owens, T (1998) 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*, 161:3767–3775.

Trapp, BD, Nave, KA (2008) Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? *Annu Rev Neurosci*, 31:247–269.

Tremblay, ME, Lowery, RL, Majewska, AK (2010) Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS Biol*, 8:e1000527.

Tremlett, H, van der Mei, IA, Pittas, F, Blizzard, L, Paley, G, Mesaros, D, Woodbaker, R, Nunez, M, Dwyer, T, Taylor, BV, Ponsonby, AL (2008) Monthly ambient sunlight, infections and relapse rates in multiple sclerosis. *Neuroepidemiology*, 31:271–279.

Ullen, A, Fauler, G, Bernhart, E, Nusshold, C, Reicher, H, Leis, HJ, Malle, E, Sattler, W (2012) Phloretin ameliorates 2-chlorohexadecanal-mediated brain microvascular endothelial cell dysfunction in vitro. *Free Radic Biol Med*, 53:1770–1781.

Ullen, A, Singewald, E, Konya, V, Fauler, G, Reicher, H, Nusshold, C, Hammer, A, Kratky, D, Heinemann, A, Holzer, P, Malle, E, Sattler, W (2013) Myeloperoxidase-derived oxidants induce blood-brain barrier dysfunction in vitro and in vivo. *PLoS One*, 8:e64034.

Vallieres, L, Sawchenko, PE (2003) Bone marrow-derived cells that populate the adult mouse brain preserve their hematopoietic identity. *J Neurosci*, 23:5197–5207.

van de Veerdonk, FL, Stoeckman, AK, Wu, G, Boeckermann, AN, Azam, T, Netea, MG, Joosten, LA, van der Meer, JW, Hao, R, Kalabokis, V, Dinarello, CA (2012) IL-38 binds to the IL-36 receptor and has biological effects on immune cells similar to IL-36 receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109:3001–3005.

van Gisbergen, KP, Sanchez-Hernandez, M, Geijtenbeek, TB, van Kooyk, Y (2005) Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. *J Exp Med*, 201:1281–1292.

Venkatakrishnan, AJ, Deupi, X, Lebon, G, Tate, CG, Schertler, GF, Babu, MM (2013) Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature*, 494:185–194.

Vigne, S, Palmer, G, Lamacchia, C, Martin, P, Talabot-Ayer, D, Rodriguez, E, Ronchi, F, Sallusto, F, Dinh, H, Sims, JE, Gabay, C (2011) IL-36R ligands are potent regulators of dendritic and T cells. *Blood*, 118:5813–5823.

Vigne, S, Palmer, G, Martin, P, Lamacchia, C, Strebel, D, Rodriguez, E, Olleros, ML, Vesin, D, Garcia, I, Ronchi, F, Sallusto, F, Sims, JE, Gabay, C (2012) IL-36 signaling amplifies Th1 responses by enhancing proliferation and Th1 polarization of naive CD4+ T cells. *Blood*, 120:3478–3487.

Vom Berg, J, Prokop, S, Miller, KR, Obst, J, Kalin, RE, Lopategui-Cabezas, I, Wegner, A, Mair, F, Schipke, CG, Peters, O, Winter, Y, Becher, B, Heppner, FL (2012) Inhibition of IL-12/IL-23 signaling reduces Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline. *Nat Med*, 18:1812–1819.

Vos, JB, van Sterkenburg, MA, Rabe, KF, Schalkwijk, J, Hiemstra, PS, Datson, NA (2005) Transcriptional response of bronchial epithelial cells to *Pseudomonas aeruginosa*: identification of early mediators of host defense. *Physiol Genomics*, 21:324–336.

Wake, H, Moorhouse, AJ, Jinno, S, Kohsaka, S, Nabekura, J (2009) Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci*, 29:3974–3980.

Wald, D, Qin, J, Zhao, Z, Qian, Y, Naramura, M, Tian, L, Towne, J, Sims, JE, Stark, GR, Li, X (2003) SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat Immunol*, 4:920–927.

Walker-Caulfield, ME, Hatfield, JK, Brown, MA (2015) Dynamic changes in meningeal inflammation correspond to clinical exacerbations in a murine model of relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 278:112–122.

Walker, DG, Link, J, Lue, LF, Dalsing-Hernandez, JE, Boyes, BE (2006) Gene expression changes by amyloid beta peptide-stimulated human postmortem brain microglia identify activation of multiple inflammatory processes. *J Leukoc Biol*, 79:596–610.

Wang, J, Wu, X, Simonavicius, N, Tian, H, Ling, L (2006) Medium-chain fatty acids as ligands for orphan G protein-coupled receptor GPR84. *J Biol Chem*, 281:34457–34464.

Whedon, JM, Glassey, D (2009) Cerebrospinal fluid stasis and its clinical significance. *Altern Ther Health Med*, 15:54–60.

Wilson, A, Trumpp, A (2006) Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol*, 6:93–106.

Wingerchuk, DM, Lennon, VA, Lucchinetti, CF, Pittock, SJ, Weinshenker, BG (2007) The spectrum of neuromyelitis optica. *Lancet Neurol*, 6:805–815.

Wingerchuk, DM, Lucchinetti, CF (2007) Comparative immunopathogenesis of acute disseminated encephalomyelitis, neuromyelitis optica, and multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol*, 20:343–350.

Wisniewski, HM, Barcikowska, M, Kida, E (1991) Phagocytosis of beta/A4 amyloid fibrils of the neuritic neocortical plaques. *Acta Neuropathol*, 81:588–590.

Wu, F, Cao, W, Yang, Y, Liu, A (2010) Extensive infiltration of neutrophils in the acute phase of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Histochem Cell Biol*, 133:313–322.

Wyss-Coray, T (2006) Tgf-Beta pathway as a potential target in neurodegeneration and Alzheimer's. *Curr Alzheimer Res*, 3:191–195.

Wyss-Coray, T, Lin, C, Yan, F, Yu, GQ, Rohde, M, McConlogue, L, Masliah, E, Mucke, L (2001) TGF-beta1 promotes microglial amyloid-beta clearance and reduces plaque burden in transgenic mice. *Nat Med*, 7:612–618.

Yamasaki, R, Lu, H, Butovsky, O, Ohno, N, Rietsch, AM, Cialic, R, Wu, PM, Doykan, CE, Lin, J, Cotleur, AC, Kidd, G, Zorlu, MM, Sun, N, Hu, W, Liu, L, Lee, JC, Taylor, SE, Uehlein, L, Dixon, D, Gu, J, Floruta, CM, Zhu, M, Charo, IF, Weiner, HL, Ransohoff, RM (2014) Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. *J Exp Med*, 211:1533–1549.

Yan, Y, Wang, C (2006) Abeta42 is more rigid than Abeta40 at the C terminus: implications for Abeta aggregation and toxicity. *J Mol Biol*, 364:853–862.

Yona, S, Kim, KW, Wolf, Y, Mildner, A, Varol, D, Breker, M, Strauss-Ayali, D, Viukov, S, Guillems, M, Misharin, A, Hume, DA, Perlman, H, Malissen, B, Zelzer, E, Jung, S (2013) Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity*, 38:79–91.

Yong, VW, Rivest, S (2009) Taking advantage of the systemic immune system to cure brain diseases. *Neuron*, 64:55–60.

Young, NP, Weinshenker, BG, Lucchinetti, CF (2008) Acute disseminated encephalomyelitis: current understanding and controversies. *Semin Neurol*, 28:84–94.

Yu, W, Jiang, N, Ebert, PJ, Kidd, BA, Muller, S, Lund, PJ, Juang, J, Adachi, K, Tse, T, Birnbaum, ME, Newell, EW, Wilson, DM, Grotenbreg, GM, Valitutti, S, Quake, SR, Davis, MM (2015) Clonal Deletion Prunes but Does Not Eliminate Self-Specific alphabeta CD8(+) T Lymphocytes. *Immunity*, 42:929–941.

Zaadstra, BM, Chorus, AM, van Buuren, S, Kalsbeek, H, van Noort, JM (2008) Selective association of multiple sclerosis with infectious mononucleosis. *Mult Scler*, 14:307–313.

Zhan, Y, Paolicelli, RC, Sforazzini, F, Weinhard, L, Bolasco, G, Pagani, F, Vyssotski, AL, Bifone, A, Gozzi, A, Ragozzino, D, Gross, CT (2014) Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. *Nat Neurosci*, 17:400–406.

Zhu, J, Yamane, H, Paul, WE (2010) Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol*, 28:445–489.