



HAL
open science

Caractérisation des cellules microgliales adultes et de leur potentiel en immunothérapie des tumeurs cérébrales

Sabrina Donnou

► To cite this version:

Sabrina Donnou. Caractérisation des cellules microgliales adultes et de leur potentiel en immunothérapie des tumeurs cérébrales. Immunologie. Université d'Angers, 2007. Français. NNT : . tel-00341604v3

HAL Id: tel-00341604

<https://theses.hal.science/tel-00341604v3>

Submitted on 19 Feb 2009

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

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

**CARACTERISATION DES CELLULES MICROGLIALES ADULTES ET DE
LEUR POTENTIEL EN IMMUNOTHERAPIE DES TUMEURS CEREBRALES**

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Immunologie fondamentale

ECOLE DOCTORALE D'ANGERS

Présentée et soutenue publiquement

le : 16 février 2007

à : Angers

par : **Sabrina DONNOU**

Devant le jury ci-dessous :

Paul WALKER (rapporteur), Maître d'Enseignement et de recherche, Université de Genève.
Philippe BRACHET (rapporteur), Directeur de Recherche émérite, INSERM U643, Nantes
Philippe MENEI (Président du jury, examinateur), Professeur, Université d'Angers.
Pascale GIRAUDON (examinateur), Directeur de Recherche, INSERM U842, Lyon.
Dominique COUEZ (examinateur), Professeur, Université d'Angers.

Directeur de thèse : Professeur Dominique COUEZ.

Nom et coordonnées du laboratoire : INSERM U564
CHU – Bâtiment Montéclair
4, rue Larrey
49033 ANGERS CEDEX 01
Tel. : 02.41.35.41.45
Fax : 02.41.73.16.30

SOMMAIRE

ABREVIATIONS	<i>p6</i>
AVANT PROPOS	<i>p8</i>
INTRODUCTION	<i>p11</i>
I. MICROGLIE ET STATUT IMMUNOLOGIQUE PARTICULIER DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL (SNC)	<i>p11</i>
<u>1. LE STATUT IMMUNOLOGIQUE PARTICULIER DU SNC</u>	<i>p11</i>
<i>1.1. La barrière hémato-encéphalique (BHE)</i>	<i>p12</i>
<i>1.2. Drainage lymphatique non conventionnel</i>	<i>p15</i>
<i>1.3. Immunosuppression locale</i>	<i>p16</i>
<u>2. LES CELLULES MICROGLIALES, PRINCIPALES CELLULES IMMUNOCOMPETENTES RESIDENTES DU SNC</u>	<i>p18</i>
<i>2.1. Origine et hétérogénéité de la microglie</i>	<i>p19</i>
<u><i>2.1.1. Origine des cellules microgliales</i></u>	<i>p19</i>
<u><i>2.1.2. Plasticité et hétérogénéité des cellules microgliales</i></u>	<i>p21</i>
2.1.2.1. Plasticité morphologique et fonctionnelle	<i>p21</i>
2.1.2.2. Hétérogénéité des cellules microgliales	<i>p24</i>
<i>2.2. Activation des cellules microgliales</i>	<i>p25</i>
<u><i>2.2.1. Activation par les pathogènes ou le soi modifié</i></u>	<i>p25</i>
<u><i>2.2.2. Activation par les cytokines</i></u>	<i>p27</i>

<u>2.2.3. Autres modes d'activation</u>	p28
2.3. Fonctions de la microglie	p29
<u>2.3.1. Fonctions de la microglie dans les réponses immunitaires du SNC</u>	p29
2.3.1.1 Présentation des antigènes	p29
2.3.1.2 Phagocytose	p32
2.3.1.3 Sécrétion de cytokines et autres facteurs	p32
<u>2.3.2. La microglie, cellule neuroprotectrice</u>	p34
2.4. Microglie et autres cellules immunocompétentes du SNC	p36
<u>2.4.1. Microglie et macrophages périvasculaires</u>	p36
<u>2.4.2. Microglie versus astrocytes</u>	p36
<u>2.4.3. Microglie et macrophages périphériques</u>	p38
<u>2.4.4. Microglie et cellules dendritiques</u>	p39

II. MICROGLIE ET TUMEURS DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL p41

<u>1. PRESENTATION DES TUMEURS CEREBRALES</u>	p41
<u>2. REPONSE DU SYSTEME IMMUNITAIRE FACE A DES CELLULES MALIGNES</u>	p42
2.1. Réponse cellulaire anti-tumorale idéale	p42
2.2. Intérêt de la présentation croisée	p43
<u>3. STRATEGIES D'ECHAPPEMENT DES TUMEURS</u>	p44
3.1. Phénomènes de tolérance, cellules suppressives	p45
3.2. Mécanismes liés aux cellules tumorales	p48
3.3. Détournement des fonctions microgliales	p52

4. TRAITEMENT DES TUMEURS CEREBRALES *p54*

4.1. Traitements conventionnels *p54*

4.2. Le potentiel de l'immunothérapie *p56*

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE *p61*

TRAVAIL DE THESE *p64*

PREMIERE PUBLICATION *p64*

Identification of new CNS-resident macrophage subpopulation molecular markers for the discrimination with murine systemic macrophages.

Sabrina Donnou*, Sylvain Fisson*, Dominique Mahé, Alicia Montoni and Dominique Couez.

(* 1ers auteurs équivalents)

Journal of neuroimmunology, 2005, 169 : 39-49.

DEUXIEME PUBLICATION *p69*

Neonatal and adult microglia cross-present exogenous antigens.

Céline Beauvillain*, **Sabrina Donnou***, Ulrich Jarry, Marie Scotet, Yves Delneste, Pierre Guermonprez, Pascale Jeannin[#], and Dominique Couez[#].

(* et [#] contribution équivalente)

En révision favorable (accepté sous réserve de modifications), 2006, *Glia*.

TROISIEME PUBLICATION

p73

Evaluation of brain tumors immunotherapy combining regulatory T cells depletion and CpG-ODN injection.

Sabrina Donnou, Ulrich Jarry and Dominique Couez.

Article en préparation.

QUATRIEME PUBLICATION

p78

Expression and regulation of IRG-1, an early IFN and TLR activation factor, in murine and human microglia and in experimental brain tumors.

Sabrina Donnou, Ulrich Jarry, Sylvain Fisson, Yves Delneste and Dominique Couez.

Article en préparation.

DISCUSSION

p82

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

p100

ABREVIATIONS

- BDNF:	brain derived neurotrophic factor
- BHE :	barrière hémato-encéphalique
- CD:	cluster of differentiation
- CMH cl.I ou II :	complexe majeur d'histocompatibilité de classe I ou II
- COX-2 :	cyclo-oxygénase 2
- CPA :	cellule présentatrice d'antigènes
- CpG :	oligodéoxynucléotides contenant un motif CG non méthylé
- CTLA-4 :	cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4
- DcR3:	decoy receptor 3
- EAE :	encéphalomyélite auto-immune expérimentale
- EGF:	endothelial growth factor
- FcR :	récepteur au fragment Fc des immunoglobulines
- FGF:	fibroblast growth factor
- FLIP:	Fas associated death domain-like IL-1 β converting enzyme inhibitory protein
- Flt3-L:	Fms-like tyrosine kinase 3-ligand
- FoxP3:	forkhead box P3
- GDNF:	glial derived neurotrophic factor
- GFP :	green fluorescent protein
- GITR:	glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family- related gene
- GM-CSF:	granulocyte macrophage-colony stimulating factor
- HLA :	human leukocyte antigen
- IAP:	inhibitor of apoptosis protein
- ICAM-1:	intercellular adhesion molecule 1
- IDO:	indol-amine 2,3-dioxygenase
- IL :	interleukine
- IFN :	interféron
- IPEX:	immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked syndrome
- IRF:	interferon regulatory factor

- IRG-1 :	immune responsive gene-1
- LCR :	liquide céphalo-rachidien
- LFA-1:	lymphocyte function associated antigen-1
- LPS:	lipopolysaccharide
- MIIC:	MHC II compartment
- MCP-1 :	monocyte chemoattractant protein-1
- M-CSF:	macrophage-colony stimulating factor
- MIP:	macrophage inflammatory protein
- MMP:	matrix metalloproteinase
- MyD88:	myeloid differentiation primary response gene 88
- NF- κ B:	nuclear factor κ B
- NGF:	nerve growth factor
- NK:	natural killer
- NKT:	natural killer T lymphocyte
- NO:	monoxide d'azote
- NOS :	NO synthétase
- NT-3 :	neurotrophine-3
- PD-L1:	programmed death ligand 1
- PGE ₂ :	prostaglandine E ₂
- SADS:	small accelerator for death signalling
- SNC :	système nerveux central
- SR:	scavenger receptor
- TAP:	transporter associated with antigen processing
- TCR:	T cell receptor
- TGF:	transforming growth factor
- Th1:	T helper 1
- TLR:	toll like receptor
- TNF:	tumor necrosis factor
- TRAIL:	TNF related apoptosis-inducing ligand
- TRIF:	TIR domain containing adapter inducing IFN β
- VCAM:	vascular cell adhesion molecule
- VEGF:	vascular endothelial growth factor
- VIP:	vasoactive intestinal peptide
- VLA:	very late antigen

AVANT-PROPOS

La défense de l'organisme contre les pathogènes repose sur l'activation du système immunitaire. L'immunité innée, non spécifique, est la première à intervenir et se caractérise par la mise en place d'une réaction inflammatoire. Les principaux acteurs de ce mécanisme sont les cellules NK (natural killer), les neutrophiles et les cellules présentatrices d'antigènes de la famille des phagocytes mononucléés (macrophages, cellules dendritiques). L'immunité adaptative, plus tardive à se mettre en route, est au contraire hautement spécifique de l'antigène et permet la mise en place de la mémoire immunitaire. Elle a pour but l'activation des lymphocytes ayant un récepteur spécifique à l'antigène qui se fait grâce aux cellules présentatrices d'antigènes capables d'exprimer les molécules du CMH cl.I et II (complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et II) ainsi que les molécules costimulatrices de la famille B7 nécessaires à l'activation des lymphocytes T. Les cellules présentatrices d'antigènes font ainsi le lien entre les deux types d'immunité et leur activation est par conséquent un point clé d'une réponse immunitaire efficace. Malheureusement, les réponses immunes passent par la création d'un milieu hostile pour le micro-organisme qui peut se révéler dangereux aussi pour les cellules de l'hôte environnantes. De ce fait, de telles réactions ne peuvent pas se dérouler de la même manière partout dans l'organisme et en particulier le système nerveux central (cerveau, cervelet, moelle épinière). Enfermé dans une « coquille » rigide (crâne, colonne vertébrale), il supporte difficilement les œdèmes accompagnant les réactions inflammatoires à cause de l'augmentation de pression intracrânienne entraînant la perte de cellules neuronales irremplaçables.

Ainsi, le système nerveux central a évolué pour se protéger au maximum des agressions extérieures et éviter le déclenchement de réponses immunitaires agressives, ce qui a conduit à décrire ce site comme étant immunologiquement privilégié. Cependant, loin d'être complètement isolé du système immunitaire, le système nerveux central possède un statut immunitaire particulier, caractérisé par un contrôle actif des réponses s'y déroulant ce qui se traduit par une plus grande difficulté à initier une réponse immunitaire par rapport au reste de l'organisme. Les principales caractéristiques de ce statut immunitaire sont (1) un isolement physique relatif par la présence de la barrière hémato-encéphalique, (2) un drainage lymphatique non conventionnel, (3) la très faible expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et II, (4) une immunosuppression constitutive. Un autre fait marquant est l'absence des cellules dendritiques, cellules présentatrices d'antigènes les plus performantes, dans un parenchyme nerveux sain.

La protection immunitaire du système nerveux central est assurée par une population de cellules résidentes : la microglie. Ces cellules, d'origine myéloïde, font partie de la famille des phagocytes mononucléés, assurent l'immunosurveillance du système nerveux central et sont activement maintenues dans un état quiescent dans un cerveau sain. En revanche, à la moindre perturbation de leur environnement, elles sont les premières cellules à être activées, migrent sur le site de l'agression, prolifèrent et organisent la réponse immune la mieux adaptée. Mais ce processus d'activation reste assez mal caractérisé et de nombreux doutes subsistent quant aux diverses fonctionnalités de la microglie : cellule neurotrophique, neurotoxique, cellule présentatrice d'antigènes activatrice ou inhibitrice ? L'ensemble de ces fonctions pourrait dépendre de leur propre état d'activation ou pourrait aussi s'expliquer par l'existence supposée de plusieurs sous populations microgliales. Un des premiers frein concernant l'étude de ces cellules vient de la difficulté à les isoler en nombre suffisant puis à les maintenir en culture sous leur état quiescent, ce qui conduit un bon nombre d'équipes à utiliser à la place les cellules issues du cerveau de souris néonatales, nettement plus faciles à manipuler. Cependant, ces cellules présentent des différences morphologiques, phénotypiques et même fonctionnelles par rapport aux cellules adultes. Ayant réussi à développer un protocole d'isolement de la microglie adulte quiescente, nous nous sommes intéressés à mieux caractériser ces cellules.

Les tumeurs cérébrales sont parmi les plus agressives et les glioblastomes offrent un temps moyen de survie inférieur à un an. Du fait de leur localisation, les tumeurs cérébrales sont difficiles à traiter par les thérapies conventionnelles et un grand espoir vient de la mise au point de protocoles d'immunothérapie. Généralement, l'une des armes privilégiée pour combattre les tumeurs est l'activation des cellules dendritiques capables d'activer directement et efficacement les lymphocytes T cytotoxiques par présentation antigénique croisée. Dans le système nerveux central, ces cellules sont normalement absentes mais elles apparaissent suite à une inflammation : l'une des hypothèses serait que la microglie puisse dériver en cellule type dendritique. Les cellules microgliales sont les premières à être confrontées aux cellules tumorales et il serait donc particulièrement intéressant de pouvoir utiliser tout leur potentiel pour initier une réponse anti-tumorale précoce. Cela passe notamment par une meilleure compréhension de l'environnement propice à leur activation et à leur fonction de présentation de l'antigène et par une meilleure caractérisation phénotypique de la microglie afin de la distinguer des autres cellules présentatrices d'antigènes. Par ailleurs, pour pouvoir développer des protocoles d'immunothérapie dans le cerveau, il ne faut pas oublier l'immunosuppression

constitutive de ce site qui se combine à celle générée par la tumeur elle-même. Ainsi, il est fort probable que des traitements efficaces contre des tumeurs situées en périphérie échouent dans le système nerveux central. Un challenge est donc de trouver un protocole multi-thérapeutique capable de créer un environnement inflammatoire suffisamment puissant pour réactiver le système immunitaire sans pour autant basculer vers des phénomènes d'auto-immunité.

INTRODUCTION

I. MICROGLIE ET STATUT IMMUNOLOGIQUE PARTICULIER DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL (SNC)

Le système nerveux central comprend le cerveau, le cervelet et la moelle épinière. Il est protégé par une structure osseuse rigide (crâne, colonne vertébrale) et par trois feuillets constituant les méninges (Figure 1). De l'extérieur vers l'intérieur, les méninges se divisent en dure-mère, feuillet conjonctif inextensible et enveloppant intégralement le cerveau et la moelle épinière, en arachnoïde, feuillet avasculaire accolé à la dure-mère et envoyant des travées conjonctives vers le troisième feuillet, la pie-mère, fine et transparente, qui adhère totalement à la surface du cerveau et suit le cheminement des vaisseaux sanguins. Entre l'arachnoïde et la pie-mère (espace sous arachnoïdien) circule le liquide céphalo-rachidien (LCR). Synthétisé au niveau des plexus choroïdes situés dans les ventricules cérébraux à partir d'une filtration du sang et résorbé au niveau des sinus veineux (Figure 1), ce liquide est renouvelé jusqu'à quatre fois par jour, assure notamment la protection mécanique du cerveau contre les chocs et permet aussi la circulation de médiateurs de l'immunité. Le parenchyme nerveux, situé sous les méninges, se subdivise en substance grise, contenant les corps cellulaires des neurones et substance blanche où cheminent les fibres myélinisées des neurones (Figure 1). En plus des neurones, le système nerveux central comprend deux grandes populations de cellules. La macroglie, d'origine neuroectodermale, est constituée des oligodendrocytes assurant la myélinisation des neurones et des astrocytes, cellules de soutien des neurones et qui participent à la formation de la barrière hémato-encéphalique. Les cellules assurant la défense immunitaire du système nerveux central, d'origine myélomonocytaire ont été nommées par opposition et en raison de leur très petite taille « microglie ».

L'originalité des cellules microgliales par rapport aux autres cellules immunitaires est leur appartenance au système nerveux, qui étant constitué de cellules extrêmement précieuses et non renouvelables, s'est doté d'un statut immunitaire particulier.

1. LE STATUT IMMUNOLOGIQUE PARTICULIER DU SNC

Le système nerveux central a longtemps été considéré comme un site immunologique privilégié à cause du maintien à long terme de greffons dans ce site (Medawar, 1948 ; Barker et Billingham, 1977). Cependant, cette notion a été largement revue (Carson *et al.*, 2006) dans

la mesure où de nombreuses manifestations du système immunitaire peuvent être y mises en évidence, notamment lors de maladies auto-immunes, de maladies inflammatoires, ou encore lors de lésions simples ou après injection de lipopolysaccharide (LPS) comme montré par les travaux du laboratoire (Montero-Menei *et al.*, 1996). Le système nerveux central doit en fait en permanence mettre en balance le risque lié à l'infection et celui lié au déclenchement d'une réaction inflammatoire. En effet, les neurones constituent une population de cellules différenciées ayant perdu la capacité à proliférer. Par ailleurs, les réactions inflammatoires se caractérisent par la présence d'un œdème. Le système nerveux central étant enfermé dans une « boîte » rigide, la moindre variation de volume va entraîner une augmentation de pression intracrânienne et pourra avoir des conséquences lourdes sur la population neuronale, de même qu'une concentration importante de cytokines pro-inflammatoires et/ou de facteurs cytotoxiques libérés au cours de la réponse immunitaire. Le système nerveux central a donc évolué pour éviter au maximum le déclenchement de mécanismes dont les conséquences ne sont pas contrôlables.

1.1. La barrière hémato-encéphalique (BHE)

Première protection, le système nerveux central est isolé physiquement du reste de l'organisme par trois barrières anatomiques : la barrière hémato-méningée, isolant le liquide céphalo-rachidien du sang et la barrière méningo-encéphalique isolant le liquide céphalo-rachidien du parenchyme nerveux, sont toutes deux formées par les épendymocytes constituant la névroglie centrale épithéliale et tapissent les différentes parois du SNC, telles que les parois de l'épendyme ou des ventricules cérébraux. **La barrière hémato-encéphalique (BHE)**, qui nous intéresse plus particulièrement ici, sépare le parenchyme cérébral de la circulation sanguine et permet donc le maintien de l'homéostasie du système nerveux central (Figure 2).

Les **cellules endothéliales** constituant la première couche de la BHE n'ont pas les mêmes propriétés que dans le reste de l'organisme : elles n'ont pas de fenestrations, sont unies les unes aux autres par des jonctions serrées étanches et ont une activité pinocytaire très faible (Bailey *et al.*, 2006). Les conséquences sont d'une part une absence de flux intercellulaire à cause des jonctions serrées et d'autre part un flux transcellulaire réduit. Le passage des solutés du sang vers le parenchyme nerveux n'est pas absent mais est très contrôlé : les substances de petite taille liposolubles ou les gaz passent facilement la barrière ;

les nutriments tels que le glucose utilisent des transporteurs spécifiques et d'autres substances comme l'insuline sont soumises à l'endocytose médiée par des récepteurs (Ballabh *et al.*, 2004). Entourant les cellules endothéliales, **la lame basale** des capillaires sanguins constitue un rempart supplémentaire. Constituée essentiellement de collagène de type IV, de laminine, de protéoglycanes et de fibronectine, elle gêne le mouvement des cellules vers le parenchyme. Inclus dans cette fine lame basale se trouvent les péricytes ayant un rôle structural important et régulant la vasomotricité des capillaires et les macrophages périvasculaires. **Les pieds astrocytaires** viennent compléter cette BHE. Ceux-ci semblent avoir en effet un rôle fondamental non seulement dans le maintien de la structure de la BHE, mais aussi dans son développement. Ainsi, *in vitro*, les astrocytes sont capables de restaurer les propriétés des cellules endothéliales cérébrales, ce qui pourrait être dû à des facteurs solubles tels que TGF- β 1 (« transforming growth factor β 1 »), GDNF (« glial derived neurotrophic factor »), bFGF (« fibroblast growth factor ») (Rubin *et al.*, 1991; Ramsauer *et al.*, 2002).

La dernière caractéristique de cette BHE est sa faible expression constitutive de molécules d'adhérence comparativement aux autres parois vasculaires de l'organisme. La conséquence majeure est la très faible infiltration leucocytaire au sein du SNC sain.

Les lymphocytes T activés ou mémoires, exprimant plus fortement des molécules d'adhérence telles que VCAM-1 (« vascular cell adhesion molecule 1 ») vont pouvoir traverser la BHE même en dehors de toute inflammation, ce qui peut expliquer leur présence dans le liquide céphalo-rachidien d'individus sains. S'ils rencontrent l'antigène dont ils sont spécifiques, ils persistent dans le parenchyme nerveux et initient une réponse immunitaire. Ce recrutement initial va conduire à une perméabilisation relative de la BHE (expression accrue des molécules d'adhérence) et à une infiltration secondaire de lymphocytes T indépendamment de leur spécificité antigénique (Archambault *et al.*, 2005).

L'infiltration des lymphocytes T non mémoires vers le parenchyme nerveux au niveau d'un site inflammatoire n'est pas encore très bien caractérisée mais se fait vraisemblablement selon quatre étapes principales faisant intervenir successivement différentes familles de molécules d'adhérence (pour revues Brown, 2001; Prat *et al.*, 2001; Engelhardt et Ransohoff, 2005)(Figure 3). La première étape va permettre aux lymphocytes de ralentir puis de rouler à la surface de l'endothélium vasculaire (étape de **roulement**). Elle s'effectue par l'intermédiaire d'interactions faibles entre la sélectine L à la surface des lymphocytes et les sélectines E et P à la surface des cellules endothéliales activées. Ce contact initial entre les deux types cellulaires et la présence de nombreuses chimiokines à la surface

de l'endothélium (CCL2, CCL4, CCL5, CCL19, CCL21 notamment) va entraîner une modification du lymphocyte avec un changement de conformation et une plus forte expression des intégrines membranaires de celui-ci (étape d'**activation**). Ainsi LFA-1 (« lymphocyte function associated antigen 1 ») et VLA-4 (« very late antigen 4 ») vont interagir fermement avec ICAM-1 (« intercellular adhesion molecule 1 ») et VCAM-1 respectivement, provoquant l'arrêt du lymphocyte (étape de **marginalisation**) et son début de migration trans-endothéliale (ou **diapédèse**). Cette dernière étape est la plus mal caractérisée, mais il semblerait qu'elle implique principalement des molécules capables d'interagir avec la matrice extra-cellulaire, telles que CD44 se liant au hyaluronate ou les protéinases de la matrice extracellulaire secrétées par les lymphocytes T permettant l'ouverture des jonctions serrées et leur infiltration dans l'espace périvasculaire puis dans le parenchyme nerveux (Hartung et Kieseier, 2000; Leppert *et al.*, 2001).

Parvenus dans le parenchyme, pour trouver leur route au sein du système nerveux central, les lymphocytes T vont pouvoir suivre les gradients de cytokines et chimiokines secrétées par les cellules nerveuses lésées et/ou les cellules gliales. Par exemple, le récepteur CXCR3 présent sur les lymphocytes T semble particulièrement important dans leur infiltration au sein du parenchyme en suivant les gradients de CXCL10 (ou IP10 : « IFN γ inducible protein of 10kD »), CXCL9 ou CXCL11 (Christensen *et al.*, 2004). L'implication de la plupart des molécules citées ci-dessus a été montrée par l'utilisation d'anticorps bloquants ou d'animaux déficients pour l'une ou l'autre de ces molécules d'adhérence ou chimiokines, le plus souvent en se basant sur l'EAE comme modèle inflammatoire. Cependant, il ne peut pas être exclu que d'autres couples de molécules d'adhérence ou d'autres chimiokines propres au SNC existent et puissent guider les lymphocytes T.

Même si cette BHE se trouve sur 99% des cellules endothéliales du SNC, il existe d'autres voies d'entrée possibles pour les lymphocytes T (Ransohoff *et al.*, 2003). En particulier, ceux-ci peuvent suivre les voies de formation du liquide céphalo-rachidien et se servir des espaces dépourvus de BHE : plexus choroïdes et organes circumventriculaires (neurohypophyse, éminence médiane, organe vasculaire de la lame terminale, organe subfornical, épiphyse et area postrema) sont autant de zones où les lymphocytes T pourront infiltrer plus facilement le parenchyme nerveux. Dans ces régions *a priori* plus vulnérables, le système immunitaire est cependant renforcé et comprend de nombreuses cellules CMH cl.II⁺ (macrophages, cellules dendritiques) qui permettront si besoin de générer une réponse immunitaire adaptative. Par ailleurs, lors du développement tumoral, les nouveaux vaisseaux

issus de l'activité pro-angiogénique de la tumeur, ne présentent pas les caractéristiques de l'endothélium de la BHE, et sont donc plus permissifs à l'infiltration leucocytaire.

1.2. Drainage lymphatique non conventionnel

Une autre particularité du SNC est l'absence de vaisseaux lymphatiques et d'un réseau de drainage lymphatique anatomiquement bien défini (Hickey, 2001). Les cellules dendritiques sont les plus efficaces pour initier une réponse immunitaire spécifique car elles migrent vers les ganglions lymphatiques après avoir ingéré l'antigène pour le présenter aux lymphocytes T (Banchereau et Steinman, 1998). Dans le SNC sans inflammation, de telles cellules n'ont été décrites que dans les plexus choroïdes et les méninges (Matyszak et Perry, 1996). Un antigène pénétrant par ces sites particuliers pourra alors être aisément transporté vers les ganglions cervicaux de la même façon que dans le reste de l'organisme. Cependant, dans le cas d'un antigène situé dans le parenchyme, la situation est différente et il a longtemps été pensé que ces antigènes intraparenchymateux ne pouvaient pas induire de réponse immunitaire, ce qui expliquait l'absence de rejet de greffe dans le cerveau. Pourtant, des antigènes injectés directement dans le parenchyme nerveux ou dans les ventricules cérébraux induisent un recrutement massif de lymphocytes T (Qing *et al.*, 2000). Des expériences similaires utilisant des antigènes marqués ont montré une migration spontanée d'une partie de ces antigènes vers les ganglions cervicaux (Ling *et al.*, 2003). En revanche, les modalités exactes de cette migration ne sont pas définies et plusieurs routes sont envisagées (Ransohoff *et al.*, 2003; Walker *et al.*, 2003) (Figure 4).

La première consisterait en un **drainage des antigènes solubles** par le liquide céphalo-rachidien, suivant les voies de formation de celui-ci vers les villosités arachnoïdes puis vers les ganglions cervicaux en suivant le trajet des nerfs olfactifs à travers les plaques cribliformes (Fig.4 ①). Une seconde possibilité est la **prise en charge par des cellules dendritiques** immatures (Hatterer *et al.*, 2006)(Fig.4 ②), même si de telles cellules n'ont été décrites que dans les méninges ou les plexus choroïdes (Serot *et al.*, 1997; Serot *et al.*, 2000). Une dernière possibilité serait la **prise en charge de ces antigènes par des cellules parenchymateuses résidentes** (Fig.4 ③) qui quitteraient le cerveau pour migrer vers les ganglions. Dans cette optique, les cellules microgliales seraient les meilleures candidates, dans la mesure où elles semblent pouvoir se différencier en cellules dendritiques en conditions inflammatoires (Fischer et Reichmann, 2001). Par ailleurs, une étude récente a mis en

évidence l'expression de CCR7 sur la microglie activée, récepteur qui permet notamment la migration des lymphocytes T naïfs ou des cellules dendritiques matures vers les ganglions lymphatiques (Dijkstra *et al.*, 2006).

En plus de cette migration hors du SNC, il semble probable qu'une certaine proportion des antigènes reste dans le parenchyme et permette une **initiation locale** des réponses immunitaires (Ling *et al.*, 2003).

1.3. Immunosuppression locale

Lorsque les lymphocytes T ont réussi à franchir la barrière hémato-encéphalique, ils se retrouvent confrontés à un environnement constitutivement immunodéprimé dans lequel les réactions inflammatoires ne se déclenchent qu'en cas d'absolue nécessité. Cette immunosuppression est active et dépend des cellules gliales et neuronales elles-mêmes.

Le TGF β est l'un des acteurs majeurs de cette immunosuppression. Appartenant à une superfamille très étendue, le TGF β comprend 3 isoformes chez les mammifères : TGF- β 1, - β 2 et - β 3. Dans le système nerveux central, les trois isoformes peuvent être produits mais pas forcément par tous les types cellulaires, ni dans les mêmes circonstances (Constam *et al.*, 1992; Gomes *et al.*, 2005). Ainsi, les astrocytes constituent la source principale de TGF β dans un cerveau sain en sécrétant constitutivement les isoformes 2 et 3 (Unsicker *et al.*, 1991), bien que les neurones et les oligodendrocytes en produisent également (da Cunha *et al.*, 1993; Dobbertin *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 2000). Les cellules microgliales quant à elle ne produisent que l'isoforme 1, notamment après activation par du TNF α ou de l'IL-1 *in vitro* (da Cunha *et al.*, 1993; Chao *et al.*, 1995; da Cunha *et al.*, 1997) ou dans un cerveau ischémique ou infecté par le VIH *in vivo* (da Cunha *et al.*, 1997; Lehrmann *et al.*, 1998). Les effets du TGF β sont nombreux et variés mais contribuent généralement à inhiber les réponses inflammatoires (pour revue Pratt et McPherson, 1997). Il va ainsi activer les astrocytes, les rendre hypertrophiques et stimuler leur synthèse de composants de la matrice extracellulaire favorisant les cicatrices (Baghdassarian *et al.*, 1993) ou encore inhiber leur expression d'ICAM-1 bloquant l'interaction avec les lymphocytes T infiltrants (Shrikant *et al.*, 1996). Sur la microglie, le TGF β va avoir pour action générale d'inhiber leur fonctions immunitaires (Paglinawan *et al.*, 2003). Il peut ainsi inhiber l'expression de CMH cl. II et des molécules co-stimulatrices induite par des stimuli inflammatoires à leur surface (Wei et Jonakait, 1999),

inhiber leur production de radicaux oxygénés ou encore bloquer leur prolifération (Suzumura *et al.*, 1993).

Un autre facteur important de l'immunosuppression du système nerveux central est la vitamine D3 ou plus particulièrement sa forme active : la **1,25 dihydroxy-vitamine D3** (1,25-(OH)₂-D3) (pour revue, Lemire, 2000). Son récepteur, le VDR, est exprimé par les neurones et les cellules gliales (Neveu *et al.*, 1994b; Prifer *et al.*, 1999; Baas *et al.*, 2000). La 1,25-(OH)₂-D3 a des effets généralement neuroprotecteurs et entraîne également une inhibition de l'activation microgliale (Lefebvre d'Hellencourt *et al.*, 2003). Etant donné ce potentiel, des analogues non hypercalcémiant de la vitamine D3 ont donné des résultats encourageants dans le traitement de l'EAE, modèle animal de la sclérose en plaques (Garcion *et al.*, 2003).

Certains **neuropeptides** ont également une fonction immunosuppressive, à l'image du VIP (vasoactive intestinal peptide), qui inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires (Delgado et Ganea, 2003) ou de chimiokines (Delgado, 2002) par la microglie. Ainsi, VIP, somatostatine, hormone α stimulant les mélanocytes (α -MSH) et neuropeptide Y contribuent au statut immunitaire particulier du système nerveux central (Reinke et Fabry, 2006). Les neurones ont donc un rôle particulièrement actif dans le contrôle des réactions immunitaires par la sécrétion de ces neuropeptides, de facteurs neurotrophiques, mais aussi en contrôlant l'état d'activation des cellules microgliales (cf. § 2.3.2).

Un autre élément contribuant au statut immunologique contrôlé du système nerveux central est la très **faible expression des molécules du CMH** sur les cellules nerveuses non activées, ce qui prévient toute activation lymphocytaire T. Cette caractéristique explique en outre que les cellules nerveuses puissent servir de réservoir lors d'une infection virale (Joly *et al.*, 1991). En présence de facteurs pro-inflammatoires, lors d'une altération de l'activité électrique des neurones (Neumann *et al.*, 1996) ou encore lors d'une section des nerfs crâniens sans perturbation de la BHE (Rao et Lund, 1993), l'expression des molécules du CMH est augmentée et peut alors contribuer à générer une réponse antigène spécifique.

Une dernière caractéristique expliquant la difficulté à déclencher et entretenir des réactions immunitaires dans le système nerveux central est liée à une **élimination rapide des cellules inflammatoires par apoptose** (Pender et Rist, 2001). Les lymphocytes T activés, exprimant CD95 (ou Fas) sont particulièrement touchés. De façon intéressante, les neurones et les astrocytes expriment constitutivement le ligand du CD95 (CD95-L ; Fas-L) (Bechmann *et al.*, 1999; Flugel *et al.*, 2000; Bechmann *et al.*, 2002) et contribuent donc à empêcher le déclenchement des réponses immunitaires. L'expression de CD95-L sur la microglie est inductible et permet donc plutôt de terminer ces réponses (Frigerio *et al.*, 2000). En effet, la

phagocytose des cellules apoptotiques par les cellules microgliales induit chez celles-ci un phénotype anti-inflammatoire caractérisé par une expression accrue des molécules du CMH cl.II mais pas des costimulateurs de la famille B7, ce qui conduit à l'anergie des lymphocytes T, ainsi que par l'inhibition de la sécrétion des cytokines TNF α et IL-12, sans affecter celle d'IL-10 ou de TGF β (Magnus *et al.*, 2001; Magnus *et al.*, 2002a; Magnus *et al.*, 2002b).

Enfin, faisant partie intégrante de ce statut particulier, les cellules microgliales coordonnent toutes les réponses immunitaires du système nerveux central, mais étant soumises à ce micro-environnement particulier, ne pourront pas réagir exactement comme les autres macrophages de l'organisme.

2. LES CELLULES MICROGLIALES, PRINCIPALES CELLULES IMMUNO-COMPETENTES RESIDENTES DU SNC

Le terme microglie a longtemps été utilisé abusivement pour désigner deux populations distinctes : la microglie parenchymateuse et les phagocytes mononucléés périvasculaires (Figure 5). La confusion initiale venait de l'impossibilité de discerner ces deux types cellulaires. Cependant, à l'heure actuelle, il est reconnu que ces deux populations ont un phénotype et peut être même des origines distinct(e)s. Ainsi, les cellules périvasculaires sont très proches des autres macrophages de l'organisme avec un phénotype CD11b⁺ CD45⁺ CD14⁺ CMH cl.II⁺ (complexe majeur d'histocompatibilité de classe II) alors que la microglie est CD11b^{faible} CD45^{faible} CD14⁻ CMH cl.II⁻ à l'état quiescent (Ford *et al.*, 1995). Par ailleurs, chez le rat, les cellules périvasculaires sont marquées par un anticorps ED2, reconnaissant un membre de la famille des récepteurs d'épuration (van den Berg *et al.*, 2001), ce qui n'est pas le cas des cellules parenchymateuses (Graeber *et al.*, 1989). Enfin, si ces dernières ne sont que partiellement renouvelées lors d'une greffe de moelle osseuse, les macrophages périvasculaires subissent quant à eux un renouvellement très régulier (Lassmann *et al.*, 1993).

Pour toutes ces raisons, il est établi aujourd'hui que les cellules microgliales au sens strict du terme ne représentent que la population de cellules située dans le parenchyme nerveux, à l'exclusion de la lame basale des vaisseaux sanguins.

2.1. Origine et hétérogénéité de la microglie

2.1.1. Origine des cellules microgliales

L'origine des cellules microgliales a longtemps été sujette à controverse, du fait de l'absence de marqueurs permettant de les identifier sans ambiguïté et n'est toujours pas clairement établie à l'heure actuelle. Ainsi, trois hypothèses majeures ont été émises : origine mésodermale ; origine neuroectodermale ; origine hématopoïétique (pour revue : Kaur *et al.*, 2001).

Dans la première hypothèse, formulée initialement par Del Rio-Hortega (1932), les cellules microgliales seraient issues de **précurseurs du mésoderme** s'installant dans le cerveau embryonnaire dans certaines zones préférentielles qu'il avait nommé les « fontaines à microglie ». A partir de ces sources, les cellules microgliales amiboïdes générées par prolifération des précurseurs coloniseraient l'ensemble du système nerveux central, puis finiraient par acquérir leur forme ramifiée définitive retrouvée chez l'adulte. Appuyant cette hypothèse, les travaux de Alliot et collaborateurs (1991) ont mis en évidence deux populations de cellules précurseurs Mac1⁺ ayant une capacité de prolifération importante et générant des cellules filles soit Mac1⁺, 2.4G2⁺ et F4/80⁺, phénotype identique à celui des cellules microgliales, soit Mac1⁺, 2.4G2⁺ mais F4/80⁻, dont l'identité n'est pas connue. Par la suite, plusieurs équipes ont réussi à mettre en évidence de telles populations précurseurs capables de proliférer essentiellement en réponse au M-CSF (« macrophage colony stimulating factor ») (Walker *et al.*, 1995) ou au GM-CSF (« granulocyte- macrophage colony stimulating factor ») (Kanzawa *et al.*, 2000). L'origine de ces précurseurs reste également incertaine bien que leur présence dans le sac vitellin ait été montrée dès le huitième jour de vie embryonnaire (Alliot *et al.*, 1999).

L'hypothèse d'une **origine neuroectodermale** de la microglie a également été avancée, selon laquelle des microglioblastes, originaires du neuroectoderme, seraient les précurseurs des cellules microgliales (Paterson *et al.*, 1973), comme des autres cellules gliales. Certains auteurs ont d'ailleurs mis en évidence des marqueurs d'oligodendrocyte (Wolswijk, 1995) ou d'astrocyte (Fedoroff *et al.*, 1997) sur les cellules microgliales ou encore ont obtenu des cellules type microglie à partir de cultures de neurosphères (Papavasiliou *et*

al., 1996). Allant dans le même sens, des cellules microgliales issues de cultures mixtes cultivées sur différents supports et suivant des proportions variables en sérum, peuvent acquérir des morphologies et des marqueurs de cellules macrogliales, notamment d'oligodendrocytes (Yokoyama *et al.*, 2004).

Malgré ces résultats intrigants, les travaux montrant une potentielle origine neuroectodermale des cellules microgliales restent assez rares et ne sont pas considérés aujourd'hui comme les plus significatifs.

Depuis quelques années, les études montrant un renouvellement au moins partiel des cellules microgliales par des **cellules hématopoïétiques** se sont multipliées. Cette idée a été avancée dès 1983 par Ting et collaborateurs, puis elle a été démontrée grâce aux avancées technologiques permettant la réalisation des greffes de moelle osseuse chez l'animal. En utilisant la moelle osseuse d'animaux transgéniques exprimant constitutivement la β -galactosidase et en l'injectant à des animaux irradiés, Kennedy et Abkowitz (1997) ont mis en évidence un renouvellement partiel des cellules microgliales après un délai relativement long. Cependant, cette étude montrait que peu de cellules parenchymateuses étaient renouvelées, les cellules périvasculaires représentant la majorité des cellules marquées. Plus récemment cependant, des travaux similaires utilisant la greffe de moelle osseuse d'animaux transgéniques exprimant constitutivement le marqueur fluorescent GFP (« Green Fluorescent Protein ») ont montré que les cellules microgliales parenchymateuses étaient renouvelées de façon non négligeable suite à la greffe et que leur nombre était considérablement augmenté après une lésion du parenchyme cérébral (Priller *et al.*, 2001; Vallieres et Sawchenko, 2003; Simard et Rivest, 2004; Bechmann *et al.*, 2005). Lorsque la reconstitution est effectuée à partir d'une cellule souche hématopoïétique et pas d'un mélange cellules souches hématopoïétiques et mésenchymateuses comme habituellement, le renouvellement est nettement plus marqué puisque les cellules GFP⁺ représentent jusqu'à 40% des cellules microgliales parenchymateuses 12 mois après la reconstitution (Hess *et al.*, 2004). Appuyant cette idée de précurseurs hématopoïétiques capables de pénétrer dans le système nerveux central, les travaux de Banati et collaborateurs (1991) ont mis en évidence une population progénitrice ayant les mêmes canaux ioniques que les cellules microgliales dans la moelle osseuse. De même, les cellules totales de la moelle osseuse de souris cultivées en présence de Flt3-L et de milieu conditionné de cellules gliales peuvent se différencier en cellules ayant la morphologie et les marqueurs de surface de la microglie (Servet-Delprat *et al.*, 2002). Récemment, Davoust et collègues (2006) ont également mis en évidence dans le cerveau de

souris une population progénitrice myéloïde CD34⁺ B220⁺ CD11b⁺ capable de se différencier *in vitro* en cellules microgliales et dont la proportion augmente lors d'une inflammation.

Les monocytes eux-mêmes dérivant de la lignée hématopoïétique ont été envisagés comme une source possible des cellules microgliales. Pendant la vie embryonnaire, cette hypothèse est peu probable dans la mesure où les précurseurs microgliaux sont détectés au huitième jour de vie embryonnaire (Alliot *et al.*, 1999) avant la différenciation des monocytes et même du système vasculaire (Takahashi *et al.*, 1989). Cependant, si cette voie n'est pas envisageable lors du développement, il semblerait qu'elle puisse exister chez l'adulte (Flugel *et al.*, 2001; Bechmann *et al.*, 2005). En effet, des monocytes de rat ou de donneur sain cultivés en présence de milieu conditionné d'astrocytes acquièrent la morphologie, le phénotype et les caractéristiques électrophysiologiques des cellules microgliales (Schmidtmayer *et al.*, 1994; Sievers *et al.*, 1994; Leone *et al.*, 2006).

Finalement, étant donné l'ensemble de ces résultats, il semble peu probable que la microglie ait une origine unique. Il est reconnu actuellement qu'elle dériverait de précurseurs mésodermiques colonisant très précocement le parenchyme nerveux puis se différenciant en microglie amiboïde fœtale. Par la suite, ces cellules adopteraient une morphologie ramifiée, caractéristique de la microglie adulte et ne seraient que peu renouvelées (contrairement aux cellules périvasculaires). En cas de perturbation du parenchyme nerveux, en plus de la multiplication des cellules *in situ*, des cellules hématopoïétiques (précurseurs de la moelle osseuse et/ou monocytes) pourraient pénétrer dans le système nerveux central, se différencier et renforcer localement le pool de cellules microgliales. A l'heure actuelle cependant, la contribution relative des cellules microgliales résidentes par rapport aux cellules qui se sont différenciées sur place n'a jamais été étudiée lors des processus neurodégénératifs.

2.1.2. Plasticité et hétérogénéité des cellules microgliales

2.1.2.1. Plasticité morphologique et fonctionnelle

Les cellules microgliales sont caractérisées par une grande hétérogénéité aussi bien dans le temps que dans l'espace. En effet, au cours de la vie de l'individu vont se succéder les cellules microgliales amiboïdes fœtales, les cellules adultes ramifiées puis les cellules microgliales sénescents.

La microglie fœtale, présente au cours de la vie embryonnaire jusqu'à quelques temps (deux semaines environ chez la souris) après la naissance, se caractérise par une morphologie amiboïde. Ces cellules, encore mal connues aujourd'hui, sont soupçonnées de participer au remodelage du tissu nerveux. Leur grande capacité de phagocytose pourrait ainsi leur permettre d'éliminer tous les débris issus de la formation des réseaux neuronaux (Ferrer *et al.*, 1990). Les cellules microgliales fœtales auraient également une grande influence sur la survie neuronale, tant en favorisant leur apoptose pour réguler la formation des réseaux neuronaux (Marin-Teva *et al.*, 2004), que leur croissance et leur survie en cas de neurodégénérescence traumatique notamment (Rabchevsky et Streit, 1997). Par ailleurs, leur apparition avant les vaisseaux sanguins et leur association étroite à ceux-ci dans une greffe neurale suggèrent qu'elles pourraient aussi intervenir dans la vascularisation du système nerveux central (Pennell et Streit, 1997). Souvent prises comme modèle pour comprendre les fonctions des cellules microgliales en général et adultes en particulier, elles présentent toutefois des différences phénotypiques et fonctionnelles avec ces dernières. Ainsi, si les cellules microgliales fœtales expriment les récepteurs au LDL (« low density lipoprotein ») ou encore l'estérase non spécifique, ce n'est plus le cas pour les cellules adultes (Giulian et Baker, 1986). Les récepteurs de type « scavenger » sont également éteints sur la microglie adulte quiescente (Husemann *et al.*, 2002). De même, si les cellules amiboïdes ont une grande capacité de phagocytose et de prolifération (jusqu'à 99% de cellules en division 9 jours après la naissance chez le rat ; Dalmau *et al.*, 2003), les cellules adultes ne retrouvent ces propriétés que dans leur état activé (Giulian et Baker, 1986). Ainsi, tirer des conclusions à partir de cellules fœtales pour des processus neurodégénératifs tels que la maladie d'Alzheimer touchant uniquement les cerveaux âgés peut s'avérer dangereux comme l'ont récemment montré Floden et Combs (2006) : en effet, une stimulation par le peptide amyloïde bêta sous forme fibrillaire entraîne une forte capacité de phagocytose ainsi que la sécrétion de TNF α par la microglie fœtale alors que la microglie adulte est incapable d'en faire autant.

Chez l'adulte, la majorité des cellules adoptent une morphologie ramifiée avec un ou plusieurs longs et fins prolongements munis de très nombreux spicules permettant de les distinguer des autres membres de la famille myélo-monocytaire (Vilhardt, 2005). Ces cellules microgliales ramifiées sont dites **quiescentes** mais ce terme semble finalement bien mal adapté dans le sens où cette population est loin d'être inactive. En effet, les travaux récents de Nimmerjahn et collaborateurs (2005), en utilisant une technologie d'imagerie en temps réel, montrent très clairement que si leur corps cellulaire reste plus ou moins statique, en revanche

les prolongements cytoplasmiques de ces cellules sont en perpétuel mouvement et leur permettent donc d'analyser en permanence leur microenvironnement. D'un point de vue phénotypique, les cellules microgliales « quiescentes » se caractérisent par une expression faible du CD11b, du marqueur leucocytaire CD45, et quasiment pas d'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I ou II (CMH cl.I ou II). Assurant une fonction d'immunosurveillance du parenchyme nerveux, elles seront très rapidement **activées** à la moindre perturbation de celui-ci (pour revue, Ladeby *et al.*, 2005).

Une caractéristique principale des cellules microgliales activées, qui là encore les différencie des autres types de macrophages, est leur extraordinaire capacité à proliférer et à s'accumuler sur le site de la lésion. Une étude réalisée sur des cerveaux ischémiques de rat a ainsi montré une multiplication d'un facteur supérieur à 7 du nombre de cellules microgliales dans l'hippocampe des animaux malades (Kato *et al.*, 2003). Leur programme d'activation est séquentiel (Ponomarev *et al.*, 2006) et comprend des modifications morphologiques, phénotypiques et fonctionnelles. Les cellules microgliales activées perdent ainsi progressivement leurs prolongements cytoplasmiques ce qui s'accompagne d'une hypertrophie de leur corps cellulaire (Figure 6). Elles vont également exprimer plus fortement les molécules CD11b et CD45 et induire l'expression de toutes les molécules nécessaires à une présentation antigénique efficace : CMH cl.I et II, costimulateurs de la famille B7 (cf. § 2.3.1.1). Par ailleurs, elles sont capables de sécréter tout un éventail de facteurs susceptibles de réguler la réponse immunitaire (cytokines pro- ou anti-inflammatoires, facteurs cytotoxiques ou neurotrophiques, cf. § 2.3.1.3). Enfin, selon les circonstances, elles peuvent également assurer une fonction phagocytaire (cf. § 2.3.1.2). Il est intéressant de noter que cette activation n'est pas du type tout ou rien. Ainsi, des cellules microgliales activées ne deviendront pas nécessairement des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et peuvent retourner à l'état quiescent lorsque le stimulus cesse.

Dans leur dernier stade d'activation, atteint en cas de neurodégénérescence intense, les cellules microgliales deviennent **réactives**. Elles ont alors une morphologie hypertrophiée avec éventuellement de rares prolongement épais et sont sous cette forme totalement indiscernables des macrophages périphériques tant du point de vue morphologique que phénotypique. Conservant les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles du stade précédent, elles ont une activité phagocytaire intense et seront éliminées par un mécanisme d'apoptose induit par leur sur-activation : Jung et collaborateurs (2005) ont ainsi montré une induction de N-myc après stimulation de la microglie par IFN γ et LPS qui conduisait à leur sensibilité accrue aux médiateurs toxiques autocrines tels que le NO.

La microglie évolue également en dehors de toute pathologie avec l'âge de l'individu (pour revue, Streit, 2006). Ainsi, elles peuvent présenter un phénotype et une morphologie altérée chez les rongeurs âgés, mais ce phénomène est nettement plus marqué chez l'homme et a abouti à la définition de la **microglie « dystrophique »** (Streit *et al.*, 2004). Bien que les conséquences d'une telle transformation ne soient pas connues, il est possible que cette sénescence microgliale, étant donné le lien très étroit unissant cellules microgliales et neurones, favorise l'apparition des maladies neurodégénératives liées à l'âge.

2.1.2.2. Hétérogénéité des cellules microgliales

Il existe une hétérogénéité spatiale des cellules microgliales. Elles représentent ainsi de 5% dans le cortex à 12% dans la substance noire du nombre de cellules nerveuses totales et sont généralement plus représentées dans la substance grise chez la souris (Lawson *et al.*, 1990). Chez l'homme, leur proportion varie de 0,5 à 16,6% en fonction des régions, mais elles sont plus nombreuses dans la substance blanche (Mittelbronn *et al.*, 2001). Les conséquences fonctionnelles de ces différences ne sont pas connues à l'heure actuelle. Décrites comme des cellules ramifiées chez l'adulte, les cellules microgliales présentent cependant une variation importante de leur morphologie en fonction des régions (Figure 7). Ainsi, elles pourront être plutôt arrondies dans les zones dépourvues de barrière hémato-encéphalique (éminence médiane, organe subfornical), bipolaires dans les zones riches en fibres nerveuses (corps calleux, fimbria) ou présenter des ramifications radiales très élaborées dans le reste du tissu nerveux (Lawson *et al.*, 1990).

D'autre part, l'existence de plusieurs sous-populations microgliales est fortement soupçonnée. En effet, par dilution limite sur agar des cellules microgliales de jeune souris et culture en présence de macrophage-colony stimulating factor (M-CSF), divers clones morphologiquement, phénotypiquement et fonctionnellement distincts ont été obtenus (Moore *et al.*, 1992; Walker *et al.*, 1995; Askew *et al.*, 1996). De même, Kanzawa et collaborateurs (2000) ont réussi à dériver plusieurs clones microgliaux en présence de granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF). Appuyant encore cette hypothèse, un anticorps anti-kératane sulfate (épitope 5D4), permet de distinguer *in situ* deux populations de cellules microgliales dans le parenchyme nerveux du rat (Bertolotto *et al.*, 1998). Ainsi, diverses sous-populations de cellules microgliales pourraient bien exister au sein du parenchyme nerveux et assumer différentes fonctions à l'image des capacités de présentation

antigénique variables observées chez les différents clones microgliaux obtenus par Walker (1995) ou Kanzawa (2000) et collaborateurs.

2.2. Activation des cellules microgliales

Quelle que soit la perturbation touchant le système nerveux central, l'une des principale caractéristique est la réponse très rapide des cellules microgliales (pour revue, Rock *et al.*, 2004), décrite lors d'infections bactériennes, virales (Olson *et al.*, 2001), lors d'ischémies cérébrales partielles ou complètes (Stoll *et al.*, 1998), lors de dégénérescence axonale par coupure de nerf ou lésions excitotoxiques, ou lors de maladies neurodégénératives (Giulian, 1999; Heppner *et al.*, 2005; Ponomarev *et al.*, 2005b). Cette activation rapide peut s'expliquer par les très nombreux récepteurs qu'elles expriment (Figure 8) permettant : une activation directe par les récepteurs de l'immunité innée en cas d'infection, une activation indirecte par des cytokines pro-inflammatoires secrétées par d'autres cellules ou encore une activation par la détection d'un dysfonctionnement neuronal grâce aux récepteurs aux neurotransmetteurs ou au CD200R, récepteur inhibiteur des cellules myéloïdes (Minas et Liversidge, 2006).

2.2.1. Activation par les pathogènes ou le soi modifié

Les récepteurs de l'immunité innée permettent la reconnaissance des pathogènes ainsi que du soi modifié (pour revue, Gordon, 2002). Les pathogènes expriment en effet plusieurs signatures moléculaires ou PAMPs (« pathogen associated molecular patterns ») telles que des oligosaccharides, des acides nucléiques modifiés, des glycanes reconnus par divers récepteurs du système immunitaire. De la même façon, le soi modifié ainsi que les cellules apoptotiques vont être reconnus par l'intermédiaire d'un certain nombre de molécules ou de signaux tell(e)s que la phosphatidylsérine, les lipoprotéines oxydées de faible densité ou encore les changements de potentiels électriques.

Les récepteurs d'épuration (« scavenger receptors », SR) permettent la reconnaissance et l'élimination des lipoprotéines modifiées mais également de cellules apoptotiques, de bactéries ou encore de substances telles que le peptide amyloïde bêta, généré lors de la maladie d'Alzheimer (Platt *et al.*, 1996; El Khoury *et al.*, 1998; Platt *et al.*, 1999;

Peiser *et al.*, 2002; Mukhopadhyay et Gordon, 2004). L'expression de la plupart de ces récepteurs (SR-A ; SR-BI ; CD36, RAGE pour «receptor for advanced glycation end products» ; LRP pour «low density lipoprotein receptor-related protein» ; MARCO pour «macrophage receptor containing a collagenous domain») a été décrite sur les cellules microgliales (Alarcon *et al.*, 2005). Cependant, si la plupart sont constitutivement exprimés par la microglie néonatale, d'autres comme SR-A et SR-BI s'éteignent à l'âge adulte et ne sont ré-induits qu'en cas d'inflammation. La conséquence de l'engagement des récepteurs d'épuration sur les cellules microgliales n'est pas bien caractérisée et a surtout été étudiée au cours de la maladie d'Alzheimer, caractérisée par l'agrégation de protéines formant des plaques (plaques amyloïdes). Le peptide bêta amyloïde à l'origine de ces plaques est reconnu et internalisé par la microglie par l'intermédiaire de divers récepteurs d'épuration ce qui induit sa sécrétion de réactifs oxygénés (El Khoury *et al.*, 1996; Husemann *et al.*, 2002). Le récepteur MARCO quant à lui, en plus de fonctions d'internalisation, interviendrait également dans le changement de morphologie des cellules microgliales après leur activation (Granucci *et al.*, 2003).

Les récepteurs de la famille Toll (« Toll like receptor », TLR), initialement décrits chez la drosophile, comprennent une dizaine de membres. Ces récepteurs sont extrêmement conservés et ont évolué pour reconnaître les motifs communs des bactéries, virus, parasites ou champignons (Medzhitov et Janeway, 2000; Akira, 2003; Pasare et Medzhitov, 2004) (Figure 9). Ces récepteurs transmembranaires sont exprimés (tout ou partie d'entre eux) par les cellules immunitaires innées - monocytes, macrophages, cellules dendritiques, neutrophiles, lymphocytes NK (Muzio *et al.*, 2000; Visintin *et al.*, 2001; Hoshino *et al.*, 2002; Bellocchio *et al.*, 2004; Mitsui *et al.*, 2004; Sabroe *et al.*, 2005; Sivori *et al.*, 2006)- ainsi que par les lymphocytes B et T (Sobek *et al.*, 2004; Caron *et al.*, 2005; Dasari *et al.*, 2005; Peng, 2005) et se situent à la surface de la cellule (TLR1, 2, 4, 5, 6, 10 11) ou dans la membrane de vésicules intracellulaires (TLR3, 7, 8, 9). Après activation, ils induisent une cascade de signalisation intra-cellulaire mettant en jeu l'adaptateur MyD88 (Janssens et Beyaert, 2002) et aboutissant à l'activation du facteur de transcription NF- κ B permettant la synthèse de gènes de cytokines ou de chimiokines. De façon intéressante, pour certains récepteurs et en particulier le TLR4, une voie indépendante de MyD88 a été décrite (Oda et Kitano, 2006), aboutissant à l'activation du facteur de transcription IRF-3 et à la synthèse des membres de la famille des gènes inductibles par l'IFN (Figures 9 et 10). Les TLR ont également une fonction importante au sein du système nerveux central, dans la mesure où leur expression est rapidement

augmentée lors de diverses perturbations du parenchyme nerveux (pour revue, Kielian, 2006). L'expression des TLR3, 4 et 8 a ainsi été mise en évidence dans les neurones (Prehaud *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2006; Wadachi et Hargreaves, 2006) et tous les TLR ont été détectés dans les astrocytes (McKimmie et Fazakerley, 2005) avec une expression préférentielle du TLR3 (Jack *et al.*, 2005). Dans les cellules microgliales, les TLR 1 à 9 semblent exprimés constitutivement aussi bien chez la souris (Olson et Miller, 2004) que chez l'homme (Jack *et al.*, 2005), même si leur niveau d'expression est variable d'un individu à l'autre. Les agonistes des TLR sont des activateurs efficaces des cellules microgliales, en particulier le poly I:C (agoniste du TLR3), le LPS (lipopolysaccharide, agoniste du TLR4) et le CpG (agoniste du TLR9) qui vont induire la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que le tumor necrosis factor α (TNF α) ou l'interleukine-1 β (IL-1 β), de monoxyde d'azote (NO) ou encore favoriser la fonction de présentation antigénique de la microglie (Dalpke *et al.*, 2002; Olson et Miller, 2004).

La stimulation des **récepteurs au complément** est un autre moyen efficace pour activer les cellules microgliales. En effet, les cellules microgliales expriment constitutivement les récepteurs au complément (CR) 1, 3 et 4, dont le niveau d'expression augmente après activation (Kato *et al.*, 1996; Rotshenker, 2003). La plupart de ces récepteurs favorisent la phagocytose des pathogènes ou débris cellulaires. Le CR3 (CD11b/CD18), souvent utilisé pour marquer les cellules microgliales *in situ* chez la souris, permettrait par ailleurs une reconnaissance directe de certains motifs bactériens tels que le LPS (Ehlers, 2000) et par conséquent une activation rapide des cellules l'exprimant.

2.2.2. Activation par les cytokines

L'activation des cellules microgliales peut également être finement régulée par les cytokines présentes dans l'environnement. Ainsi ces cellules expriment un éventail large de récepteurs pour les cytokines. Parmi les différentes cytokines capables d'activer la microglie, l'IFN γ a été particulièrement étudié. Il permet d'augmenter l'expression des molécules du CMH cl. I et II, des costimulateurs CD80 et CD86, des récepteurs au complément, de molécules d'adhérence comme ICAM-1 à la surface de la microglie et potentialise donc leurs fonctions de présentation d'antigènes et de phagocytose. Il entraîne également la synthèse

d'autres cytokines par la microglie comme le TNF α ou l'IL-6 et contribue donc à créer une cascade inflammatoire lors d'une infection.

Les cellules microgliales sont également sensibles à certains facteurs de croissance hématopoïétiques comme le M-CSF, le GM-CSF ou l'IL-3 permettant leur prolifération. Cependant, ces facteurs peuvent aussi entraîner de profonds changements morphologiques et phénotypiques chez celles-ci. En effet, plusieurs auteurs ont montré que le GM-CSF entraînait des modifications moléculaires importantes au sein de la microglie, lui conférant alors une capacité importante à présenter les antigènes (Fischer *et al.*, 1993; Aloisi *et al.*, 2000; Re *et al.*, 2002). Par ailleurs, cette même cytokine après quelques jours de culture, permet à la microglie d'acquérir une morphologie et un phénotype semblable aux cellules dendritiques myéloïdes (Ponomarev *et al.*, 2005a).

2.2.3. Autres modes d'activation

Le cerveau est protégé derrière la barrière hémato-encéphalique, cependant certaines maladies neurodégénératives s'accompagnent d'une rupture partielle de celle-ci, permettant l'infiltration intra-parenchymateuse des éléments du sérum. L'albumine est la protéine la plus représentée dans le sérum et de façon intéressante, elle entraîne la prolifération et une augmentation du calcium intracellulaire dans les cellules microgliales (Hooper *et al.*, 2005).

Les cellules microgliales sont enfin rapidement activées suite à n'importe quel traumatisme neuronal même en dehors de toute infection. Ainsi, elles expriment des récepteurs purinergiques (Inoue, 2002) ou à certains neurotransmetteurs (Noda *et al.*, 2000; Charles *et al.*, 2003; Farber *et al.*, 2005), la présence excessive d'ATP ou de glutamate dans l'environnement étant synonyme de lésion cellulaire. De même, toute rupture physique du signal entre neurones et cellules microgliales entraînerait l'activation de ces dernières, en particulier par l'absence d'interaction entre la molécule CD200 et son récepteur (Broderick *et al.*, 2002).

2.3. Fonctions de la microglie

2.3.1. Fonctions de la microglie dans les réponses immunes du SNC

Comme toutes les cellules du système immunitaire, les cellules microgliales ont la particularité d'être très mobiles. Ainsi, lors de toute perturbation du parenchyme nerveux, elles ont tendance à s'accumuler sur le site de la lésion. Les raisons de cette migration ne sont pas encore complètement élucidées, mais le réseau de chimiokines et de leurs récepteurs au sein du système nerveux central est certainement impliqué. La microglie exprime de nombreux récepteurs aux chimiokines (CCR1, 2, 3, 5, 8 ; CXCR1, 2, 3, 4 ; CX3CR1) lui permettant de répondre à un grand nombre de chimiokines étant donné la redondance importante de ce système (Ambrosini et Aloisi, 2004). Les neurones et les astrocytes étant eux-mêmes capables de sécréter des chimiokines telles que CXCL10 notamment en cas d'ischémie, vont pouvoir recruter les cellules microgliales exprimant le récepteur CXCR3 directement sur le site lésé (Rappert *et al.*, 2002; Rappert *et al.*, 2004). Arrivées sur le site de la lésion, elles vont pouvoir exprimer tout leur potentiel de cellule immunocompétente et capturer l'antigène, le présenter aux lymphocytes T tout en modulant leur environnement par la sécrétion de facteurs pro- ou anti-inflammatoires.

Une étude récente vient également de montrer l'expression du récepteur CCR7 sur les cellules microgliales activées (Dijkstra *et al.*, 2006). De façon intéressante, ce récepteur est caractéristique des cellules migrant vers les organes lymphoïdes secondaires, suggérant que la microglie, comme les cellules dendritiques, puisse migrer vers les ganglions drainants pour alerter les lymphocytes T spécifiques de l'antigène.

2.3.1.1. Présentation des antigènes

Les cellules microgliales sont considérées comme les principales cellules immunocompétentes résidentes du système nerveux central, cependant, leur réelle capacité à présenter les antigènes est toujours controversée. Ceci peut être dû notamment aux divers types de cellules utilisées : cellules issues de cerveaux de nouveau-nés, cellules issues de cultures gliales mixtes, cellules primaires adultes ou encore lignées cellulaires et semble surtout dépendre de leur état d'activation.

Afin d'activer de façon optimale un lymphocyte T auxiliaire CD4⁺ naïf, deux signaux complémentaires sont nécessaires (Figure 11). Le premier est antigène spécifique, et consiste en l'interaction des molécules du CMH de classe II présentant le peptide antigénique à la surface de la cellule présentatrice d'antigènes, avec le complexe TCR-CD3 associé à la molécule CD4 à la surface du lymphocyte T. Ce signal, bien que nécessaire, n'est pas suffisant pour activer le lymphocyte T et au contraire le rend anergique en l'absence du second signal. Celui-ci consiste en l'interaction des molécules costimulatrices de la famille B7 sur la cellule présentatrice d'antigènes avec les molécules type CD28 sur le lymphocyte T. Tous les signaux costimulateurs n'ont pas la même conséquence sur le lymphocyte T et pourront ainsi l'activer pleinement ou au contraire l'inactiver pour terminer la réponse immunitaire (Figure 12).

Si la plupart des auteurs s'accordent à dire que les molécules de CMH de classe II ainsi que les molécules costimulatrices CD80 et CD86 ne sont pas exprimées à un niveau détectable sur la microglie quiescente (Havenith *et al.*, 1998; Matyszak *et al.*, 1999; Becher *et al.*, 2000; Mack *et al.*, 2003), en revanche, elles peuvent être très rapidement induites lors de toute perturbation du système nerveux central (Mack *et al.*, 2003; Ponomarev *et al.*, 2005b), en culture de façon spontanée (Dangond *et al.*, 1997) ou après stimulation par l'IFN γ (Matyszak *et al.*, 1999).

Ainsi les cellules microgliales ont tout le potentiel moléculaire pour pouvoir activer les lymphocytes T naïfs. Cependant, là encore, les divers résultats ne sont pas aussi clairs. Un consensus semble pourtant établi sur le fait que les cellules microgliales quiescentes sont de mauvaises présentatrices d'antigènes, ce qui finalement peut s'expliquer par le manque de costimulateurs à leur surface comme expliqué précédemment. Pourtant, elles sont capables d'activer les lymphocytes T CD8⁺ en test de présentation allogénique (Havenith *et al.*, 1998).

Après interaction avec un lymphocyte Th1, sécrétant en particulier de l'IFN γ , les cellules microgliales peuvent acquérir des capacités de présentation antigénique améliorées et réactiver très efficacement les lymphocytes T (Havenith *et al.*, 1998; Aloisi *et al.*, 2000). Allant dans le même sens, pour Matyszak et collaborateurs (1999), une simple stimulation ne serait pas suffisante et il faudrait passer par une cascade d'activation de la microglie pour obtenir ses capacités optimales de cellule présentatrice d'antigènes. Ainsi, avec une stimulation par du GM-CSF combiné à l'IFN γ et éventuellement au CD40-L, les cellules microgliales auraient une efficacité équivalente à celle des splénocytes pour activer des

lymphocytes T naïfs. De même, une étude récente publiée par Ponomarev et collaborateurs (2006) a clairement mis en évidence, grâce à des souris chimères déficientes en CD40 dans le cerveau, plusieurs stades d'activation de la microglie au cours de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), dépendant ou non de l'interaction avec les lymphocytes T. De façon intéressante, il semble que les cellules microgliales n'ayant pas été activées de manière optimale soient tout de même capables d'activer dans une certaine mesure les lymphocytes T en induisant leur différenciation en lymphocyte Th1 sécrétant IFN γ et IL-2 mais sans toutefois les faire proliférer (Carson *et al.*, 1999; Matyszak *et al.*, 1999). Ces résultats sont confirmés par des études *in vivo*, notamment au cours d'une infection par le virus de l'encéphalite murine de Theiler où les cellules microgliales uniquement au pic de la maladie sont des cellules présentatrices d'antigènes efficaces induisant prolifération et sécrétion d' IFN γ par les lymphocytes T (Mack *et al.*, 2003). Par ailleurs, Ponomarev et collaborateurs (2005b) ont montré que l'activation des cellules microgliales était corrélée avec l'infiltration de lymphocytes T et l'apparition des signes cliniques de l'EAE, bien avant l'arrivée des macrophages périphériques. De même, une « paralysie » des cellules microgliales, en utilisant une souris chimère avec la microglie sous l'influence d'un gène suicide, a pour conséquence une inhibition de la maladie (Heppner *et al.*, 2005), suggérant ainsi que les cellules microgliales ont un rôle prépondérant dans la présentation de l'antigène aux lymphocytes T encéphalitogènes.

Ainsi, il semblerait que ce soit le contact avec les lymphocytes T qui révèle les capacités de présentation antigénique de la microglie (Figure 13). Ce contact initial serait de faible affinité, les molécules à la surface de la microglie quiescente n'étant que faiblement représentées, entre le complexe CMH classe II/peptide et le TCR ainsi qu'entre les molécules costimulatrices B7 et CD28 (Fig.13 ①). Cette interaction entraînerait la sécrétion autocrine de TNF α par la microglie puis d'IL-12 permettant alors la différenciation du lymphocyte T en Th1 (Fig.13 ② et ③). Celui-ci sécrèterait de l' IFN γ (Fig. 13 ④) ayant pour conséquence une augmentation d'expression des molécules de CMH ainsi que des costimulateurs à la surface de la microglie (Fig. 13 ⑤) et donc une interaction renforcée entre les deux types cellulaires et une activation optimale de la microglie par l'intermédiaire de l'interaction entre les molécules CD40 et CD40-L (Fig. 13 ⑥), permettant la prolifération du lymphocyte T (Fig. 13 ⑦)(Becher *et al.*, 2000; Ponomarev *et al.*, 2006).

De façon intéressante, l'existence de diverses sous populations microgliales pouvant avoir des fonctions différentes pourrait expliquer les résultats variables observés avec ces

cellules. Ainsi une sous population pourrait être plus efficace que les autres pour présenter l'antigène aux lymphocytes T CD4⁺ et/ou aux lymphocytes T CD8⁺ (Walker *et al.*, 1995).

2.3.1.2. Phagocytose

La phagocytose est un mécanisme important et nécessaire pour l'élimination des micro-organismes et/ou des déchets issus de la réaction inflammatoire et pour l'élimination des cellules mortes avant leur nécrose en conditions physiologiques. Au cours du développement, cette fonction a un rôle prépondérant dans le remodelage du système nerveux central et les cellules microgliales fœtales en sont les principales responsables (Ferrer *et al.*, 1990).

Chez l'adulte, les cellules microgliales, comme les macrophages, sont capables de phagocytose, même si cette fonction est atténuée chez la microglie quiescente. En cas d'inflammation, en revanche, elles récupèrent cette capacité, notamment en exprimant plus fortement les récepteurs d'épuration de type SR-A et le récepteur au complément CR3 (Reichert et Rotshenker, 2003). En particulier, elles éliminent les lymphocytes T apoptotiques, inhibant ainsi l'inflammation (Chan *et al.*, 2003) et la prolifération des lymphocytes T adjacents (Magnus *et al.*, 2001). Ainsi, cette fonction peut être bénéfique pour terminer une réponse inflammatoire, mais elle peut s'avérer néfaste lors de la phagocytose de la myéline aboutissant à la présentation antigénique et à l'activation des lymphocytes T encéphalitogènes (Smith, 2001). Il semblerait toutefois que les cellules microgliales soient de moins bons phagocytes que les macrophages périphériques (Mosley et Cuzner, 1996). Cependant, face à une démyélinisation du nerf optique, les macrophages périphériques sont moins efficaces que lorsqu'il s'agit du nerf sciatique, montrant que l'environnement particulier du système nerveux central serait responsable au moins en partie de cette moindre performance de la microglie (Kuhlmann *et al.*, 2002).

2.3.1.3. Sécrétion de cytokines et autres facteurs

Pour communiquer entre elles et réguler les réponses inflammatoires, les cellules immunitaires utilisent des facteurs solubles que sont les cytokines. Les cellules microgliales sont ainsi capables de sécréter tout un éventail de cytokines aussi bien pro- que anti-inflammatoires, ou encore des facteurs cytotoxiques ou neurotrophiques (figure 14).

Elles sécrètent notamment du « transforming growth factor β » (**TGF β**), généralement après avoir été activées (Chao *et al.*, 1995; da Cunha *et al.*, 1997), ce qui contribue au statut immunitaire particulier du système nerveux central. De même, les cellules microgliales sont une source potentielle de 1,25-dihydroxyvitamine D3 (Neveu *et al.*, 1994c), responsable notamment de la sécrétion de facteurs neurotrophiques par les astrocytes (Neveu *et al.*, 1994a; Neveu *et al.*, 1994b; Naveilhan *et al.*, 1996). Elles peuvent également contrôler leur propre activation et un environnement pro-inflammatoire comme au cours de l'EAE en sécrétant de **l'IL-10** dont les activités anti-inflammatoires sont bien connues (Jander *et al.*, 1998; Aloisi *et al.*, 1999a). Malheureusement, elles sécrètent également ce facteur au sein des tumeurs cérébrales et peuvent donc contribuer à l'échappement de celles-ci au système immunitaire (Wagner *et al.*, 1999).

En cas d'inflammation, elles deviennent une source importante de cytokines pro-inflammatoires ou de facteurs cytotoxiques qui pourront avoir des effets bénéfiques comme néfastes. L'**IL-1** par exemple, participe normalement à la régulation du sommeil, de l'alimentation ou à la transmission synaptique. Lors d'une inflammation, les cellules microgliales sont une source importante et très précoce de cette cytokine (Davies *et al.*, 1999) qui provoque alors la production de médiateurs de l'inflammation tels que TNF α , IL-6 ou la cyclo-oxygénase 2 (Basu *et al.*, 2002), ce qui placerait l'IL-1 en tête des cascades inflammatoires dans le système nerveux central (Basu *et al.*, 2004). Le TNF α produit par la suite montre également des effets ambigus. Il a une action pro-inflammatoire et par un effet autocrine permet une activation plus importante de la microglie (Kuno *et al.*, 2005). Cette cytokine a aussi une action toxique directe sur les neurones et les oligodendrocytes (Cacci *et al.*, 2005), montrant un côté néfaste de l'activation microgliale. Pourtant les effets du TNF α ne sont pas uniquement délétères et des souris déficientes pour cette cytokine sont plus sensibles aux affections neuronales (Bruce *et al.*, 1996). Dans le même sens, le TNF α peut favoriser la survie et la prolifération des neurones en induisant la sécrétion de facteurs neurotrophiques (Carlson *et al.*, 1999; Nicholas *et al.*, 2002). Ainsi, de faibles concentrations en TNF α seraient bénéfiques alors que de fortes concentrations et/ou une présence chronique auraient des effets toxiques. L'action toxique du TNF α peut être médiée en partie par l'induction de la NO synthétase inductible (iNOS) dans les cellules microgliales.

Le monoxyde d'azote (**NO**), produit constitutivement par l'activité des NO synthétases neuronale et endothéliale joue un rôle physiologique important en tant que neurotransmetteur, pour l'établissement de synapses, ou pour la différenciation de certaines

populations neuronales (Yun *et al.*, 1997). Le NO produit en grande quantité lors de l'activation microgliale après stimulation par du LPS, peut entraîner la mort des cellules neuronales. En se combinant à un anion superoxyde notamment, il va générer du peroxy-nitrite et devenir hautement toxique pour les oligodendrocytes (Li *et al.*, 2005a). Mais là encore, les effets observés du NO sont variables et semblent dépendre de l'état d'oxydation de cette molécule, le radical libre NO étant toxique et l'ion nitrosonium NO⁺ étant plutôt neuroprotecteur (Lipton *et al.*, 1993).

Après stimulation par de l'IFN γ ou du LPS ou après contact avec des lymphocytes Th1 (Aloisi *et al.*, 1997), les cellules microgliales sont capables de sécréter des cytokines de la **famille de l'IL-12** ce qui plaide en faveur de leur capacité à présenter les antigènes. La microglie, en plus de l'IL-12, peut ainsi sécréter de l'IL-23 (Li *et al.*, 2003; Sonobe *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007) et de l'IL-27 (Li *et al.*, 2005b; Sonobe *et al.*, 2005) et favoriser une réponse Th1 comme cela a été montré au cours de l'EAE (Becher *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2005b). En contrôlant la balance Th1/Th2 dans le cerveau, (Krakowski et Owens, 1997), la microglie peut ainsi favoriser le développement d'une réponse cytotoxique bénéfique pour l'élimination d'une infection virale ou d'une tumeur, mais néfaste dans le cas d'une maladie auto-immune dépendant des lymphocytes Th1 telle que l'EAE.

2.3.2. La microglie, cellule neuroprotectrice

L'activité des cellules microgliales a longtemps été considérée comme néfaste vis-à-vis des neurones. Cependant, une idée de plus en plus répandue est que finalement, les cellules microgliales seraient fondamentalement neuroprotectrices et que seule leur suractivation ou leur dysfonctionnement pourrait entraîner des dommages neuronaux (pour revues Polazzi et Contestabile, 2002; Streit, 2002). En effet, les relations entre cellules microgliales et neurones, longtemps ignorées, ont pourtant un rôle crucial dans la physiologie de ces deux types cellulaires qui sont en relation étroite et communiquent par des jonctions gap (Dobrenis *et al.*, 2005). Comme discuté précédemment, la rupture de l'interaction entre le récepteur neuronal CD200 et son ligand microglial entraînerait l'activation de la microglie. Au cours de l'uvéite auto-immune, des souris déficientes en CD200 montrent ainsi des signes cliniques plus précoces et des cellules microgliales iNOS⁺ en nombre supérieur par rapport aux animaux sauvages. L'une des hypothèses actuelles est que les neurones maintiendraient la microglie dans son état quiescent par l'intermédiaire de cette interaction (Broderick *et al.*, 2002). Ce contrôle de l'activité microgliale par les neurones se confirme notamment par les

travaux de Neumann et collaborateurs (1998) montrant l'inhibition de l'expression des molécules du CMH cl.II sur les cellules microgliales en présence de NGF, BDNF et NT-3 d'origine neuronale.

Par ailleurs, contrairement à ce qui a longtemps été pensé, l'activation des cellules microgliales n'a pas forcément de conséquences néfastes sur l'activité neuronale et peut même s'avérer très bénéfique. Dans un modèle de culture d'agrégats cellulaires, le milieu conditionné de cellules microgliales activées par le LPS favorise la migration et la différenciation des précurseurs neuronaux (Aarum *et al.*, 2003). Après ischémie cérébrale ou lésion de la moelle épinière, les neurones sont protégés ou repoussent mieux après greffe de cellules microgliales (Rabchevsky et Streit, 1997; Kitamura *et al.*, 2004). Ces fonctions bénéfiques pourraient s'expliquer par la sécrétion microgliale de facteurs neurotrophiques lors d'une inflammation (Heese *et al.*, 1998) : bNGF (« nerve growth factor »), NT-3, NT-4/5 (neurotrophines 3, 4, 5), BDNF (« brain derived neurotrophic factor »), GDNF (« glial cell derived neurotrophic factor ») ont ainsi été décrits dans les cellules microgliales (Elkabes *et al.*, 1996; Miwa *et al.*, 1997; Batchelor *et al.*, 1999; Nakajima *et al.*, 2001)(Figure 14). De façon intéressante, en plus de leur action trophique sur les neurones, ces molécules ont des effets variés sur la microglie. Ainsi NT-3 et BDNF favorisent la prolifération et/ou la phagocytose des cellules microgliales (Elkabes *et al.*, 1996), NGF ou NT-3 inhibent l'augmentation de B7 et de CD40 induite par le GM-CSF (Wei et Jonakait, 1999) et les neurotrophines NGF, BDNF et NT-3 inhibent l'induction de CMH cl.II due à l' IFN γ (Neumann *et al.*, 1998).

Ainsi les cellules microgliales sous le contrôle des neurones restent dans leur état quiescent. Lors de la rupture de ce contact, les cellules microgliales sont immédiatement activées et tentent de protéger les neurones lésés en formant une barrière autour d'eux et de favoriser leur réparation en sécrétant des facteurs neurotrophiques, aidées en cela par les astrocytes (cf. § 2.4.2). En cas d'échec ou d'environnement très inflammatoire, elles atteignent un stade d'activation plus important susceptible de causer des dommages collatéraux (Figure 15).

2.4. Microglie et autres cellules immunocompétentes du SNC

2.4.1. Microglie et macrophages périvasculaires

Les cellules périvasculaires, incluant notamment les péricytes et les macrophages périvasculaires, sont comprises totalement ou partiellement dans la lame basale des vaisseaux sanguins, contrairement à la microglie, extérieure à celle-ci. Leur phénotype est proche de celui des macrophages périphériques, à savoir CD11b⁺, CD11c⁺, CD45⁺, CMH cl. II⁺, FcR⁺ (Ford *et al.*, 1995; Thomas, 1999). Les cellules périvasculaires peuvent être identifiées *in situ* chez le rat par l'expression d'une protéine membranaire reconnue par l'anticorps ED2 (Graeber *et al.*, 1989), par l'expression de CD163 chez l'homme (Fabriek *et al.*, 2005), et par l'expression du récepteur au mannose chez la souris (Galea *et al.*, 2005). Il semblerait que ces cellules soient capables de présenter les antigènes même si la difficulté à les isoler en quantité suffisante limite les investigations directes. Cependant, Ford et collaborateurs (1995) ont trié les cellules CD45^{high} du cerveau et ont montré leur capacité à activer des lymphocytes T encéphalitogènes, même si dans cette étude, seule une proportion des cellules était ED2⁺. Les autres études concernant le rôle des cellules périvasculaires ont surtout été réalisées par l'utilisation de liposomes contenant du chlodronate, permettant l'élimination sélective des macrophages et des cellules périvasculaires sans affecter la microglie. Le rôle protecteur des cellules périvasculaires lors d'infection par des bactéries ou des champignons a ainsi pu être montré de même que leur importance pour le recrutement des cellules immunitaires périphériques mais sans réelle conclusion quant à leur capacité à présenter les antigènes (Polfliet *et al.*, 2001; Aguirre et Miller, 2002; Polfliet *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2004).

Il pourrait par ailleurs exister un lien phylogénétique entre microglie et macrophages périvasculaires, ces derniers pouvant infiltrer le parenchyme nerveux en traversant la lame basale des vaisseaux sanguins et se différencier en microglie (Thomas, 1999; Bechmann *et al.*, 2001).

2.4.2. Microglie versus astrocytes

Les astrocytes, originaires du neuroectoderme, appartiennent à la macroglie et ont un rôle fondamental au sein du système nerveux central. Ils contribuent ainsi à la formation de la barrière hémato-encéphalique par leurs pieds entourant la lame basale des vaisseaux sanguins

et ont une fonction primordiale dans l'homéostasie du système nerveux central (sécrétion de facteurs neurotrophiques, régulation du pH, régulation des fonctions neuronales).

A côté de ces fonctions de soutien, lors d'une perturbation du parenchyme nerveux, les astrocytes s'activent (phénomène appelé astroglie) et contribuent à la protection puis à la réparation des tissus lésés, puisque leur élimination par la thymidine kinase aggrave les conséquences d'une blessure pratiquée dans le parenchyme cérébral ou la moelle épinière (Faulkner *et al.*, 2004; Myer *et al.*, 2006). Avec les autres cellules gliales, ils entraînent la formation de cicatrices gliales entourant des neurones lésés afin de les isoler du tissu sain et sont également une source importante de facteurs neurotrophiques (Condorelli *et al.*, 1994; Neveu *et al.*, 1994a; Condorelli *et al.*, 1995). Les astrocytes peuvent par ailleurs participer directement aux réponses immunes (Dong et Benveniste, 2001). Ils expriment ainsi certains membres de la famille des TLR et peuvent donc reconnaître les pathogènes (Jack *et al.*, 2005), peuvent sécréter des cytokines telles que l'IL-1, l'IFN β , le GM-CSF ainsi que de nombreuses chimiokines (Falsig *et al.*, 2006). Ces cytokines ont notamment pour particularité de recruter et d'activer très efficacement les cellules microgliales, qui à leur tour vont entretenir l'activation astrocytaire par la sécrétion d'IL-6. En revanche, leur capacité à présenter les antigènes est très controversée. En l'absence de stimulus, les astrocytes n'expriment pas les molécules du CMH cl. II. Après activation par de fortes concentrations d'IFN γ , ils peuvent exprimer ces molécules ainsi que les costimulateurs B7 *in vitro* (Nikceovich *et al.*, 1997; Tan *et al.*, 1998; Cornet *et al.*, 2000). Malgré cela, ils ne semblent pas très efficaces pour activer les lymphocytes T par comparaison aux autres cellules présentatrices d'antigènes et en particulier la microglie (Aloisi *et al.*, 1999b). De façon intéressante, l'expression des molécules du CMH cl.II astrocytaires semble beaucoup plus contrôlée que celle des cellules microgliales. Ainsi, les gangliosides, très présents dans le système nerveux central, provoquent l'inhibition de l'expression des molécules du CMH cl.II induite par l'IFN γ sur les astrocytes (Massa, 1993). De même, si la protéine amyloïde β ou une combinaison IFN γ et TNF α ou IFN γ et IL-1 bloquent l'induction de CMH cl.II sur les astrocytes, ces stimuli ont plutôt tendance à activer très efficacement la microglie (Pazmany *et al.*, 1999; Gresser *et al.*, 2000). Les travaux de Soos et collaborateurs (1999) montrent également que les astrocytes seraient capables de présenter l'antigène efficacement aux lymphocytes T seulement après un certain temps passé en culture : les lignées immortalisées 7 jours après isolement n'expriment pas B7-1, même après activation par l'IFN γ , alors que des lignées immortalisées 45 jours après isolement deviennent capables de favoriser une réponse Th1 en exprimant B7-1. De même dans un

modèle d'EAE monophasique chez la souris, les astrocytes n'expriment ni au pic inflammatoire ni en phase de rémission les costimulateurs B7 pourtant observés dans les infiltrats inflammatoires (D. Couez, communication personnelle). Ainsi, les astrocytes nécessitant une stimulation importante pour exprimer les molécules immunostimulatrices interviendraient tardivement et modèleraient les réponses inflammatoires en favorisant une réponse type Th2 (Aloisi *et al.*, 1998; Kort *et al.*, 2006), voire en induisant des lymphocytes T régulateurs (Trajkovic *et al.*, 2004). Finalement, les astrocytes ne seraient que des cellules présentatrices d'antigènes accessoires, plutôt inefficaces pour ingérer et préparer les antigènes, contrairement à la microglie (Gresser *et al.*, 2001; Kort *et al.*, 2006) et induisant un environnement propice à l'arrêt des réactions inflammatoires.

2.4.3. Microglie et macrophages périphériques

Un certain nombre de maladies neurodégénératives sont caractérisées par l'infiltration au sein du parenchyme nerveux de cellules sanguines et notamment de monocytes se différenciant *in situ* en macrophages. A cause de la difficulté à distinguer microglie activée et macrophages, les fonctions respectives de ces deux types cellulaires dans le système nerveux central sont difficiles à déterminer.

Chez l'homme, l'antisérum hGLUT5 reconnaît spécifiquement les cellules microgliales (Sasaki *et al.*, 2003) et l'anticorps ED2 chez le rat marque tous les macrophages sauf la microglie (Graeber *et al.*, 1989). Malgré ces outils, peu d'informations sur la fonction respective microglie – macrophages ont été apportées. Chez la souris, aucun outil n'est actuellement disponible obligeant à utiliser des modèles plus complexes. Ainsi dans un modèle de souris chimère reconstituée par une moelle osseuse de souris transgénique GFP, dans lesquelles les cellules sanguines sont GFP⁺ et les cellules microgliales restent GFP⁻, Schilling et ses collaborateurs (2003) ont montré que les cellules microgliales GFP⁻ étaient les premières à être activées et les plus nombreuses suite à une ischémie cérébrale. En mettant les cellules microgliales sous le contrôle de la thymidine kinase, Heppner et collaborateurs (2005) ont également montré que leur déplétion bloquait le développement de l'EAE. Mais malgré ces astuces ingénieuses, il ne peut pas être exclu que la construction de la souris ne biaise pas les fonctions immunitaires des diverses cellules.

2.4.4. Microglie et cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont les cellules présentatrices d'antigènes les plus performantes de l'organisme (Banchereau et Steinman, 1998). Situées principalement aux portes d'entrées stratégiques des pathogènes (peau, intestin, muqueuses), elles sont caractérisées dans leur stade immature par une forte capacité à endocyter les antigènes, une faible expression des molécules du CMH cl.II et des costimulateurs B7. Au moindre signal de danger (pathogènes, cytokines pro-inflammatoires...), elles entament un processus de maturation comprenant une migration vers les ganglions lymphatiques drainants sous l'influence notamment de CCR7 (Riol-Blanco *et al.*, 2005; Sanchez-Sanchez *et al.*, 2006), un changement de morphologie avec l'acquisition de nombreux prolongements cytoplasmiques augmentant la surface de contact avec les lymphocytes T et un changement de phénotype, les cellules dendritiques matures exprimant fortement les molécules du CMH cl.II ainsi que les costimulateurs B7 (Amigorena, 1999). Sous cette forme mature, elles sont les seules à pouvoir activer des lymphocytes T naïfs CD4⁺ et CD8⁺. La famille des cellules dendritiques n'est pas homogène et de nombreuses sous-populations sont décrites, présentant un phénotype et/ou des fonctions différentes, aussi bien chez la souris que chez l'homme (Hochrein *et al.*, 2001; Kuwana, 2002; Ardavin, 2003; Heath *et al.*, 2004; Dubsky *et al.*, 2005).

Dans un système nerveux central sain, elles sont absentes, à l'exception de certaines zones en contact avec le liquide céphalo-rachidien (méninges, plexus choroïdes) (Matyszak et Perry, 1996; Serot *et al.*, 1997; Serot *et al.*, 2000). Par contre, ces cellules ont été décrites au cours de phénomènes inflammatoires tels que l'ischémie cérébrale (Reichmann *et al.*, 2002), une infection par le bacille de Calmette-Guérin (Matyszak et Perry, 1996), par *toxoplasma gondii* (Fischer *et al.*, 2000), ou encore au cours de l'EAE (Fischer et Reichmann, 2001). Ces cellules pourraient être responsables de l'initiation des réponses immunitaires contre les antigènes du système nerveux central en migrant vers les ganglions lymphatiques drainants (Karman *et al.*, 2004). Leur implication dans l'activation des lymphocytes T n'est pourtant pas aussi claire : dans un modèle d'EAE, Suter et collègues (2003) ont montré la capacité des cellules dendritiques issues du cerveau de souris au pic inflammatoire de la maladie à inhiber la prolifération des lymphocytes T alors que dans un modèle d'infection par le toxoplasme, les cellules CD11c⁺ isolées du cerveau semblent au contraire avoir un fort pouvoir de présentation antigénique (Fischer *et al.*, 2000).

L'origine de ces cellules reste également incertaine. Les trois possibilités évoquées sont (1) une prolifération importante des cellules situées dans les plexus choroïdes et les méninges, (2) l'infiltration de monocytes se différenciant *in situ* en cellules dendritiques et (3) la différenciation de cellules résidentes en cellules dendritiques.

La première hypothèse est basée essentiellement sur la rapidité d'apparition des cellules et le fait qu'elles ne sont pas toujours observées en présence d'infiltrats sanguins. De façon intéressante, Nataf et collaborateurs (2006) ont récemment montré chez le rat la présence de précurseurs myéloïdes dans les plexus choroïdes, capables *in vitro* de générer aussi bien des macrophages (source potentielle de cellules microgliales), que des cellules dendritiques.

Concernant la seconde hypothèse, Newman et collègues en 2005, lors d'une lésion cérébrale induite par de l'acide kainique, ont montré que les cellules dendritiques apparaissant lors de la phase inflammatoire n'étaient pas affectées par la déplétion des cellules périsvasculaires, mais étaient éliminées par une irradiation de l'animal, démontrant l'origine périphérique de celles-ci. Cette différenciation de précurseurs hématopoïétiques ou monocytes sanguins infiltrants en cellules dendritiques semble donc probable même s'il semble de plus en plus évident que des cellules précurseurs du cerveau puissent être une autre source (Reichmann *et al.*, 2002).

Comme expliqué précédemment, des cellules précurseurs myéloïdes existent toute la vie de l'individu dans le parenchyme nerveux (Alliot *et al.*, 1991). De plus, le phénotype des cellules dendritiques cérébrales CD11b⁺ CD11c⁺ CD45⁺ F4/80⁺ CD8α⁻ CD205⁻ penche en faveur d'une origine myéloïde de celles-ci. Enfin, elles expriment un niveau intermédiaire de CD45. Toutes ces raisons ont amené de nombreuses équipes à penser que la microglie pourrait se différencier en cellules dendritiques. Cette idée a depuis été confirmée puisque des cellules issues de cultures mixtes (Fischer et Bielinsky, 1999; Fischer *et al.*, 2000) ou des cellules microgliales adultes quiescentes CD11b⁺ CD11c⁻ (Fischer et Reichmann, 2001; Ponomarev *et al.*, 2005a) cultivées *in vitro* en présence de GM-CSF deviennent CD11c⁺ et acquièrent une morphologie typiquement dendritique. Finalement, les cellules microgliales ne seraient pas vraiment engagées vers la voie macrophage ou la voie dendritique et seraient des précurseurs myéloïdes immatures capables de s'adapter aux diverses situations existant dans le système nerveux central (Santambrogio *et al.*, 2001). Les astrocytes semblent avoir une fonction primordiale dans cette différenciation en tant que source de GM-CSF et de M-CSF (Fischer et Bielinsky, 1999; Santambrogio *et al.*, 2001). Les cellules microgliales différenciées en cellules dendritiques présentent efficacement l'antigène aux lymphocytes T

naïfs et provoquent leur différenciation en lymphocyte Th1 en sécrétant de l'IL-12 (Fischer et Reichmann, 2001). Cependant, l'environnement des cellules microgliales est primordial et cette fonction de cellule présentatrice d'antigènes professionnelle peut être modulée positivement par l'IFN γ , le TNF α ou le LPS (Santambrogio *et al.*, 2001) ou négativement par le TGF β (Xiao *et al.*, 2002).

II. MICROGLIE ET TUMEURS DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL

1. PRESENTATION DES TUMEURS CEREBRALES

Les tumeurs cérébrales représentaient en 1985 1,7% des décès par cancer, chiffre atteignant 2% après 35 ans (www.onco-paysdelaloire.asso.fr). Elles représentent par ailleurs le cancer solide le plus fréquent chez l'enfant et la deuxième cause de décès par cancer chez ceux-ci. Les tumeurs cérébrales touchent beaucoup les individus jeunes et représentent ainsi la troisième cause de mortalité par cancer des adultes dans la tranche d'âge 15-34 ans. Tous traitements confondus, le taux de mortalité est supérieur à 50% après 5 ans mais dépend largement de l'agressivité de la tumeur, les glioblastomes laissant une espérance de survie moyenne inférieure à 12 mois. Les signes cliniques de la maladie sont variés et dépendent de la localisation et de la vitesse de croissance de la tumeur (www.pharmclin.uhp-nancy.fr). Les tumeurs cérébrales sont ainsi généralement diagnostiquées en raison d'une fonction neurologique altérée (vision, langage, mémoire, fonctions motrices) ou de signes associés à une augmentation de pression intracrânienne (nausées, vomissements, vision altérée, pertes de conscience) (Figure 16).

Les tumeurs cérébrales sont de deux grands types : tumeurs primaires et tumeurs secondaires. Les premières proviennent de la multiplication anarchique d'une cellule originaire du système nerveux central. **Les tumeurs cérébrales primaires** sont classées par l'Organisation Mondiale pour la Santé en fonction de leur origine cellulaire ainsi que de leur grade histologique. Les gliomes sont les tumeurs cérébrales primaires les plus fréquentes (>40%). Inclus dans cette catégorie, les astrocytomes (originaires des astrocytes) sont les plus représentés et peuvent évoluer selon quatre grades : astrocytome pilocytique, généralement pédiatrique (grade 1), astrocytome de bas grade (grade 2), astrocytome anaplasique (grade 3) et glioblastome (grade 4). Les autres gliomes sont les oligodendrogliomes (originaires des

oligodendrocytes, de grade 2 ou 3) ou les oligo-astrocytomes (ou tumeurs mixtes). D'autres types de tumeurs cérébrales sont les épendymomes se développant le plus souvent dans les ventricules cérébraux et la moelle épinière et bloquant la circulation du LCR, les médulloblastomes, tumeurs malignes les plus fréquentes chez l'enfant, les adénomes hypophysaires produisant des hormones ou non et classés selon l'hormone synthétisée, les méningiomes, tumeurs les plus communes et pratiquement toujours bénignes pouvant poser des problèmes d'ablation. Elles comprennent aussi les lymphomes primitifs du système nerveux central, plus rares, qui pour une raison inconnue, restent limités au cerveau et se rencontrent notamment chez les malades du SIDA ou ayant subi une greffe d'organe.

Les tumeurs secondaires sont le résultat d'une métastase provenant d'un autre organe. Bien que n'importe quel cancer puisse métastaser dans le cerveau, les plus fréquents sont ceux du poumon, du sein et les mélanomes. Ces tumeurs sont loin d'être négligeables puisqu'elles représentent jusqu'à 30% de l'ensemble des tumeurs cérébrales et sont donc aussi fréquentes sinon plus que les glioblastomes.

2. REPOSE DU SYSTEME IMMUNITAIRE FACE A DES CELLULES MALIGNES

2.1. Réponse cellulaire anti-tumorale idéale

Les tumeurs ne sont pas nécessairement reconnues comme étrangères par le système immunitaire et ne sont donc pas considérées comme un danger à éliminer. Cependant, dans certains cas, elles peuvent exprimer à leur surface des antigènes tumoraux (normalement absents du tissu sain ou exprimés en très faible quantité) ou présenter un soi altéré, c'est-à-dire des molécules du CMH cl.I absentes ou modifiées. Dans ces deux cas notamment, le système immunitaire va pouvoir mettre en place une immunité anti-tumorale adaptée permettant éventuellement leur élimination (Figure 17). L'expression de molécules du CMH cl.I altérées ou leur absence va entraîner l'activation des cellules NK (natural killer). Celles-ci vont alors lyser avec l'aide des macrophages les cellules cibles et sécréter des cytokines pro-inflammatoires permettant le recrutement des autres acteurs du système immunitaire. La croissance de la tumeur va également conduire à la mort des cellules les plus enfouies, n'ayant plus accès aux nutriments nécessaires à leur survie. Les cellules dendritiques sentinelles vont ingérer les cellules tumorales lysées ou leurs débris et vont migrer *via* la

lymphe ou le sang vers les organes lymphoïdes secondaires. Arrivées dans les ganglions lymphatiques drainants, elles vont présenter les antigènes tumoraux aux lymphocytes T CD4⁺. Une fois activés, ils vont envoyer par le biais du CD40-Ligand (CD40-L) le second signal de maturation aux cellules dendritiques qui synthétisent alors de l'IL-12. Différenciés en lymphocyte Th1, ils vont alors fournir l'aide nécessaire pour l'activation des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques spécifiques de la tumeur. Ces derniers vont retourner sur le site d'où sont venues les cellules dendritiques et vont lyser spécifiquement les cellules tumorales exprimant l'antigène ayant permis leur activation (Calzascia *et al.*, 2005). Les lymphocytes Th1 permettent aussi dans une certaine mesure la prolifération et la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes qui par l'intermédiaire de leurs anticorps lyseront également la cellule cible en présence du complément (Catros-Quemener *et al.*, 2003).

2.2. Intérêt de la présentation croisée

Ainsi, dans le cadre d'une immunothérapie, l'un des objectifs majeurs est de réussir à activer efficacement les lymphocytes T cytotoxiques, effecteurs principaux spécifiques de la tumeur. Dans ce sens, une attention particulière est portée sur un mode de présentation non classique de l'antigène : la présentation croisée. Classiquement, les antigènes protéiques exogènes (bactérie, tumeur...) sont endocytés par des cellules présentatrices d'antigènes, puis suivent une voie d'apprêtement de l'antigène conduisant à leur dégradation sous forme de peptides dans les vésicules d'endocytose ou de phagocytose, puis à leur association aux molécules du CMH cl.II suite à la fusion avec les vésicules MIIC contenant ces dernières. Cette voie de présentation aboutit à l'interaction avec les lymphocytes T CD4⁺ (Figure 18a). Les antigènes endogènes (propres à la cellule ou viraux), quant à eux, sont dégradés dans le cytosol grâce au protéasome, puis vont intégrer le réticulum endoplasmique où se trouvent les molécules du CMH cl.I vides, par l'intermédiaire d'un complexe multimoléculaire enchâssé dans la membrane de celui-ci : le complexe TAP (« transporter associated with antigen processing »). Le complexe CMH cl.I/peptide antigénique, potentiellement exprimé par n'importe quelle cellule nucléée de l'organisme, permet l'interaction avec les lymphocytes T cytotoxiques (Figure 18b). La présentation croisée est un intermédiaire entre les deux autres voies et permet la présentation des peptides exogènes directement dans les molécules du CMH cl.I et permet donc l'activation directe des lymphocytes T cytotoxiques (Figure 18c). Ce mécanisme de présentation antigénique a été décrit jusqu'alors principalement dans les

cellules dendritiques et les macrophages (Mellman et Steinman, 2001; Brode et Macary, 2004), même si certaines études ont montré que les neutrophiles (Tvinnereim *et al.*, 2004) et les lymphocytes B (Heit *et al.*, 2004) seraient également capables d'activer les lymphocytes T cytotoxiques dans certaines conditions. La présentation croisée n'est pas encore complètement comprise et de nombreuses questions restent ouvertes telles que la ou les forme(s) d'antigène(s) présenté(s) de cette manière ou encore les voies intracellulaires utilisées pour amener l'antigène exogène au sein des molécules du CMH cl.I (Shen et Rock, 2006). Il semblerait toutefois que les protéines soient les mieux adaptées ou éventuellement les peptides associés aux chaperonnes de la famille HSP (« heat shock protein », protéines de choc thermique) (Delneste, 2004). De même, si elles ne sont pas complètement élucidées, cinq voies possibles de présentation croisée sont décrites (Guernonprez et Amigorena, 2005)(Figure 19) : la voie phagosome vers cytosol vers phagosome (fig 19a) où l'antigène après avoir été ingéré, est exporté vers le cytosol, dégradé par le protéasome puis ré-intégré dans le phagosome par le complexe TAP ; la voie vacuolaire (fig 19b) où l'antigène est dégradé directement dans le phagosome ; la voie du phagosome vers le cytosol (fig 19c) avec une sortie de l'antigène vers le cytosol, sa dégradation par le protéasome puis l'entrée des peptides résultants dans le reticulum endoplasmique de manière TAP-dépendante ; la voie endosome vers réticulum endoplasmique (fig 19d) suivant laquelle les antigènes solubles suivent un transport rétrograde jusqu'au reticulum endoplasmique, sont ré-exportés vers le cytosol, dégradés par le protéasome puis ré-intègrent le reticulum endoplasmique via TAP et enfin, la voie des jonctions gap (fig 19d) concernant plutôt des peptides entrant dans la cellule par une jonction gap puis intégrant directement le reticulum endoplasmique via TAP.

3. STRATEGIES D'ÉCHAPPEMENT DES TUMEURS

Dans le système nerveux central, certaines étapes clés de la réponse anti-tumorale ne peuvent pas se dérouler tout à fait de la même manière qu'en périphérie, dans un souci de protection des neurones qui ont perdu leur capacité à se renouveler (Walker *et al.*, 2003). Ainsi, présentation des peptides antigéniques dans un contexte inflammatoire, migration des antigènes vers les ganglions lymphatiques, activation et migration des lymphocytes T dans le parenchyme nerveux sont autant d'étapes beaucoup plus contrôlées qu'en périphérie. Toutes ces précautions ont une importance capitale pour préserver la population neuronale des conséquences d'une réaction inflammatoire non contrôlée. Cependant, elles posent un problème supplémentaire lors du développement d'une tumeur cérébrale : le système

immunitaire, pour se débarrasser des cellules malignes, devra non seulement surpasser tous les mécanismes d'inhibition apportés par la tumeur, mais également ceux liés au système nerveux central lui-même.

Les tumeurs cérébrales ont une grande capacité à infiltrer le tissu sain, même sur de grandes distances, ce qui rend leur élimination complète par chirurgie difficile voire impossible et explique les nombreux cas de rechute suite à une exérèse initiale. En revanche, ces tumeurs restent cloisonnées dans le système nerveux central sans jamais générer de métastases. Par ailleurs, elles sont protégées derrière la barrière hémato-encéphalique, dont les pompes à efflux ont tendance à éliminer les drogues administrées au cours de séances de chimiothérapie (Bart *et al.*, 2000; Tamai et Tsuji, 2000; Steuer *et al.*, 2005). De manière générale, elles peuvent tirer profit de toutes les particularités du système nerveux central (peu de molécules du CMH, drainage lymphatique non conventionnel, cellules présentatrices d'antigènes maintenues sous contrôle, présence constitutive de facteurs immunosuppresseurs) pour proliférer.

En plus de tout cela, les tumeurs savent tirer partie de toutes les faiblesses du système immunitaire et surtout ont trouvé de nombreuses voies pour échapper à son contrôle (Figure 20). Ces mécanismes d'échappement, surtout étudiés dans les tumeurs situées en périphérie, peuvent aussi être utilisés au moins pour certains par les tumeurs cérébrales (Walker *et al.*, 2002).

3.1. Phénomènes de tolérance, cellules suppressives

La **tolérance centrale** est un mécanisme indispensable à la survie de l'individu. Cette étape essentielle se déroule dans le thymus, où les cellules dendritiques, macrophages et cellules épithéliales thymiques présentent aux thymocytes les antigènes du soi. Seuls les thymocytes capables d'interagir avec les molécules du CMH sont conservés (sélection positive). Parmi ceux-ci, ceux ayant une faible affinité pour les antigènes du Soi sont conservés et constituent le répertoire T alors que ceux qui ont une affinité importante pour les auto-antigènes sont dangereux et sont donc éliminés (sélection négative) ou constituent une population particulière de lymphocytes, les lymphocytes T régulateurs (Coutinho *et al.*, 2005). De cette manière, les lymphocytes T susceptibles de reconnaître les auto-antigènes tumoraux (qui par définition appartiennent au Soi), auront été éliminés et ne pourront plus participer à la réaction immunitaire, ce qui explique qu'ils représentent moins de 1/1 000 000ème du

répertoire T. De façon intéressante, il semble que même les antigènes « cachés » dans le système nerveux central soient présentés au niveau du thymus (Wekerle *et al.*, 1996; Bruno *et al.*, 2002). Pourtant, ce mécanisme n'est pas parfait et certains lymphocytes T spécifiques d'antigènes de la myéline notamment, font partie du répertoire T de nombreux individus sains (Fazilleau *et al.*, 2006; Wekerle, 2006).

Ces lymphocytes T potentiellement auto-réactifs ayant échappé à la sélection négative seront alors soumis à des phénomènes de **tolérance périphérique**. Ainsi, si la plupart des cellules de l'organisme expriment les molécules du CMH cl.I et sont donc susceptibles d'interagir avec les lymphocytes T CD8⁺, une très faible proportion exprime en parallèle les molécules de costimulation nécessaires à l'activation effective de ces lymphocytes T, conduisant plutôt à leur anergie. Il en va de même pour les cellules de gliomes qui généralement n'expriment pas les costimulateurs activateurs de la famille B7.

D'autres acteurs contribuant à l'échappement des tumeurs sont les **lymphocytes T régulateurs** (pour revue, Beyer et Schultze, 2006). Ils ont été découverts suite à des expériences de thymectomie chez la souris qui, pratiquées avant le troisième jour de vie, entraînent des maladies auto-immunes sévères et spontanées (Bonomo *et al.*, 1995; Sakaguchi *et al.*, 1995). Des animaux dépourvus de thymus (souris « nude ») recevant une injection de lymphocytes T déplétés en cellules CD25⁺ développent le même phénotype que les animaux thymectomisés, alors que l'injection de la même population comprenant les cellules CD25⁺ se traduit par un phénotype normal (Sakaguchi *et al.*, 1995). Les lymphocytes T CD4⁺ CD25⁺ ont ainsi été nommés régulateurs pour leur capacité à contrôler l'activité des lymphocytes T auto-réactifs et donc à empêcher le développement de maladies auto-immunes. Longtemps caractérisés par leur expression constitutive de CD25 (chaîne du récepteur à l'IL-2), il s'est avéré que ce marqueur n'était pas parfait, les lymphocytes T effecteurs activés l'exprimant aussi. La mutation du gène *foxp3*, responsable du syndrome IPEX (« immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked syndrome »), se traduit par de multiples maladies inflammatoires ainsi que par l'absence de la population de lymphocytes T régulateurs. Les souris déficientes en Foxp3 générées par la suite ont permis de mettre en évidence l'importance de ce facteur de transcription dans le développement et la fonction des lymphocytes T régulateurs, puisque le simple fait de transférer ce gène dans des lymphocytes T effecteurs leur confère le phénotype suppresseur et leur permet d'inhiber la prolifération des autres lymphocytes (Fontenot *et al.*, 2003; Fontenot et Rudensky, 2005). Ainsi, le phénotype commun des lymphocytes T régulateurs naturels serait CD4⁺, CD25⁺, Foxp3⁺, CTLA-4⁺ et GITR⁺ (Sakaguchi, 2005). Comme pour tous les lymphocytes T, ils seraient activés par un

signal antigène spécifique. Une fois activés, ils deviendraient capables de supprimer l'activation et la prolifération des lymphocytes T adjacents de façon non antigène spécifique. Il a été montré *in vitro* que cette suppression était contact-dépendante, même si *in vivo* des cytokines telles que l'IL-10 et le TGF β pourraient avoir des fonctions importantes (von Boehmer, 2005). Les lymphocytes T régulateurs sont aussi capables de bloquer l'activité des lymphocytes T CD8⁺ en inhibant leur fonction cytotoxique par un mécanisme dépendant du TGF β (Mempel *et al.*, 2006). Les lymphocytes T régulateurs sont cependant hétérogènes et plusieurs familles ont été décrites (Maggi *et al.*, 2005; Beissert *et al.*, 2006) : aux lymphocytes T régulateurs « naturels » décrits ci-dessus se rajoutent les lymphocytes T régulateurs induits à partir des lymphocytes T CD4⁺ conventionnels : les lymphocytes Tr1 et Th3, majoritairement FoxP3⁻ et agissant exclusivement par l'intermédiaire des cytokines anti-inflammatoires IL-10 et TGF β qu'ils sécrètent respectivement et les lymphocytes T CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺, très semblables aux T régulateurs naturels mais dont le rôle et le mode d'action ne sont pas déterminés précisément à l'heure actuelle (Wang, 2006a). Un déficit dans le nombre où la fonction des lymphocytes T régulateurs est fréquemment associé au développement de maladies auto-immunes, notamment au cours de l'EAE (McGeachy *et al.*, 2005). Au contraire, leur action a tendance à favoriser la croissance des tumeurs en inhibant l'activation des lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺, des lymphocytes B, des cellules dendritiques, des cellules NK et NKT (Orentas *et al.*, 2006; Wang, 2006b) et de nombreuses études ont rapporté un nombre ou une proportion plus importante des cellules CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ dans divers modèles tumoraux, notamment les gliomes (Andaloussi et Lesniak, 2006; Fecci *et al.*, 2006).

Les **lymphocytes NKT** sont une population particulière reconnaissant un répertoire restreint de peptides dans le contexte des molécules du CMH cl.I non classiques CD1d. Ces cellules seraient impliquées dans l'échappement des tumeurs puisque l'implantation de cellules cancéreuses dans des animaux déficients en CD1d entraîne un rejet plus important de ces tumeurs par rapport aux animaux sauvages (Terabe *et al.*, 2006). Deux populations ont été décrites, la mieux caractérisée exprimant un TCR conservé V α 14-J α 18 (NKT de type I) et intervenant dans l'immunosurveillance et l'autre, V α 14-J α 18⁻ (NKT de type II) pouvant être impliquée dans l'immunoévasion des tumeurs. En effet, les travaux de Terabe et collaborateurs (2005) ont montré que quatre modèles de tumeurs implantées dans des souris CD1d^{-/-} étaient rejetées plus facilement que dans les animaux sauvages, ce qui n'était pas le cas dans des souris déficientes en J α 18. Les mécanismes permettant l'échappement des

tumeurs par ces cellules NKT ne sont pas encore élucidés, l'IL-13 et le TGF β pouvant être impliqués pour certaines tumeurs (Terabe *et al.*, 2000) et pas dans d'autres (Terabe *et al.*, 2006).

Les cellules myéloïdes suppressives expriment les marqueurs de surface CD11b et Gr1 ainsi que CD31, spécifique des cellules myéloïdes immatures (pour revue, Serafini *et al.*, 2006). En temps normal, elles sont principalement localisées dans la moelle osseuse et circulent très peu dans le reste de l'organisme. Ces cellules peuvent maturer en cellules dendritiques, macrophages ou granulocytes dans un contexte inflammatoire (Bronte *et al.*, 2000). Dans un environnement de type Th2, leur caractère suppresseur est au contraire accru. Les tumeurs secrètent de nombreux facteurs tels que IL-10, IL-6 ou VEGF favorisant l'acquisition du phénotype immunosuppresseur par ces cellules myéloïdes ainsi que du GM-CSF permettant leur recrutement (Bronte *et al.*, 1999). Les cellules myéloïdes immatures, retrouvées dans tous les cancers, inhibent les lymphocytes T CD8⁺ par contact direct, sans interagir avec les lymphocytes T CD4⁺ dans la mesure où elles n'expriment pas les molécules du CMH cl.II (Kusmartsev *et al.*, 2004). Leur mécanisme d'action passe entre autres par les réactifs oxygénés (Kusmartsev *et al.*, 2004) et une activité très importante de l'enzyme arginase, impliquée dans le métabolisme de l'azote (Rodriguez et Ochoa, 2006).

3.2. Mécanismes liés aux cellules tumorales

Les tumeurs participent aussi activement à l'absence de réponse immunitaire anti-tumorale (pour revue, Gomez et Kruse, 2006)(Figure 20), soit en se cachant du système immunitaire (stratégies d'évasion), soit en le combattant (stratégies d'attaque).

Une des **stratégies d'évasion** les plus utilisées par les tumeurs est leur faible expression des molécules du **CMH cl.I** ou des molécules altérées empêchant l'interaction avec le TCR (Zagzag *et al.*, 2005). Généralement, l'acquisition d'un tel phénotype est le résultat d'une pression exercée par le système immunitaire, qui éliminant au fur et à mesure les cellules tumorales qui présentent un antigène immunogène à leur surface, va sélectionner indirectement les variants échappant à son contrôle (phénomène d'« immuno-editing ») (Algarra *et al.*, 2004). Certains lymphocytes T cytotoxiques ont pourtant évolué pour éliminer spécialement les cellules déficientes dans la présentation antigénique dans le cas d'une altération du complexe TAP (van Hall *et al.*, 2006) mais l'absence complète des molécules du CMH cl.I (mutation de la β 2 microglobuline par exemple) rend impossible l'interaction avec

de tels lymphocytes. Dans ce dernier cas, les cellules tumorales devraient être sensibles à la lyse par les cellules NK.

Pour éviter cette lyse, les tumeurs peuvent utiliser une molécule du CMH non classique : **HLA-G**. Contrairement aux autres molécules du CMH cl.I, HLA-G n'est exprimée que par quelques tissus et ne peut présenter qu'un répertoire restreint de peptides (Diehl *et al.*, 1996). Son expression est augmentée sur de nombreuses tumeurs, dont les gliomes, et peut participer à leur immunoévasion. En effet, elle se lie au CD8 et bloque l'activation des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de tumeur, ainsi que leur phase effectrice en inhibant la phase lytique. HLA-G peut également se lier à un récepteur inhibiteur à la surface des cellules NK (Munz *et al.*, 1999) et protège ainsi les gliomes exprimant éventuellement un CMH cl.I muté de la lyse par ces effecteurs cytotoxiques (Wiendl *et al.*, 2002; Wiendl *et al.*, 2003).

HLA-E est une seconde molécule du CMH cl.I non classique exprimée par les gliomes. Elle se lie également à un récepteur des cellules NK (CD94/NKG2A) et bloque leur activité anti-tumorale (Wischhusen *et al.*, 2005).

D'autres stratégies d'évasion comprennent la forte expression de **ténascine** de certaines tumeurs (pour revue, Orend et Chiquet-Ehrismann, 2006). Cette protéine de la matrice extra-cellulaire, exprimée normalement de façon restreinte dans le cerveau en développement ou dans le cartilage est ré-exprimée dans certaines tumeurs, dont les gliomes (Ventimiglia *et al.*, 1992; Mahesparan *et al.*, 2003). La téna-scine et notamment l'isoforme soluble C, semble impliquée dans les processus de migration, adhérence, prolifération des cellules ainsi que dans l'angiogénèse (Deryugina et Bourdon, 1996; Enam *et al.*, 1998; Zagzag *et al.*, 2002; Ruiz *et al.*, 2004). Une forte expression de téna-scine dans une tumeur est donc plutôt associée à un mauvais pronostic (Yoshida *et al.*, 1994; Herold-Mende *et al.*, 2002).

Les galectines appartiennent à la famille des lectines, structures spécialisées dans la reconnaissance de motifs sucrés à la surface des cellules ou au sein de la matrice extracellulaire. Les galectines participent à de nombreuses fonctions cellulaires, telles que l'adhérence, la migration, la régulation du cycle cellulaire ou encore l'apoptose. Certaines tumeurs expriment de façon accrue des membres de cette famille de protéines, notamment les galectines 1 et 3 qui vont contribuer à la transformation maligne des cellules par l'activation de l'oncogène Ras (Yamaoka *et al.*, 2000) ainsi qu'à leur échappement en favorisant l'angiogénèse, leur résistance à l'apoptose, ou encore leur migration (pour revue, Liu et Rabinovich, 2005).

Enfin, un mécanisme d'échappement très important des tumeurs est leur **résistance à l'apoptose** induite par contact direct (Fas, TNF-R...) ou par les voies de la perforine et du granzyme utilisées par les cellules cytotoxiques (pour revue, Malaguarnera, 2004). Ainsi, de nombreuses tumeurs présentent une mutation ou un blocage des récepteurs induisant l'apoptose tels que Fas ou TRAIL (« TNF related apoptosis-inducing ligand ») ou encore surexpriment des compétiteurs pour les ligands de ces récepteurs comme le Fas soluble ou le DcR3 (« decoy receptor 3 ») (Roth *et al.*, 2001). Par ailleurs, des mutations sont souvent associées aux voies de transduction de ces récepteurs et touchent notamment les caspases (surtout la caspase 8 dans le cerveau), la molécule SADS (« small accelerator for death signaling ») ou encore la molécule Bax, pro-apoptotique (Yin *et al.*, 1997; Grotzer *et al.*, 2000). Les points de contrôles ultimes du cycle cellulaire, représentés par la protéine p53 et d'autres membres de la même famille comme p73, sont également très souvent mutés dans les tumeurs (plus de 50% des tumeurs ont une protéine p53 altérée) (Sigal et Rotter, 2000; Douc-Rasy *et al.*, 2002). En revanche, les cellules tumorales ont tendance à surexprimer des molécules anti-apoptotiques telles que Bcl-2, Flip ou les molécules de la famille des IAP (« inhibitor of apoptosis protein ») telles que la survivin (Adida *et al.*, 1998; Djerbi *et al.*, 1999).

Les tumeurs ont parallèlement développé de nombreuses **stratégies d'attaque** du système immunitaire (figure 20). Un des facteurs majeurs d'immunosuppression lié aux tumeurs est **le TGFβ**. Normalement présent dans le parenchyme nerveux, il va être sécrété en grande quantité par les gliomes et va donc bloquer l'activation des cellules présentatrices d'antigènes, des lymphocytes T, mais aussi la sécrétion de facteurs inflammatoires tels que l'IFNγ (Platten *et al.*, 2001; Thomas et Massague, 2005). Par ailleurs, comme l'IL-10, il peut contribuer à augmenter le pool de cellules suppressives en favorisant la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T régulateurs (Marie *et al.*, 2005).

Un mécanisme original de contre-attaque de différentes tumeurs est l'expression de l'indoleamine 2,3-dioxygénase (**IDO**). Cette enzyme intervient dans la dégradation de l'acide aminé tryptophane. De façon intéressante, les lymphocytes T sont très sensibles à l'absence de cet acide aminé essentiel, ce qui conduit à l'arrêt de leur prolifération. Ce mécanisme est notamment utilisé par les cellules placentaires pour éviter le rejet du fœtus. Les tumeurs IDO⁺ vont localement dépléter l'environnement en tryptophane, et présentent ainsi une proportion plus faible de lymphocytes T spécifiques d'antigènes tumoraux que les tumeurs IDO⁻ (Uyttenhove *et al.*, 2003).

De nombreuses tumeurs, incluant les gliomes, sécrètent également de la **PGE₂**, grâce à l'action de la COX-2 (cyclo-oxygénase 2)(Nathoo *et al.*, 2004). Cette enzyme fait partie du métabolisme de l'acide arachidonique et le convertit en prostaglandines et thromboxanes, substances médiatrices de l'inflammation. La PGE₂ a des actions anti-inflammatoires et favorise une réponse lymphocytaire T de type Th2, voire la différenciation de lymphocytes T régulateurs (Baratelli *et al.*, 2005; Sharma *et al.*, 2005). Par ailleurs, von Bergwelt-Baildon et collaborateurs (2006) ont mis en évidence que des cellules dendritiques maturées en présence de PGE₂ exprimaient l'IDO ainsi que du CD25 soluble, provoquant une inhibition de l'activation des lymphocytes T infiltrant les tumeurs.

L'expression des molécules **Fas/Fas ligand** (Fas-L) sur la tumeur bloque également l'activation du système immunitaire (Gratas *et al.*, 1997; Husain *et al.*, 1998; Frankel *et al.*, 1999a). L'interaction entre ces deux membres de la famille du TNF provoque une cascade de signalisation intracellulaire qui peut entraîner la mort par apoptose de la cellule exprimant Fas. Les cellules de gliomes exprimant Fas devraient donc être susceptibles à l'apoptose induite par Fas-L, ce qui a été montré dans certains cas (Frei *et al.*, 1998; Ambar *et al.*, 1999). Cependant, elles surexpriment en parallèle des facteurs de survie, tels que Bcl-2 (Frankel *et al.*, 1999b), les rendant résistantes aux signaux pro-apoptotiques (Riffkin *et al.*, 2001). Par ailleurs, elles se servent de cette voie de signalisation pour exprimer des cytokines pouvant aider à leur survie et à leur croissance comme l'IL-6 (Choi *et al.*, 2002). L'expression de Fas-L peut tourner de la même façon à leur avantage en éliminant au fur et à mesure les lymphocytes T infiltrants qui expriment Fas. Ainsi, le niveau d'expression de Fas-L dans les gliomes humains est inversement corrélé au nombre de lymphocytes T présents dans la tumeur (Ichinose *et al.*, 2001), et les lymphocytes T apoptotiques observés dans les tumeurs sont en contact avec les cellules Fas-L⁺ (Didenko *et al.*, 2002). Une autre équipe a montré que sans nécessairement induire d'apoptose, l'interaction entre la cellule tumorale Fas-L⁺ et le lymphocyte T Fas⁺ peut induire un changement de phénotype de celui-ci conduisant à une sécrétion accrue d'IL-10 (Yang *et al.*, 2003) favorisant une réponse type Th2 et une inhibition de fonction des cellules présentatrices d'antigènes locales.

Suivant le même principe, l'expression de **CD70** peut conduire à l'apoptose des cellules T, B ou NK infiltrant la tumeur (Chahlavi *et al.*, 2005).

Dans un tissu sain, les cellules mourant par apoptose vont exprimer à leur surface la **phosphatidylsérine**, normalement séquestrée du côté intracellulaire de la bicouche lipidique, qui va se lier au récepteur de la phosphatidylsérine sur les phagocytes. Cette liaison provoque l'internalisation de la cellule morte par le phagocyte et lui fait adopter un phénotype

immunomodulateur caractérisé par la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires telles qu'IL-10 ou TGF β . Certaines tumeurs expriment à leur surface la phosphatidylsérine, sans pour autant être en apoptose, ce qui confère un caractère immunosuppresseur aux macrophages infiltrants.

Enfin, les cellules tumorales expriment souvent un membre de la famille B7 : **PD-L1** (B7-H1) (Blank *et al.*, 2005), qui contrairement à ses homologues CD80 (B7-1) et CD86 (B7-2), est un puissant inhibiteur de l'activation lymphocytaire T (Zha *et al.*, 2004). De plus, même si les lymphocytes T ont été activés efficacement en dehors de la tumeur, l'IFN γ qu'ils vont sécréter sur place peut augmenter l'expression de B7-H1 sur les cellules tumorales, renforçant alors la paralysie du système immunitaire face à un gliome (Wintterle *et al.*, 2003; Wilmotte *et al.*, 2005).

3.3. Détournement des fonctions microgliales

De manière générale, les gliomes sont caractérisés par une faible infiltration par les cellules immunitaires à l'exception notable des cellules microgliales qui représentent jusqu'à 5 à 20% des cellules dans la masse tumorale. La raison de cette infiltration massive n'est pas encore comprise : engagement de la réponse anti-tumorale ou détournement des fonctions microgliales par le gliome à son avantage ? La réponse à cette question n'est pas claire et des arguments existent en faveur des deux possibilités (Badie et Schartner, 2001).

En effet, les cellules microgliales infiltrant les tumeurs ont un phénotype activé. Elles ont conservé leurs fonctions innées et sont ainsi toujours capables de phagocytose, suggérant qu'elles puissent capturer et préparer l'antigène pour le présenter aux lymphocytes T (Hussain *et al.*, 2006b). Allant dans ce sens, elles peuvent exprimer les molécules du CMH cl.II ainsi que CD86 et éventuellement CD80 selon l'agressivité de la tumeur (Badie *et al.*, 2002). Les cellules microgliales expriment également fortement la molécule Fas-L et sont donc susceptibles de favoriser l'apoptose des cellules tumorales Fas⁺.

Cependant, les gliomes ont réussi à détourner ces fonctions des cellules microgliales contre le système immunitaire périphérique et en particulier les lymphocytes T. Ainsi, une forte infiltration microgliale est plutôt associée à un mauvais pronostic et les gliomes ont tendance à attirer de façon active ces cellules en sécrétant des facteurs chimioattractants comme le MCP-1 (« Monocyte Chemoattractant Protein-1 ») ou le bHGF (« hepatocyte growth factor ») (Badie et Schartner, 2001; Platten *et al.*, 2003). En retour, la microglie

faciliterait la migration des gliomes et donc augmenterait leur caractère invasif : en utilisant un modèle de gliome murin, Bettinger et collaborateurs en 2002, ont mis en évidence *in vitro* la migration des cellules GL261 en réponse au surnageant de culture de cellules microgliales, migration encore plus importante si les cellules microgliales étaient au préalable activées. Dans le même sens, les travaux de Platten et collaborateurs (2003) ont montré que des tumeurs transfectées avec le MCP-1 recrutait considérablement plus de cellules microgliales, mais étaient nettement plus agressives et entraînaient une mort plus rapide des animaux, par rapport aux tumeurs non modifiées. Il semble donc que la microglie infiltrant les tumeurs n'arrive pas à déclencher une réponse immunitaire efficace. Ceci peut s'expliquer en partie par l'altération de leurs fonctions de cellules présentatrices d'antigènes. En effet, plus la tumeur est agressive, plus l'expression des molécules du CMH cl.II, CD80 et CD86 diminue sur la microglie (Badie *et al.*, 2002; Schartner *et al.*, 2005). L'inhibition imposée par la tumeur est suffisamment importante pour diminuer l'augmentation de CMH cl.II normalement induite à la surface de la microglie par des signaux pro-inflammatoires tels qu' $\text{IFN}\gamma$, oligodéoxynucléotides CpG, ou LPS (Schartner *et al.*, 2005). Cet effet est bien dû à la tumeur puisque des cellules microgliales activées par l' $\text{IFN}\gamma$ puis cultivées en présence de surnageant de cellules de gliome ont une expression réduite de CMH cl.II (Taniguchi *et al.*, 2000). Par ailleurs, *ex vivo* et libérées de l'environnement tumoral, elles récupèrent au moins en partie leurs facultés (Hussain *et al.*, 2006b). Dans ces conditions, la présentation des antigènes tumoraux risque d'aboutir à l'anergie des lymphocytes T.

La microglie va également favoriser la tumeur en sécrétant certains facteurs solubles comme le $\text{TNF}\alpha$, l'IL-10 ou encore l'IL-1 β . Le $\text{TNF}\alpha$, comme discuté précédemment peut avoir des fonctions bénéfiques ou néfastes dans le système nerveux central. Secrété dans le cadre d'un gliome, le $\text{TNF}\alpha$ va favoriser la prolifération de celui-ci en augmentant l'expression du récepteur à l'EGF, son alimentation sanguine en augmentant la sécrétion de VEGF et sa migration grâce à la protéase de la matrice extracellulaire MMP-9 (Ryuto *et al.*, 1996; Esteve *et al.*, 2002). De façon similaire, l'IL-1 pourtant à la tête de nombreuses réactions inflammatoires, favorise le caractère invasif des gliomes ainsi que son approvisionnement en nutriments en augmentant l'angiogenèse (Esteve *et al.*, 1998; Esteve *et al.*, 2002; Voronov *et al.*, 2003). L'IL-10 est le prototype des cytokines anti-inflammatoires. Elle est retrouvée en grande quantité dans les gliomes et semble corrélée avec le grade de la maladie (Huettner *et al.*, 1997). Bien que son rôle ne soit pas clair dans toutes les tumeurs (Huang *et al.*, 1996), l'IL-10 semble favoriser la prolifération et la migration des cellules de

gliome (Huettnner *et al.*, 1997), mais sans modifier la sécrétion des MMP (Wagner *et al.*, 1998). Bien que longtemps considérée comme un facteur immunosuppresseur de plus sécrété par la tumeur, il semblerait en fait que les cellules microgliales et/ou les macrophages infiltrants en soient la source principale (Wagner *et al.*, 1999). En plus de son action sur la tumeur, l'IL-10 inhibe les fonctions de présentation antigénique des cellules dendritiques, macrophages et cellules microgliales (Wei et Jonakait, 1999; McBride *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 2004). Elle peut également renforcer l'action des lymphocytes T régulateurs qui sont une source supplémentaire de ce facteur (Nicolson *et al.*, 2006; Larmonier *et al.*, 2007). Enfin, bien que la plupart des gliomes expriment Fas-L, jusqu'à 50% de l'ensemble des molécules Fas-L exprimées dans la tumeur peuvent être attribuées à la microglie (Badie *et al.*, 2001), qui contribue ainsi largement par cette voie à tuer les lymphocytes infiltrant la tumeur.

4. TRAITEMENT DES TUMEURS CEREBRALES

4.1. Traitements conventionnels

Comme les autres tumeurs, les gliomes bénéficient des traitements « conventionnels » : chirurgie, radiothérapie, chimiothérapie. Malgré tous les progrès réalisés dans ces domaines, généralement, ils n'ont qu'une efficacité limitée dans le cas de tumeurs agressives comme les glioblastomes.

L'utilisation de **la chirurgie** dépend surtout de la localisation de la tumeur. En effet, l'ablation d'une tumeur située dans une zone fonctionnellement muette ne pose normalement pas de problèmes alors qu'elle peut entraîner des troubles neurologiques importants dans d'autres régions. Les cellules tumorales sont difficiles à différencier par rapport aux cellules saines, ce qui rend compliquée l'appréciation de la zone à enlever et l'importance fonctionnelle du tissu cérébral exclut une résection étendue. Par ailleurs, les gliomes sont caractérisés par leur haute capacité à infiltrer le tissu sain, ce qui rend quasiment impossible l'élimination complète de la masse tumorale et aboutit presque invariablement à une récurrence évoluant généralement vers les grades élevés.

La radiothérapie reste un traitement de choix dans les gliomes mais là encore n'apporte qu'une modeste augmentation du temps de survie. Le problème majeur de l'application de rayons est la toxicité associée à cette thérapie. Initialement dirigée sur l'ensemble du crâne, la radiothérapie peut aujourd'hui être ciblée sur la zone tumorale.

Cependant, les effets secondaires pour les patients survivants à long terme restent très importants et peuvent devenir invalidants (jusqu'à une démence), ce qui explique que généralement, la radiothérapie ne soit pas indiquée dans les tumeurs de bas grade.

La chimiothérapie semble le traitement le plus efficace. Cependant, un obstacle majeur à cette stratégie est la barrière hémato-encéphalique, qui empêche le passage de la plupart des molécules actives. De ce fait, il faut soit utiliser un agent perméabilisant en plus de l'agent actif, soit utiliser un agent chimiothérapeutique petit et lipophile. Une autre approche prometteuse consiste à vectoriser l'agent thérapeutique et à le déposer par stéréotaxie ou au cours de l'acte chirurgical directement dans le lit tumoral. Les avantages d'une telle approche sont d'une part une libération progressive de l'agent et d'autre part une action plus localisée dans la mesure où la barrière hémato-encéphalique empêche la diffusion systémique des molécules hydrophiles et réduit donc leurs potentiels effets toxiques (Fournier *et al.*, 2003; Garcion *et al.*, 2006), même s'il reste encore à trouver la meilleure formulation possible pour les vecteurs et s'assurer de leur biocompatibilité à long terme (Fournier *et al.*, 2006). Par ailleurs, les cellules cancéreuses cérébrales sont particulièrement résistantes à la chimiothérapie, à l'exception près de certains oligodendrogliomes présentant une mutation particulière. Un autre problème plus grave vient d'être mis en évidence dans plusieurs publications récentes ou à paraître montrant des résultats qui remettent en cause la théorie de longue date selon laquelle les drogues chimiothérapeutiques ciblent uniquement les cellules en division rapide et épargnent les cellules quiescentes et matures. En effet, dans un système de culture cellulaire, Dietrich et collaborateurs (2006) mettent en évidence que les doses de chimiothérapie nécessaires pour tuer les cellules cancéreuses endommagent de la même manière les neurones sains. Chez la souris traitée par chimiothérapie à des doses comparables à celles utilisées chez l'homme, le nombre de cellules nerveuses diminue jusqu'à plusieurs semaines après l'arrêt du traitement, les neurones de l'hippocampe et les oligodendrocytes étant les plus touchés. Ces expériences vont dans le sens d'études sur des patients traités pour des tumeurs du sein notamment qui rapportent que de nombreux patients souffrent de déficits cognitifs (pertes de mémoire, confusion, difficultés de concentration) à la suite de leur chimiothérapie et que certaines de leurs régions cérébrales sont altérées (Silverman *et al.*, à paraître ; Reddick *et al.*, 2006; Inagaki *et al.*, 2007).

Etant donné tous ces résultats, le développement de traitements hautement spécifiques tels que l'immunothérapie semble une alternative prometteuse.

4.2. Le potentiel de l'immunothérapie

L'immunothérapie est donc une perspective intéressante en tant que traitement alternatif ou comme adjuvant aux traitements conventionnels. Son avantage par rapport aux traitements conventionnels est la très grande spécificité de cette stratégie qui permet de cibler les cellules tumorales en épargnant le tissu sain. Pour parvenir à ce résultat, plusieurs voies sont envisageables : immunothérapie passive, active spécifique d'antigènes ou active non spécifique d'antigènes (appelée aussi immunothérapie « correctrice ») (pour revue, Gomez et Kruse, 2006).

L'immunothérapie passive consiste à injecter à l'individu malade des effecteurs du système immunitaire tels que des anticorps ou des lymphocytes T cytotoxiques activés, cette dernière stratégie étant également appelée immunothérapie adoptive. L'utilisation d'**anticorps** a déjà montré des résultats intéressants pour le traitement de certaines tumeurs telles que les tumeurs du sein surexprimant l'antigène Her-2 traitées par un anticorps anti-Her-2 (« trastuzumab ») ou certains lymphomes B CD20⁺ traités par le « rituximab ». La production d'anticorps monoclonaux est bien maîtrisée chez la souris, le souci étant de les modifier afin que le système immunitaire humain les tolère (anticorps humanisés, ne comprenant plus que les régions hypervariables d'origine murine). Malgré ces résultats très prometteurs, des antigènes spécifiques à chaque type tumoral, notamment en ce qui concerne les tumeurs cérébrales, n'ont pas été décrits. Par ailleurs, l'immunothérapie par les anticorps ne permet pas de générer de mémoire immunitaire.

Un autre moyen consiste à récupérer les **lymphocytes** infiltrant la tumeur du patient, de les activer, de les expandre *ex vivo* en utilisant en particulier de l'IL-2 et de les ré-injecter au patient. L'ensemble des cellules infiltrantes, les lymphocytes T ou les lymphocytes NK peuvent ainsi être transformés *in vitro* en « lymphokine activated killer cells » (LAK, cellules tueuses activées par des lymphokines). Ces diverses stratégies ont été utilisées sur des cas de gliomes récurrents avec un taux de succès variable mais encourageant (Kruse *et al.*, 1997; Quattrocchi *et al.*, 1999; Ishikawa *et al.*, 2004). Il est également possible de sélectionner exclusivement les lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de la tumeur en les cultivant en présence de cellules tumorales irradiées, ce qui augmente la spécificité du traitement (Tsuboi *et al.*, 2003). Cette stratégie semble surtout adaptée à l'élimination de cellules tumorales

résiduelles suite à l'exérèse de la masse tumorale afin que les lymphocytes T ne subissent pas l'immunosuppression propre aux tumeurs.

L'immunothérapie active, nettement plus intéressante, permet en réactivant le système immunitaire contre la tumeur *in vivo*, d'induire un effet mémoire, évitant ainsi les récurrences. Cette activation peut se faire contre un antigène ou un ensemble d'antigènes particulier(s) (immunothérapie active spécifique d'antigène ou vaccination), ou en stimulant de façon non spécifique l'immunité anti-tumorale (immunothérapie active non spécifique d'antigènes).

La vaccination anti-tumorale actuelle utilise les capacités exceptionnelles des **cellules dendritiques** à activer les lymphocytes T CD4⁺ (présentation classique dans le CMH cl.II) ou CD8⁺ (présentation croisée dans le CMH cl.I) spécifiques d'un antigène tumoral. Il est ainsi possible de purifier les cellules dendritiques (chez l'animal le plus souvent) ou de les générer à partir des monocytes ou des progéniteurs de la moelle osseuse puis de les charger avec l'antigène voulu sous forme peptidique, de protéine soluble ou d'ARN tumoral (Mocellin *et al.*, 2004). Si certaines tumeurs expriment un antigène tumoral bien caractérisé (comme les mélanomes MelanA-MART1⁺ ou les cancers du sein Her-2⁺), le choix pour les tumeurs cérébrales est réduit à l'heure actuelle même si de plus en plus de cibles potentielles sont décrites, comme SOX11 (Schmitz *et al.*, 2007), EphA2 (Hatano *et al.*, 2005), EGFRvIII (Wu *et al.*, 2006), TRP-2 (Liu *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2005), HER-2 et gp100 (Liu *et al.*, 2004) ou la famille MAGE (Sasaki *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2004). L'inconvénient de cette approche est de se limiter à un seul antigène dont l'expression pourra diminuer ou disparaître au cours de l'évolution de la tumeur.

Une méthode moins restrictive consiste alors à incuber les cellules dendritiques avec un lysat tumoral, susceptible d'offrir l'ensemble des antigènes potentiellement exprimés par la tumeur. Cette alternative semble prometteuse aussi bien chez l'animal (Pellegatta *et al.*, 2006) que chez l'homme (résultats de phase I/II : Yu *et al.*, 2004; Yamanaka *et al.*, 2005). Malheureusement, les cellules de gliomes ne sont pas toujours accessibles, sont difficiles à cultiver ce qui limite la quantité de matériel disponible pour le chargement des cellules dendritiques, et peuvent dériver en culture du fait de leur grande hétérogénéité (Imai *et al.*, 1993).

Une autre alternative originale évite le problème du chargement de l'antigène en fusionnant directement les cellules dendritiques avec les cellules tumorales. Les hybrides ainsi générés présentent constitutivement les antigènes tumoraux devenus endogènes dans les

molécules du CMH cl.I. Cette idée a été mise en œuvre notamment par Kikuchi et collaborateurs (2001), lors d'une phase I sur huit patients atteints de gliome, qui ont montré l'absence d'effets toxiques ou secondaires majeurs d'une telle stratégie, mais sans pouvoir conclure quant à la réelle efficacité du traitement. Cette stratégie vaccinale bien qu'induisant de fortes réponses immunitaires dans les modèles pré-cliniques, peut néanmoins conduire à la sélection de variants de cellules tumorales n'exprimant plus l'antigène cible. De plus, un protocole laborieux et onéreux doit être mis en place pour chaque patient.

La dernière difficulté concerne le choix de la sous-population à utiliser : très hétérogènes, elles n'ont pas toutes la même capacité à générer une réponse anti-tumorale. Par ailleurs, les différentes équipes dérivant des cellules dendritiques à partir des monocytes des patients n'utilisent pas forcément le même environnement cytokinique, rendant difficile la comparaison des résultats obtenus. Le cas du cerveau est d'autant plus compliqué que le phénotype des cellules dendritiques s'y rendant ou s'y développant n'est pas connu et que les chemins d'accès au parenchyme nerveux ne sont pas forcément aussi évidents que pour d'autres organes, ce qui demande encore un choix supplémentaire sur la meilleure voie d'administration possible pour être sûr d'atteindre la cible voulue. Pourtant, comme l'ont montré Calzascia et collaborateurs (2005), il est important d'utiliser des cellules provenant du cerveau pour activer les lymphocytes T cytotoxiques anti-tumoraux afin qu'ils retournent sur place lyser la tumeur. Par ailleurs, l'un des plus gros problèmes concernant le système nerveux central est d'être sûr que les cellules vaccinales ne seront pas inactivées sitôt qu'elles pénétreront dans le parenchyme constitutivement immunodéprimé de ce site.

Ainsi, la dernière grande stratégie **d'immunothérapie, active mais non spécifique d'antigènes**, a pour but de restimuler de façon globale le système immunitaire, en créant un environnement le plus propice possible au chargement *in vivo* des antigènes par les cellules présentatrices d'antigènes, afin que celui-ci soit réalisé de façon physiologique et non imposé par l'expérimentateur. Un moyen très efficace d'activer la réponse immunitaire est ainsi de mimer une infection virale ou bactérienne.

Dans ce sens l'utilisation des agonistes des TLR semble particulièrement appropriée. Exprimés pour la plupart sur les cellules myéloïdes, certains TLR sont aussi présents sur les lymphocytes activés (Caron *et al.*, 2005), les neurones (Prehaud *et al.*, 2005) et les astrocytes (Carpentier *et al.*, 2004; Jack *et al.*, 2005) et permettent d'envisager une utilisation même au sein du système nerveux central. Les oligodéoxynucléotides non méthylés CpG ont un intérêt particulier par leurs multiples effets sur les différents acteurs de la réponse immunitaire. Ils

favorisent de manière générale une réponse Th1 en activant les cellules dendritiques (Hoshino *et al.*, 2002; Boonstra *et al.*, 2003) et en augmentant leur capacité à « cross-présenter » les antigènes (Datta *et al.*, 2003; van Mierlo *et al.*, 2004; Datta et Raz, 2005; Kuchtey *et al.*, 2005). Ils permettent d'activer les cellules microgliales (Olson et Miller, 2004; Ebert *et al.*, 2005) et favorisent leur phénotype pro-inflammatoire (sécrétion de TNF α , IL-12 ou NO) ainsi que leur capacité à présenter les antigènes (Dalpke *et al.*, 2002). Ils peuvent aussi activer les lymphocytes B et induire leur différenciation en plasmocytes (Heit *et al.*, 2004), les lymphocytes T $\gamma\delta$ (Rothenfusser *et al.*, 2001), les lymphocytes T conventionnels de manière indirecte (Kranzer *et al.*, 2000), les lymphocytes NKT (Montoya *et al.*, 2006; Tsujimoto *et al.*, 2006) ou encore les cellules NK (Sivori *et al.*, 2006). Par leur large spectre d'action, les oligonucléotides CpG ont donc été utilisés avec succès dans différents protocoles d'immunothérapie dans des modèles de tumeurs murines (incluant des gliomes) en tant que traitement (Carpentier *et al.*, 2000; Lonsdorf *et al.*, 2003; Kunikata *et al.*, 2004) ou adjuvant (Heckelsmiller *et al.*, 2002; Weigel *et al.*, 2003; Meng *et al.*, 2005; Brown *et al.*, 2006; Buhtoiarov *et al.*, 2006). Ces molécules prometteuses sont également entrées en tests cliniques de phase I chez des patients atteints de glioblastomes récurrents (Carpentier *et al.*, 2006).

Afin de réactiver le système immunitaire, il est aussi possible de lever les différents points d'immunosuppression ou de tolérance existant localement. Dans ce sens, l'inhibition de l'effet du TGF β peut s'avérer très intéressante dans le cerveau à la fois pour ré-activer les cellules localement (le TGF β inhibe l'activation microgliale, Kim *et al.*, 2004) et pour contrebalancer la production de cellules suppressives (Zhang *et al.*, 2006). Un mécanisme de tolérance commun à la plupart des tumeurs est la présence de lymphocytes T régulateurs (cf. § II.3.1). La déplétion de ces cellules face à des modèles de sarcomes, des leucémies, des myélomes ou des mélanomes notamment, en tant que seul traitement ou en tant qu'adjuvant, est capable de ralentir, voire d'inhiber complètement la croissance tumorale en fonction de l'agressivité de la tumeur (Onizuka *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 2002; Nagai *et al.*, 2004; Knutson *et al.*, 2006). Une alternative complémentaire pour inactiver ces cellules est de bloquer la voie CTLA-4, capable d'agir en synergie avec les anticorps anti-CD25, comme l'ont montré Suttmuller et collaborateurs (2001).

Il semble ainsi de plus en plus évident que pour arriver à trouver un traitement efficace, il faudra combiner plusieurs approches afin de stimuler les différents bras effecteurs

du système immunitaire et de lever au moins partiellement l'immunosuppression liée aux tumeurs. Une limite à l'immunothérapie sera toutefois de ne pas basculer dans l'excès inverse en générant une réponse auto-immune qui, si elle peut être acceptable dans certaines localisations, peut s'avérer néfaste dans le système nerveux central.

Les illustrations de cette partie sont consultables dans la partie Annexe de TEL, dans le fichier Figures Intro.ppt

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

La survie de patients atteints de tumeurs cérébrales reste toujours de pronostic extrêmement défavorable malgré les efforts incessants dans le domaine chirurgical, la radiothérapie ou la chimiothérapie. De nouvelles approches thérapeutiques, comme l'immunothérapie, sont donc envisagées afin de prolonger cette survie. L'immunothérapie active notamment, a pour but d'induire des réponses immunes à long terme sans affecter le tissu normal environnant et permet de prévenir la réapparition de la tumeur. Cependant, développer des stratégies d'immunothérapie contre les tumeurs cérébrales nécessite avant tout de mieux comprendre le microenvironnement particulier de cet organe. En effet, le système nerveux central a évolué pour se protéger des assauts du système immunitaire : isolement physique par la barrière hémato-encéphalique, peu d'expression des molécules du CMH, drainage antigénique non conventionnel et immunosuppression constitutive. Pourtant, les lymphocytes T mémoires patrouillent en permanence dans le cerveau et des réponses immunitaires efficaces peuvent aussi s'y déclencher (Walker *et al.*, 2003). Loin d'être immunologiquement muet, le SNC possède même son propre réseau de cellules immunocompétentes spécialisées : les cellules microgliales. D'origine myéloïde, ces cellules présentent un haut degré de plasticité morphologique et fonctionnelle et sont aussi bien capables de protéger la population neuronale à l'état quiescent que de participer après activation à des réponses inflammatoires en présentant les antigènes aux lymphocytes T ou en sécrétant des cytokines pro- ou anti-inflammatoires (Aloisi, 2001; Hanisch, 2002; Streit, 2002; Streit *et al.*, 2005).

Les cellules microgliales jouent certainement un rôle primordial dans le devenir des tumeurs cérébrales et représentent jusqu'à 30% des cellules infiltrantes. Or, lors de ces processus tumoraux, la barrière hémato-encéphalique peut être lésée et laisse pénétrer notamment des monocytes/macrophages périphériques, susceptibles de jouer un rôle, peut être différent, dans la défense anti-tumorale au sein du système nerveux central. Cependant, un problème récurrent en neuro-immunologie est de pouvoir discriminer chez la souris les cellules microgliales activées des macrophages infiltrants, préalable pourtant nécessaire pour mieux comprendre le comportement des principaux acteurs de la réponse immune lors de ces processus tumoraux (ainsi qu'au cours d'autres pathologies nerveuses)(Guillemin et Brew, 2004). Des travaux précédents du laboratoire avaient permis d'isoler les ARNm différenciellement exprimés par deux clones de cellules microgliales activées par l'IFN γ (Mahe *et al.*, 2001). Aussi, **le premier objectif** de ce travail de thèse a été de déterminer si parmi les 16 messagers constituant la banque soustractive, certains d'entre eux pouvaient

permettre au moins dans certaines conditions de distinguer cellules microgliales et macrophages périphériques.

Au début du développement tumoral, du fait de la barrière hémato-encéphalique et en l'absence de cellules dendritiques, les cellules microgliales sont les premières à être confrontées aux cellules cancéreuses et sont donc en position idéale pour déclencher une réponse anti-tumorale efficace. Dans le reste de l'organisme, les cellules dendritiques assurent cette fonction. Ce sont les cellules présentatrices d'antigènes les plus performantes de l'organisme (Banchereau et Steinman, 1998) car elles migrent vers les ganglions lymphatiques, présentent efficacement les antigènes lorsqu'elles sont matures et sont également capables d'effectuer la présentation croisée, ce qui les rend particulièrement intéressantes dans le cadre d'une immunothérapie anti-tumorale (Amigorena, 1999). De façon intéressante, en présence de GM-CSF, les cellules microgliales se différencient en cellule type dendritique, expriment le marqueur CD11c et présentent une morphologie typiquement dendritique (Fischer et Reichmann, 2001; Santambrogio *et al.*, 2001). Elles sont aussi des cellules présentatrices d'antigènes efficaces à condition d'être activées de manière optimale (Matyszak *et al.*, 1999; Ponomarev *et al.*, 2006) et le GM-CSF permettant leur différenciation en cellule dendritique favorise leur potentiel de cellule présentatrice d'antigènes (Fischer *et al.*, 1993; Aloisi *et al.*, 2000). Par ailleurs, une étude récente montrant qu'elles expriment CCR7, suggère qu'elles pourraient éventuellement migrer vers les organes lymphoïdes secondaires dans certaines conditions (Dijkstra *et al.*, 2006). La microglie ayant ainsi plusieurs caractéristiques communes avec les cellules dendritiques, **le second objectif** de ce travail de thèse a consisté à étudier si la microglie était aussi capable de présentation croisée.

Dans le but de pouvoir à terme mettre en application nos résultats *in vivo*, nous avons en parallèle développé deux modèles de tumeur intracérébrale chez la souris. Dans la mesure où il n'existe pas beaucoup d'outils pour analyser la réponse immunitaire face à un gliome, notre choix s'est porté sur deux lignées murines non gliales : la B16-F10_{gp33-41}, très agressive, peu immunogène, provenant d'un mélanome transfecté par le peptide 33-41 de la glycoprotéine du virus de la chorioméningite lymphocytaire murine (LCMV) et la lignée EG.7, plus immunogène, provenant d'un thymome (lignée EL4) transfecté par l'ovalbumine. Les tumeurs ont tendance à créer autour d'elles un environnement immunosuppresseur de manière à tenir sous contrôle à la fois les cellules présentatrices d'antigènes ainsi que les lymphocytes T. Ainsi, toute stratégie d'immunothérapie dans le système nerveux central doit non seulement surpasser la tolérance immune induite par la tumeur, mais aussi l'immunosuppression liée au cerveau lui-même (Gomez et Kruse, 2006). L'un des

mécanismes majeur de suppression dans les tumeurs est la présence de lymphocytes T régulateurs (Wang, 2006b), or au commencement de ce travail, l'influence de la déplétion des lymphocytes T régulateurs sur le développement de tumeurs intracérébrales n'était pas connue. De plus, l'un des meilleurs moyens pour activer le système immunitaire est de mimer une infection en engageant les récepteurs de la famille Toll. Parmi les divers agonistes TLR, les oligodéoxynucléotides non méthylés CpG semblent particulièrement prometteurs dans le cadre d'une immunothérapie anti-tumorale, dans la mesure où ils entraînent l'activation de la plupart des cellules immunitaires directement ou indirectement (Carpentier *et al.*, 2003). Dans le système nerveux central, les cellules microgliales expriment le TLR9 et les CpG-ODN favorisent leur sécrétion de cytokines pro-inflammatoires ainsi que leur fonction de cellule présentatrice d'antigènes (Dalpke *et al.*, 2002). Le **troisième objectif** de ce travail de thèse a donc été d'évaluer un protocole combinant déplétion des lymphocytes T régulateurs et injection de CpG-ODN sur les deux modèles de tumeurs intra-cérébrales en place au laboratoire.

L'état d'activation des cellules présentatrices d'antigènes détermine le succès d'une réponse immunitaire. Il est donc particulièrement intéressant de mieux connaître les mécanismes régissant cette activation. Parmi les messagers isolés dans la banque soustractive, l'« immune responsive gene 1 » présentait un profil d'expression particulier étant nettement plus exprimé ou fortement induit dans les divers clones microgliaux après activation par l'IFN γ (Mahe *et al.*, 2001). Cette induction était rapide, ce qui confirmait les seules données bibliographiques disponibles à ce moment précis sur cette molécule, montrant une induction en moins d'une heure de l'IRG-1 dans des macrophages stimulés par du LPS (Lee *et al.*, 1995). Induite dans les macrophages et les cellules microgliales, par l'IFN γ ou le LPS, l'IRG-1 représentait donc une molécule potentiellement impliquée dans l'activation des cellules présentatrices d'antigènes et située au carrefour de l'immunité innée et adaptative. L'identification et le clonage de son homologue humain ainsi qu'une meilleure caractérisation de l'IRG-1 murin et humain a donc représenté le **dernier objectif** de ce travail.

TRAVAIL DE THESE

PREMIERE PUBLICATION

Identification of new CNS-resident macrophage subpopulation molecular markers for the discrimination with murine systemic macrophages.

Sabrina Donnou*, Sylvain Fisson*, Dominique Mahé, Alicia Montoni and Dominique Couez.

(* 1^{ers} auteurs équivalents)

Journal of neuroimmunology, 2005, 169 : 39-49.

Dans un système nerveux central sain, les cellules microgliales, d'origine myéloïde, sont les principales cellules immunocompétentes résidentes (Aloisi, 2001). Elles expriment constitutivement les molécules CD11b, un faible niveau de CD45 et pas ou très peu de molécules du CMH cl. I ou II ainsi que de costimulateurs de la famille B7 (Ford *et al.*, 1995). Sous cette forme, elles assurent l'immunosurveillance du parenchyme nerveux grâce à leurs nombreux prolongements cytoplasmiques (Nimmerjahn *et al.*, 2005). A la moindre perturbation de son microenvironnement, la microglie s'active, migre sur le site lésionnel, prolifère et exprime plus fortement les molécules du CMH ainsi que les molécules CD80 et CD86, ce qui lui permet de présenter efficacement les antigènes aux éventuels lymphocytes T infiltrants (Mack *et al.*, 2003; Rock *et al.*, 2004). Cette activation s'accompagne également de changements morphologiques avec une perte progressive de leurs prolongements et l'acquisition d'une morphologie amiboïde (Gehrmann *et al.*, 1995).

En cas de neurodégénérescence, les monocytes vont infiltrer le parenchyme nerveux, se différencier en macrophages et sont alors totalement indiscernables morphologiquement et phénotypiquement des cellules microgliales activées, ce qui rend la compréhension de leurs fonctions respectives difficile (Guillemin et Brew, 2004). Aucun marqueur spécifique de la microglie murine adulte n'existe jusqu'à présent. Enose et collaborateurs (2005) ont récemment publié une analyse protéomique comparative entre différentes populations macrophagiques, incluant la microglie néonatale. Ils n'ont cependant pas trouvé de profil distinct pour la microglie à l'exception de leur faible expression de superoxyde dismutase comparé aux autres macrophages sans malheureusement le confirmer en conditions inflammatoires. D'autres études ont donné des informations quant au transcriptome de la microglie activée par rapport à la quiescente mais sans réellement s'intéresser aux molécules discriminantes (Paglinawan *et al.*, 2003; Moran *et al.*, 2004; Gebicke-Haerter, 2005).

Ainsi, le seul moyen consiste à l'heure actuelle à générer des souris chimères en reconstituant la moelle osseuse d'un animal irradié avec la moelle osseuse d'un second animal exprimant un marqueur particulier. Cette technique permet alors de discerner *in situ* les macrophages périphériques exprimant le marqueur, des cellules microgliales ne l'exprimant pas (Schilling *et al.*, 2003; Schilling *et al.*, 2005).

Au laboratoire, une banque soustractive entre deux clones de cellules microgliales présentant des différences morphologiques et fonctionnelles importantes avait permis d'isoler 16 ADNc dont la plupart n'avaient jamais été décrits auparavant dans la microglie (Mahe *et al.*, 2001). Parmi ces messagers, certains permettaient de mettre en évidence l'état

d'activation de la microglie ou encore de distinguer éventuellement plusieurs sous-populations. Dans ce travail, nous avons cherché à déterminer si un ou plusieurs ADNc de la banque pouvaient discriminer les cellules microgliales des macrophages périphériques (monocytes, macrophages spléniques, péritonéaux).

Il n'existe à l'heure actuelle aucun moyen de distinguer les cellules microgliales activées des macrophages infiltrant le parenchyme nerveux en cas d'inflammation chez la souris (Guillemin et Brew, 2004). En utilisant une banque soustractive générée au laboratoire à partir de deux clones microgliaux activés (Mahe *et al.*, 2001), nous avons mis en évidence que trois des seize messagers n'étaient pas exprimés par les macrophages péritonéaux ou spléniques. L'absence d'expression dans les monocytes montre par ailleurs que les trois messagers sont discriminants dès l'infiltration de ces cellules dans le parenchyme.

Le premier ADNc, présent dans l'ensemble des clones microgliaux, est la sulfatase dégradant l'héparine décrite par Morimoto-Tomita en 2002. Cette enzyme est spécifique des groupements glucosamine 6 phosphate trouvés dans l'héparine et les héparanes sulfate de la matrice extra-cellulaire. De façon intéressante, ces deux substrats pourraient être impliqués dans la régulation de la disponibilité des cytokines autour des cellules (Uchimura *et al.*, 2006). L'ARNm de la sulf-2 étant moins exprimé dans les cellules microgliales stimulées par l'IFN γ , il pourrait participer au statut immunitaire particulier du système nerveux central sain en régulant la disponibilité des facteurs neurotrophiques et/ou cytokines secrétées par la microglie. Le messager 1D12, non encore caractérisé, est exprimé dans l'EOC20 activée et faiblement dans l'EOC8 activée, présente une forte homologie avec la protéine de liaison du fragment Fc des immunoglobulines du rat et de l'homme (Harada *et al.*, 1997) et pourrait représenter l'homologue murin de cette molécule. La fonction de la Fc γ BP n'est toujours pas connue à l'heure actuelle. Le dernier messager code pour la protéase nexine 1 et est présent seulement dans l'EOC20. La protéase nexine 1 est un inhibiteur des activateurs de la dégradation de la matrice extra-cellulaire et peut donc favoriser l'ancrage des cellules à la matrice (Cuzner et Opdenakker, 1999). Elle inhibe également la thrombine et a donc des effets plutôt anti-inflammatoires (Choi *et al.*, 1990; Smirnova *et al.*, 1996). Certains auteurs l'ont mise en évidence dans les jonctions neuro-musculaires, dans le système nerveux central ou périphérique et lui attribuent des fonctions importantes dans la régulation de la plasticité synaptique (Festoff *et al.*, 1996; Smirnova *et al.*, 1996; Akaaboune *et al.*, 1998). Dans le système nerveux central, la protéase nexine a été décrite jusqu'alors essentiellement dans les astrocytes et cette protéine s'accumule en cas de dysfonction neuronale, confirmant ses effets neuroprotecteurs (Choi *et al.*, 1990). Etant donné nos résultats, il semble probable que la protéase nexine soit aussi secrétée par les cellules microgliales ou au moins certaines sous-populations.

Les macrophages infiltrent le parenchyme nerveux en cas d'inflammation. Or les trois messagers ne sont pas induits dans les macrophages péritonéaux ou spléniques même après 24 heures de stimulation par l'IFN γ , le TNF α ou l'IL-10 confirmant leur intérêt dans la discrimination précoce de la microglie et des macrophages au cours de maladies inflammatoires. Par ailleurs, nous avons confirmé *in vivo* leur expression au sein du système nerveux central en général et *ex vivo* dans les cellules microgliales adultes triées par cytofluorométrie stimulées ou non par de l'IFN γ .

Ainsi 1F3 (sulf-2), 1H4 (PN-1) et 1D12 sont de nouveaux outils moléculaires pour étudier la localisation respective des cellules microgliales et macrophagiques au cours de divers processus neurodégénératifs et étant donnée leur répartition différentielle dans les clones microgliaux, pourraient aussi être de nouveaux marqueurs de sous-populations microgliales.

DEUXIEME PUBLICATION

Neonatal and adult microglia cross-present exogenous antigens.

Céline Beauvillain^{*}, Sabrina Donnou^{*}, Ulrich Jarry, Marie Scotet, Yves Delneste, Pierre Guermonprez, Pascale Jeannin[#], and Dominique Couez[#].

(* et [#] contribution équivalente)

En révision favorable (accepté sous réserve de modifications), 2006, Glia.

Chez le nouveau-né, les cellules microgliales amiboïdes assurent surtout des fonctions de remodelage du tissu nerveux et régulent la survie des neurones (Marin-Teva *et al.*, 2004). Au cours du développement de l'individu, elles deviennent quiescentes et expriment moins fortement CD11b et CD45 que les autres macrophages de l'organisme (Ford *et al.*, 1995). Sous cette forme, elles assurent l'immunosurveillance du parenchyme nerveux (Nimmerjahn *et al.*, 2005). A la moindre perturbation de leur environnement, elles se réactivent rapidement, changent de morphologie, expriment plus fortement CD11b, CD45 et expriment toutes les molécules nécessaires à la présentation de l'antigène aux lymphocytes T (c'est-à-dire CMH cl. I et II et costimulateurs CD80 et 86) (Aloisi, 2001; Mack *et al.*, 2003).

La présentation classique de l'antigène s'effectue selon deux voies majeures dépendant de la nature de celui-ci. Ainsi les antigènes endogènes seront dégradés et associés aux molécules du CMH cl.I suivant une voie protéasome et TAP dépendante pour activer les lymphocytes T cytotoxiques. Les antigènes exogènes sont quant à eux endocytés puis associés aux molécules du CMH cl.II afin d'interagir avec les lymphocytes T auxiliaires. Il existe cependant une troisième voie, réservée aux cellules présentatrices d'antigènes professionnelles, qui sont capables dans certaines circonstances, de présenter les antigènes exogènes dans le contexte des molécules du CMH cl.I, un phénomène nommé présentation croisée.

Dans le système nerveux central, il semble que la présentation croisée puisse avoir lieu malgré l'environnement constitutivement immunodéprimé de ce site, et entraîne l'élimination d'une tumeur cérébrale (Walker *et al.*, 2000). De façon intéressante, Calzascia et collaborateurs (2003) ont montré que lorsque la tumeur ne peut pas présenter l'antigène, certaines cellules présentatrices d'antigènes présentes au sein de la tumeur pouvaient jouer un rôle dans le recrutement et la rétention des lymphocytes T spécifiques. Cependant, les cellules responsables n'avaient pas été déterminées. Lorsqu'une tumeur se développe dans le parenchyme nerveux, les cellules microgliales sont les premières à être en contact avec les cellules tumorales du fait de la barrière hémato-encéphalique et sont donc idéalement placées dans le cadre d'une immunothérapie pour initier une réponse anti-tumorale précoce. Nous avons donc cherché si elles étaient capables d'effectuer la présentation croisée chez la souris. De plus, dans la mesure où les cellules microgliales n'ont pas les mêmes propriétés en fonction de leur stade de maturation, nous avons comparé les capacités de présentation croisée d'une lignée microgliale et des cellules microgliales primaires néonatales ou adultes.

NEONATAL AND ADULT MICROGLIA CROSS-PRESENT EXOGENOUS ANTIGENS
Céline Beauvillain ^{*1,2}, Sabrina Donnou ^{*1,3}, Ulrich Jarry ^{1,3}, Mari Scotet ¹, Yves Delneste ¹,

Pierre Guermonprez ⁴, Pascale Jeannin ^{#1,2}, and Dominique Couez ^{#1,3}

¹Equipe Avenir-INSERM U 564, Angers University, University Hospital of Angers, France;

²Laboratoire d'Immunologie et Allergologie, University Hospital of Angers, France ;

³Laboratoire de Biologie Moléculaire, Immunologie et Thérapeutique des Cancers (BMITC),

Angers University, France ; ⁴Institut Curie, INSERM U653, Immunité et Cancer, Paris,

France.

* Authors participate equally to this work

#Equally supervise this work

Running title : Antigen cross-presentation by microglia

Number of words : 6506

Number of figures : 6

• Address correspondence and reprint requests to Dominique Couez, INSERM U564, CHU, 4, rue Larrey, F-49033 Angers, France. E-mail address: dominique.couez@univ-angers.fr

Key words: antigen presentation, CNS APC, neuroimmunology, cross-priming

ABSTRACT

Some observations have suggested that cells from the central nervous system (CNS) could present exogenous antigens on major histocompatibility complex (MHC) class I molecules to CD8⁺ T cells (a process called cross-presentation). Microglia are the major myeloid immunocompetent cells of the CNS. When activated following injury of the nervous parenchyma they become fully competent antigen-presenting cells (APC) that prime CD4⁺ T lymphocytes. We therefore tested the cross-presentation capacity of murine microglia. We report that a microglial cell line (C8-B4), neonatal microglia and interestingly adult microglia cross-present soluble exogenous antigen (ovalbumin) to an OVA-specific CD8⁺ T cell hybridoma and cross-prime OVA-specific naive OT-1 CD8⁺ T cells. In both these cases, C8-B4 and neonatal microglia cross-present OVA as well as peritoneal macrophages. While cross-presentation by adult microglia is less efficient, it is increased by GM-CSF and CpG oligodeoxynucleotide (ODN) stimulation. Using microglial cells either exposed to an inhibitor of proteasome, lactacystin, or purified from TAP^{-/-} mice, we demonstrate that microglia cross-present antigen in proteasome- and TAP- dependant pathways respectively. Lastly, microglia purified from adult mice injected intracerebrally with OVA efficiently stimulate OVA-specific CD8⁺ T cells, thereby showing that microglia take up and process exogenous antigen into MHC class I *in vivo*. This first demonstration of the cross-presentation property of microglia offers novel therapeutic approaches to modulate CD8 T cell responses in the brain.

INTRODUCTION

Microglia are the main resident antigen presenting cells (APC) of the central nervous system (CNS) parenchyma. They originate from myeloid precursors and invade the brain parenchyma before formation of the blood-brain barrier (Hess et al. 2004; Kennedy and Abkowitz 1997). Among all the myeloid cells characterized by CD11b expression, resident microglia are distinguished by a lower level of CD45. Neonatal microglial cells display an amoeboid morphology, high proliferative capacity and phagocytic activity correlated with their FcR expression (Giulian and Baker 1986). It is thought that neonatal microglia contribute to the remodelling of the developing brain by enhancing apoptosis or survival of neuronal cells, and by phagocytosing cellular debris (Ferrer et al. 1990; Marin-Teva et al. 2004; Rabchevsky and Streit 1997). In healthy adult brain, ramified microglia become quiescent and display a down regulated or less differentiated phenotype, compared to peripheral macrophages, characterized by low level of CD45, decreasing of FcR and low to undetectable MHC class II and costimulatory molecules (Ford et al. 1995). In this resting state, adult microglia continuously sense the environment and are involved in the local immune surveillance (Nimmerjahn et al. 2005). They are highly sensitive to pathologic changes and have been implicated in neurodegenerative diseases of the CNS (such as experimental autoimmune encephalomyelitis or Alzheimer's disease), in viral or bacterial infection and in tumor development (Bauer et al. 1995; Giulian 1999; Mariani et al. 2006; Minagar et al. 2002; Olson et al. 2001; Ponomarev et al. 2005; Rock et al. 2004). However, the magnitude and characteristics of microglial responses differ considerably depending on the pathology. Following any perturbation, adult resting microglia are rapidly activated, express a wide range of innate immune receptors such as TLRs or scavenger receptors (Alarcon et al. 2005; Husemann et al. 2002; Jack et al. 2005; Olson and Miller 2004), migrate to the lesion site, proliferate, present an upregulation of costimulatory molecule expression and become

able to prime naïve T cells (Aloisi et al. 2000; Havenith et al. 1998). In parallel, activated microglia also secrete a large panel of soluble factors (cytokines, chemokines, neurotrophic and cytotoxic factors) and modulate the local immune response (Ambrosini and Aloisi 2004; Hanisch 2002; Nakajima and Kohsaka 2004).

Professional APCs (e.g., dendritic cells (DCs) and macrophages) process antigens into peptides that are subsequently bound to MHC molecules and presented on cell surface to T lymphocytes. Classically, peptides derived from exogenous proteins are presented in the context of MHC class II molecules (MHC-II) to CD4⁺ T cells (Harding 1995; Watts 1997). In contrast, endogenous proteins, such as self and viral proteins, are usually degraded by the proteasome and then transported, in a TAP-dependent pathway, to the endoplasmic reticulum where they are complexed to MHC class I molecules and presented on cell surface to CD8⁺ T cells (Yewdell and Bennink 1999). However in some circumstances, DCs and macrophages present exogenous antigens into MHC class I molecules, a process called antigen cross-presentation (Guermontprez and Amigorena 2005; Shen and Rock 2006). Antigen cross-presentation is essential to generate CD8⁺ T cell specific responses against antigens expressed exclusively in parenchymal cells (e.g. from mutations or tissue-tropic viruses).

Walker and colleagues (2000) observed that cross-presentation was efficient in the CNS and involved in brain tumor elimination (Walker et al. 2000). Interestingly when the tumor itself is deficient in antigen presentation, some APC present in the stroma of an intracranial tumor play a key role in the recruitment and retention of tumor specific cytotoxic T lymphocytes (Calzascia et al. 2003) thereby suggesting that some cells within the CNS are able to cross-present Ag. To date, the nature of these cells remains undetermined.

During the early phase of brain tumor development, due to the limited passage of peripheral blood immune cells through an intact blood-brain barrier (BBB), microglia are the first APC in contact with tumoral cells (Proescholdt et al. 2001).

In this study, we then evaluated whether microglial cells could cross-present exogenous antigens. Most of the studies on microglia have been performed with neonatal microglial cells, easier to isolate and culture than primary adult microglia. However, the phenotype of neonatal and adult microglial cells differs and functional data performed with neonatal microglia should be carefully extended to adult microglia. In our study, we therefore analyzed and compared the cross-presentation capacity of three microglial populations: the microglial cell line C8-B4, primary neonatal and adult microglial cells. We demonstrate that these three populations cross-present exogenous antigens and cross-prime naïve T cells *in vitro*, that adult microglia present exogenous antigen in the MHC class I molecules *in vivo*, and that a pro-inflammatory stimulation upregulates adult microglia cross-presentation efficiency.

MATERIALS AND METHODS

Mice

C57BL/6 mice and OVA-specific TCR transgenic mice OT-1, specific for the ovalbumin peptide SIINFEKL bound to H2-K^b were purchased from Charles River laboratories (L'Arbresle, France). B6;129S-TAP1^{tm1Arp} (TAP^{-/-}) mice were from Centre National de la Recherche Scientifique (CDTA, Orléans, France). Mice were bred in our animal facility under specific pathogen-free conditions and were manipulated according to institutional guidelines.

Microglia Isolation and culture

The spontaneously immortalized microglial cell line (C8-B4), kindly provided by Pr. B. Pessac, was cultured in DMEM (Biowhittaker, Verviers, Belgium) supplemented with 10% FCS (Alliot et al. 1996).

Adult microglia were isolated from eight to twelve-week-old mice as previously described (Donnou et al. 2005). Briefly, glial cells were enriched by a discontinuous 30:70% isotonic Percoll gradient (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) from perfused CNS of adult C57BL/6 mice. Intraparenchymal microglia were then positively selected by incubation with 10 µg/ml biotin-conjugated anti-CD11b mAb (clone M1/70; eBioscience, San Diego, CA) and magnetically sorted using anti-biotin coated microbeads (Myltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) according to the manufacturer's instruction. Cell purity, determined by flow cytometry using anti-CD11b and -CD45 mAbs, was routinely >95%. Adult microglial cells were cultured in 24-well plates in DMEM containing 10% FCS, 20% of LADMAC cells-conditioned medium (as a source of M-CSF), 50 µM of 2-mercaptoethanol and antibiotics (Sigma-Aldrich). Cells were allowed to recover their bipolar morphology before use.

Neonatal microglia were derived from newborn (one to two days old) mice. After careful removal of the meninges, brains were mechanically disrupted and filtered through 100 μ m nylon strainers. Cells were seeded in DMEM supplemented with 10% FCS and antibiotics for 12-14 days. Confluent mixed glial cultures were vigorously shaken and non adherent cells were seeded in new culture Petri dishes. After 1 h, non adherent cells were eliminated and adherent microglial cells were maintained in culture to allow cells to recover normal morphology. Purity was evaluated by cytometry using CD11b and CD45 antibodies.

T cell isolation and culture

CD8⁺ T cells from OT-1 transgenic mice were isolated from spleen and lymph nodes by negative selection using MACS technology according to the manufacturer's instructions and followed by DCs depletion using CD11c⁺ microbeads (Miltenyi Biotec). Resulting cells were >98% pure, as determined by FACS-staining for CD3 and CD8. The B3Z CD8⁺ T-cell hybridoma (B3Z), specific for the H-2K^b/OVA₂₅₇₋₂₆₄ complex, was kindly provided by N. Shastri (Sanderson and Shastri 1994) and was cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS. In this CD8⁺ hybridoma, β -galactosidase is under the control of IL-2 promoter.

Flow cytometric analysis

The phenotype of the cells was analyzed by flow cytometry using a FACScalibur cytofluorometer (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium). Biotin- and FITC-labelled anti-CD11b (clone M1/70, rat IgG2b), PE-labeled anti-CD11c (clone HL3, Hamster IgG1), FITC- and biotin-labelled anti-CD45 (clone 30-F11, rat IgG2b) mAbs were from e-Biosciences (San Diego, CA). Anti-CD16/CD32 (clone 2.4G2, rat IgG2b), FITC-labeled anti-MHC class II (I-A^b; clone AF6-120.1, mouse IgG2a), FITC-labeled anti-MHC class I (H2-K^b;

clone AF6-88.5, mouse IgG2a), -CD80 (clone 16-10A1, hamster IgG) and -CD86 (clone GL1; rat IgG2a) mAbs and isotype control mAbs were all from BD-Pharmingen (San Diego, CA). In all the experiments, cells were first incubated for 20 min with 10 µg/ml anti-CD16/CD32 mAb (clone 2.4G2, rat IgG2b; BD-Pharmingen) to saturate Fc receptors and 30 min with 10 µg/ml mAbs. Fixation of biotin-labeled mAb was revealed by Cy-Chrome-conjugated streptavidin (BD-Pharmingen).

OVA cross-presentation and cross-priming assays

Microglia from wild type or TAP^{-/-} mice (2×10^5 cells/well) were incubated with OVA for 8 h, before fixation with 0.008% glutaraldehyde for 3 min at room temperature, and then, co-cultured either with 1×10^5 B3Z hybridoma cells/well for 18 h or with OT-1 CD8⁺ T cells (10^5 per well) for 24 h. The LB27.4 B-cell line cells (ATCC, Manassas, VA) (negative control) and F4/80⁺ peritoneal macrophages, obtained from thioglycolate treated mice (positive control), were treated accordingly. B3Z activation was monitored by the induction of lacZ using the fluorogenic substrate methyl-umbelliferyl-D-galactoside (MUG, Sigma-Aldrich) (Sanderson and Shastri 1994). Results are expressed in stimulation index determined as follows: $SI = A/B$ where A is the B3Z response in the presence of OVA pulsed cells and B is the B3Z response in the presence of cells alone.

OT-1 activation was evaluated by quantifying IL-2 production by ELISA (BD Pharmingen, San Diego, CA). OVA, purchased from Affiland (Ans-Liege, Belgium), was dialyzed before use (Reis e Sousa and Germain 1995). In some experiment, microglia were incubated for 30 min with 10 µM lactacystin (Sigma-Aldrich) before addition of OVA.

Ex vivo cross-presentation

For intracerebral (IC) antigen delivery, mice were anesthetized by intraperitoneal (IP) injection of a mixture of 90 mg/kg of ketamine and 10 mg/kg of xylazine. OVA (400 µg diluted into 40 µl sterile PBS) or an equal volume PBS were injected into both right frontal lobes (20 µl per hemisphere) through an insulin syringe attached to a penetrating depth controller. The injection was restricted to the ventral-posterior region of the frontal lobe, and the penetrating depth of the syringe was 2.5 mm from the surface of the brain. For each IC injection, the solution was delivered slowly, and then the syringe was held in place for an additional minute to reduce backfilling of injected solution. Adult microglia were isolated 18h later and OVA processing was measured *in vitro* using the B3Z assay.

Statistical analysis

Data are shown as means \pm SD and were analyzed by the Mann-Whitney test to reveal significant differences. $P < 0.05$ was taken as the level of significance. InStat 2.01 software was used for all statistical analyses.

RESULTS

1) Phenotype, morphology and activation status of C8-B4, neonatal and adult microglia

In addition to microglia, DCs and CNS macrophages, absent in the brain parenchyma, have been identified in the meninges, the choroids plexus and in the perivascular space in the healthy CNS of mice (Lassmann et al. 1993; Matyszak and Perry 1996; McMenamin 1999). To ascertain that all experiments were conducted using intraparenchymal microglia devoid of any meningeal and perivascular contamination, we analyzed by FACS the purity of neonatal and adult primary microglia isolated from perfused C57BL/6 mice CNS without meninges. We obtained a homogenous population of cells, as assessed by forward and side scatter characteristics (data not shown), that as expected, expressed low levels of CD45 and undetectable CD11c (Aloisi et al. 2000; Ford et al. 1995), allowing to exclude the presence of contaminating macrophages (CD45^{high}) and dendritic cells (CD11c⁺) (Fig. 1a). Neonatal and adult primary microglia express CD11b and present a typical amoeboid or bipolar morphology respectively (Fig. 1b), confirming the homogeneity of isolated cells. The C8-B4 cell line is also CD11b⁺, CD45^{low}, CD11c^{+/-} and exhibits a ramified bipolar morphology (Fig. 1a and 1b).

Activated microglia show an up-regulation of MHC-II and of CD80 and CD86 costimulatory molecules (Rock et al. 2004). We therefore evaluated the degree of activation of the three microglial subsets by analyzing the expression of these markers by FACS. No significant expression of MHC-II and CD86 molecules was detected on primary microglia. While neonatal microglia expressed CD80, it was undetectable on adult microglia, suggesting a more quiescent state (Fig.1a). The C8-B4 cell line constitutively expressed MHC-II, CD80 and CD86, showing that these cells are spontaneously activated. Lastly, these three microglial cell types expressed MHC-I molecules at an equivalent level (Fig. 1a).

2) Ag cross-presentation by microglia

We next analyzed and compared the cross-presentation properties of the C8-B4 microglial cell line, neonatal and adult primary microglia. Microglial cells were pulsed with increasing concentrations of OVA and used to stimulate the B3Z CD8⁺ T-cell hybridoma.

Results showed that the three microglial cell types were able to cross-present OVA to the B3Z T-cell hybridoma although with different efficiencies. C8-B4 and neonatal microglia were more efficient in cross-presenting OVA (SI = 6, at 100 μM OVA) than primary adult microglia (SI = 2.2). Moreover, C8-B4 and neonatal microglia were more efficient than peritoneal macrophages, used as positive control to activate the B3Z hybridoma. Stimulation of the CD8⁺ T cell hybridoma was dependent on the concentration of OVA used to pulse the different types of microglia (Fig. 2). As a negative control (Kovacsovics-Bankowski et al. 1993), the LB27.4 B lymphoma cell line did not significantly cross-present OVA, even at the highest concentrations of OVA tested (Fig. 2). These results demonstrate for the first time that microglia cross-present exogenous antigens.

3) Naive CD8⁺ T cells cross-priming by microglia

The B3Z hybridoma only requires T cell receptor-MHC class I engagement for activation. We then investigated whether microglia could be able to activate naive OT-1 OVA-specific CD8⁺ T cells. As shown in Fig. 3, the three types of OVA-pulsed microglia induced IL-2 secretion by OT-1 CD8⁺ T cells *in vitro*. Adult microglia was less efficient than neonatal cells to cross-prime OVA antigen to OT-1 cells (IL-2 = 900 and 1450 pg/ml at 100 μM OVA, respectively), while the C8-B4 cell line was more efficient (IL-2 = 1900 pg/ml at 100 μM OVA). No IL-2 was detected in the supernatants of the different types of microglia pulsed with OVA in the absence of OT-1 (data not shown). Together, these data show that, not only

the C8-B4 microglial cell line, but also neonatal and adult microglia cross-prime soluble antigen to naïve CD8⁺ T cells.

4) Cross-presentation by microglia is TAP- and proteasome-dependent

Presentation of exogenous antigens on MHC class I molecules by APCs can occur through different mechanisms. One of the major pathway requires proteasomes and the TAP-transporter (Kovacsovics-Bankowski and Rock 1995). In an attempt to identify the pathway involved in antigen cross-presentation by microglia, C8-B4, the most efficient cross-presenting microglial cells, were pretreated with lactacystin prior to be pulsed with OVA. Results showed that lactacystin prevented the capacity of C8-B4 to cross-present OVA to OT-1 CD8⁺ T cells (80% reduction compared to untreated C8-B4 cells; Fig. 4a).

To examine the role of the TAP pathway, adult microglia from C57BL/6 wild type and TAP-deficient mice were pulsed with OVA and used to stimulate OT-1 CD8⁺ T cells (Fig. 4b). Results showed that the ability of OVA-pulsed microglia from TAP^{-/-} mice to cross-prime OT-1 CD8⁺ T cells was dramatically reduced compared to microglia from wild-type mice (85 % decrease of IL-2 production). Together, these findings indicate that microglia process and cross-present exogenous antigen in a TAP- and proteasome-dependent manner.

5) *Ex vivo* cross presentation by microglia

Based on these *in vitro* data, we then analyzed whether microglia have the ability to take up and process exogenous antigens into MHC class I-bound peptides *in vivo*, in the immunosuppressed environment of the CNS. OVA was injected into the brain of C57BL/6 mice and we analyzed the ability of purified microglial cells to cross-present OVA to B3Z cells. For technical reasons, experiments were done only with adult microglia. Results showed that microglia isolated from mice injected with OVA, but not from mice injected with PBS, cross-presented OVA to the CD8⁺ T cells (stimulation index = 2.2 and 1, respectively, Fig. 5b). Few CD45^{hi} cells (activated microglia and/or contaminant peripheral macrophages) were

present in our preparations, certainly due to the injury caused by the syringe, but constantly represent less than 2% of total cells (Fig. 5a). This concentration of contaminant cells was not sufficient to stimulate B3Z (data not shown), therefore confirming that the observed effect was due to microglia. These results demonstrate that adult microglia take up and efficiently process exogenous antigen into MHC class I-bound peptides *in situ*.

6) GM-CSF and CpG-ODN enhance cross-presentation by adult primary microglia

Adult microglia cross-present OVA less efficiently than macrophages or other types of microglia. In the brain, microglial cells must be activated by stimuli such as GM-CSF and/or IFN γ to acquire their full APC function (Fischer et al. 1993; Havenith et al. 1998). Type I IFN and CpG-ODN, a TLR9 agonist, have been shown to increase cross-presentation by DC (Durand et al. 2004; Kuchtey et al. 2005; Lapenta et al. 2006). We therefore tested whether these stimuli either alone or in combination, could improve the efficiency of cross-presentation by adult microglia. While alone they did not modulate OVA cross-presentation by adult microglia, GM-CSF plus CpG significantly ($p < 0.05$) upregulated their cross-presentation capacity (Fig. 6). We did not observe any effect of type I (IFN α/β) or II IFN (IFN γ) used either alone or in combination with GM-CSF or CpG (data not shown). These data suggest that some TLR agonists and pro-inflammatory cytokines may upregulate adult microglia cross-presentation capacity.

DISCUSSION

Recent data have demonstrated that cross-presentation is efficient in the CNS and involved in brain tumor elimination (Calzascia et al. 2003; Walker et al. 2000). To date, the nature of these cross-presenting cells remains undefined. Using highly purified microglia from adult mouse brain and neonatal microglia, we demonstrate here for the first time that microglia cross-present soluble antigens in a proteasome- and TAP-dependent manner. We also report that adult microglia take up and process OVA for presentation in MHC class I molecules *in vivo*. Moreover, we underline that cross-presentation capacity of adult microglia can be regulated by some exogenous stimuli.

We show that microglial cells, the resident APCs of the CNS, cross-present antigens to naïve and memory CD8⁺ T cells *in vitro*. According to the nature of the antigen, cross-presentation in peripheral professional APCs (DCs and macrophages) can occur by two different mechanisms (Shen and Rock 2006). One requires the TAP transporter and includes pathways dependent or not on proteasomes; the other is TAP-independent. Using microglia from TAP-deficient mice and the proteasome inhibitor lactacystin, we report that soluble OVA cross-presentation by microglia depends on the TAP machinery and on proteasomes. Peripheral DCs and macrophages also cross-present soluble OVA via this pathway (Chefalo et al. 2003; Rodriguez et al. 1999).

We also report here that the three microglial cell type tested (C8-B4, neonatal microglial and primary adult microglial cells) were not equivalent in their cross-presenting capacities. This could be related to their degree of differentiation and/or activation. In agreement with previous data (Alliot et al. 1996), we observe that the C8-B4 cell line is constitutively activated (as shown by MHC class I, MHC class II, CD80 and CD86 expression), a phenotype that can contribute to explain why they are the most efficient in cross-presenting antigen to naïve T CD8⁺ cells. The neonatal microglial cells efficiently cross-

presented antigen, although in a lower extent than C8-B4. Generated from mix glial culture, neonatal microglia appeared less activated than C8-B4 (they expressed undetectable levels of MHC class II, constitutively expressed MHC class I and CD80 and no or low CD86). However, neonatal microglia are characterized by a high phagocytic activity, associated with high levels of mannose and scavenger receptors expression that may favor antigen uptake (Alarcon et al. 2005). These characteristics could be responsible, at least in part, to their cross-presentation efficiency. Adult microglia were less efficient than the two other microglia types in cross-presenting antigens. This observation could be related to the resting phenotype of adult microglial cells derived from brain (they expressed undetectable levels of MHC class II, CD80 and CD86), showing that our isolation procedure has not activated these cells. In addition, adult microglia are heterogeneous and it is thought that different subpopulations exist. Supporting this hypothesis, EOC microglial cell lines display opposite capacity to activate naïve CD8⁺ or CD4⁺ T cells (Walker et al. 1995). More recently, Kanzawa and colleagues (2000) derived at least four microglial subpopulations from mouse brain by stimulation with GM-CSF, that exhibit a particular ability to activate T lymphocytes (Kanzawa et al. 2000). Although the existence of these subpopulations has not been demonstrated *in vivo*, due to the absence of specific markers for each of them, we can not exclude that, in our experiments, only a fraction of total microglia population cross present antigen.

Adult microglia in the CNS are confined in an immunosuppressed environment and have a downregulated phenotype (Bailey et al. 2006). We therefore tested whether adult microglial cells were still able to process exogenous antigen in the MHC class I molecules *in vivo*. We show that microglial cells isolated from OVA-injected brain cross-present antigen as efficiently as OVA pulsed-primary adult microglia, thereby demonstrating for the first time, that adult microglia efficiently take up antigen, process and present it in the MHC class I

context *in vivo*. *In vivo*, antigen cross-presentation leads to naïve CD8⁺ T cell proliferation and give rise either to the induction of CD8⁺ cytotoxic T cells (cross-priming) or to the deletion of specific T cells (cross-tolerance) (Davey et al. 2002; Heath and Carbone 2001). The observation that microglial cells cross-prime naïve T cells *in vitro* suggest that microglia may actively control the outcome of CD8⁺ T cell response to exogenous antigens *in vivo*. However, we cannot conclude about the induction of cross-priming versus cross-tolerance. The origin of the antigens (i.e. self *versus* non self), the type of the antigen cross-presenting cells (i.e. professional APCs *versus* endothelial cells) and the microenvironment (stress *versus* inhibitory signals) control the outcome of cross-presentation. The brain parenchyma is a highly specialized site in which the anatomy, cellular composition, and the microenvironmental soluble factors have the potential to affect and suppress immune reactivity (Bailey et al. 2006; Carson et al. 2006). Based on our data, it is tempting to speculate that, in a physiological context, cross-presentation by resting microglia may contribute to maintain CD8⁺ T cell tolerance against self antigens. During brain tumor development, the immunosuppressive environment is reinforced by factors secreted by tumors such as TGFβ (Hinkerohe et al. 2005; Wick et al. 2006). This may contribute to explain why, although microglia cross-present antigens and infiltrate brain tumor in large number, the brain's immune system seems unable to halt the progressive growth of glial tumors (Badie and Schartner 2001).

Although their activation in the CNS is tightly controlled to avoid any neuronal injury, microglial cells activated by pathogen derived signals and/or by pro-inflammatory cytokines, can become efficient APC (Ponomarev et al. 2006). IFNγ is commonly used to stimulate APCs, including microglia (Walker et al. 1995). Microglia also express members of the TLR family and are activated by some TLR-agonists (Kielian 2006; Olson and Miller 2004). Among these, CpG-ODN increase microglia APC function (Dalpke et al. 2002). To achieve

full microglial activation, and notably their APC function, more than one stimulus are often required (Matyszak et al. 1999; Ponomarev et al. 2006). Interestingly, it has been reported that DC's cross-presenting efficiency is increased by some TLR agonists, and/or IFN- α or β (Durand et al. 2004; Kuchtey et al. 2005; Lapenta et al. 2006). However, we failed in detecting an effect of CpG-ODN and of type I or type II IFNs used alone or in combination, on adult microglial cells cross-presentation. GM-CSF has been also shown to potentiate adult microglia antigen presentation (Aloisi et al. 2000; Fischer et al. 1993; Re et al. 2002). Moreover, some studies reported that microglia maintained under GM-CSF influence for few days, could generate a dendritic-like subpopulation (Fischer and Reichmann 2001; Ponomarev et al. 2005; Santambrogio et al. 2001). In our experiments, we showed that the combination of GM-CSF plus CpG enhanced adult microglia cross-presentation property, thereby underlining that the Ag cross presentation potential of adult microglia can be regulated by exogenous stimuli, including cytokines and TLR agonists.

The prognosis for most patients with gliomas is poor and standard therapies often fail resulting in tumor recurrences, which has fostered an interest in the development of alternative treatments such as immunotherapy. Given our results, it could be of great interest to test the cross-presentation ability of tumor infiltrating microglia submitted to a local GM-CSF plus CpG treatment. In conclusion, this new property of microglia opens novel perspectives to improve brain tumor immunotherapies based on CTL generation.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dr B. Pessac and Dr D. Trisler for providing the C8-B4 microglial cell line, and to Dr N. Shastri for the B3Z hybridoma. We thank Patrice Chiron for animal breeding assistance. This work was supported by the “Ligue Contre le Cancer” (comité départemental de Maine et Loire) and by the National Institute of Health and Medical Research (Contrat Avenir). The structure dedicated to *in vitro* cross-presentation assay is supported by Canceropole Grand-Ouest. S. Donnou was funded by a fellowship from the “Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC)” and the Angers University.

REFERENCES

- Alarcon R, Fuenzalida C, Santibanez M, von Bernhardt R. 2005. Expression of scavenger receptors in glial cells. Comparing the adhesion of astrocytes and microglia from neonatal rats to surface-bound beta-amyloid. *J Biol Chem* 280(34):30406-15.
- Alliot F, Marty MC, Cambier D, Pessac B. 1996. A spontaneously immortalized mouse microglial cell line expressing CD4. *Brain Res Dev Brain Res* 95(1):140-3.
- Aloisi F, Ria F, Adorini L. 2000. Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes. *Immunol Today* 21(3):141-7.
- Ambrosini E, Aloisi F. 2004. Chemokines and glial cells: a complex network in the central nervous system. *Neurochem Res* 29(5):1017-38.
- Badie B, Schartner J. 2001. Role of microglia in glioma biology. *Microsc Res Tech* 54(2):106-13.
- Bailey SL, Carpentier PA, McMahon EJ, Begolka WS, Miller SD. 2006. Innate and adaptive immune responses of the central nervous system. *Crit Rev Immunol* 26(2):149-88.
- Bauer J, Huitinga I, Zhao W, Lassmann H, Hickey WF, Dijkstra CD. 1995. The role of macrophages, perivascular cells, and microglial cells in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glia* 15(4):437-46.
- Calzascia T, Di Bernardino-Besson W, Wilmotte R, Masson F, de Tribolet N, Dietrich PY, Walker PR. 2003. Cutting edge: cross-presentation as a mechanism for efficient recruitment of tumor-specific CTL to the brain. *J Immunol* 171(5):2187-91.
- Carson MJ, Doose JM, Melchior B, Schmid CD, Ploix CC. 2006. CNS immune privilege: hiding in plain sight. *Immunol Rev* 213:48-65.
- Chefalo PJ, Grandea AG, 3rd, Van Kaer L, Harding CV. 2003. Tapasin^{-/-} and TAP1^{-/-} macrophages are deficient in vacuolar alternate class I MHC (MHC-I) processing due to decreased MHC-I stability at phagolysosomal pH. *J Immunol* 170(12):5825-33.
- Dalpke AH, Schafer MK, Frey M, Zimmermann S, Tebbe J, Weihe E, Heeg K. 2002. Immunostimulatory CpG-DNA activates murine microglia. *J Immunol* 168(10):4854-63.
- Davey GM, Kurts C, Miller JF, Bouillet P, Strasser A, Brooks AG, Carbone FR, Heath WR. 2002. Peripheral deletion of autoreactive CD8 T cells by cross presentation of self-antigen occurs by a Bcl-2-inhibitable pathway mediated by Bim. *J Exp Med* 196(7):947-55.

- Donnou S, Fisson S, Mahe D, Montoni A, Couez D. 2005. Identification of new CNS-resident macrophage subpopulation molecular markers for the discrimination with murine systemic macrophages. *J Neuroimmunol* 169(1-2):39-49.
- Durand V, Wong SY, Tough DF, Le Bon A. 2004. Shaping of adaptive immune responses to soluble proteins by TLR agonists: a role for IFN-alpha/beta. *Immunol Cell Biol* 82(6):596-602.
- Ferrer I, Bernet E, Soriano E, del Rio T, Fonseca M. 1990. Naturally occurring cell death in the cerebral cortex of the rat and removal of dead cells by transitory phagocytes. *Neuroscience* 39(2):451-8.
- Fischer HG, Nitzgen B, Germann T, Degitz K, Daubener W, Hadding U. 1993. Differentiation driven by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor endows microglia with interferon-gamma-independent antigen presentation function. *J Neuroimmunol* 42(1):87-95.
- Fischer HG, Reichmann G. 2001. Brain dendritic cells and macrophages/microglia in central nervous system inflammation. *J Immunol* 166(4):2717-26.
- Ford AL, Goodsall AL, Hickey WF, Sedgwick JD. 1995. Normal adult ramified microglia separated from other central nervous system macrophages by flow cytometric sorting. Phenotypic differences defined and direct ex vivo antigen presentation to myelin basic protein-reactive CD4+ T cells compared. *J Immunol* 154(9):4309-21.
- Giulian D. 1999. Microglia and the immune pathology of Alzheimer disease. *Am J Hum Genet* 65(1):13-8.
- Giulian D, Baker TJ. 1986. Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain. *J Neurosci* 6(8):2163-78.
- Guermonprez P, Amigorena S. 2005. Pathways for antigen cross presentation. *Springer Semin Immunopathol* 26(3):257-71.
- Hanisch UK. 2002. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 40(2):140-55.
- Harding CV. 1995. Intracellular organelles involved in antigen processing and the binding of peptides to class II MHC molecules. *Semin Immunol* 7(6):355-60.
- Havenith CE, Askew D, Walker WS. 1998. Mouse resident microglia: isolation and characterization of immunoregulatory properties with naive CD4+ and CD8+ T-cells. *Glia* 22(4):348-59.
- Heath WR, Carbone FR. 2001. Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 19:47-64.

- Hess DC, Abe T, Hill WD, Studdard AM, Carothers J, Masuya M, Fleming PA, Drake CJ, Ogawa M. 2004. Hematopoietic origin of microglial and perivascular cells in brain. *Exp Neurol* 186(2):134-44.
- Hinkerohe D, Smikalla D, Haghikia A, Heupel K, Haase CG, Dermietzel R, Faustmann PM. 2005. Effects of cytokines on microglial phenotypes and astroglial coupling in an inflammatory coculture model. *Glia* 52(2):85-97.
- Husemann J, Loike JD, Anankov R, Febbraio M, Silverstein SC. 2002. Scavenger receptors in neurobiology and neuropathology: their role on microglia and other cells of the nervous system. *Glia* 40(2):195-205.
- Jack CS, Arbour N, Manusow J, Montgrain V, Blain M, McCrea E, Shapiro A, Antel JP. 2005. TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. *J Immunol* 175(7):4320-30.
- Kanzawa T, Sawada M, Kato K, Yamamoto K, Mori H, Tanaka R. 2000. Differentiated regulation of allo-antigen presentation by different types of murine microglial cell lines. *J Neurosci Res* 62(3):383-8.
- Kennedy DW, Abkowitz JL. 1997. Kinetics of central nervous system microglial and macrophage engraftment: analysis using a transgenic bone marrow transplantation model. *Blood* 90(3):986-93.
- Kielian T. 2006. Toll-like receptors in central nervous system glial inflammation and homeostasis. *J Neurosci Res* 83(5):711-30.
- Kovacsovics-Bankowski M, Clark K, Benacerraf B, Rock KL. 1993. Efficient major histocompatibility complex class I presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(11):4942-6.
- Kovacsovics-Bankowski M, Rock KL. 1995. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* 267(5195):243-6.
- Kuchtey J, Chefalo PJ, Gray RC, Ramachandra L, Harding CV. 2005. Enhancement of dendritic cell antigen cross-presentation by CpG DNA involves type I IFN and stabilization of class I MHC mRNA. *J Immunol* 175(4):2244-51.
- Lapenta C, Santini SM, Spada M, Donati S, Urbani F, Accapezzato D, Franceschini D, Andreotti M, Barnaba V, Belardelli F. 2006. IFN-alpha-conditioned dendritic cells are highly efficient in inducing cross-priming CD8(+) T cells against exogenous viral antigens. *Eur J Immunol* 36(8):2046-60.
- Lassmann H, Schmied M, Vass K, Hickey WF. 1993. Bone marrow derived elements and resident microglia in brain inflammation. *Glia* 7(1):19-24.

- Mariani CL, Kouri JG, Streit WJ. 2006. Rejection of RG-2 gliomas is mediated by microglia and T lymphocytes. *J Neurooncol* 79(3):243-53.
- Marin-Teva JL, Dusart I, Colin C, Gervais A, van Rooijen N, Mallat M. 2004. Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron* 41(4):535-47.
- Matyszak MK, Denis-Donini S, Citterio S, Longhi R, Granucci F, Ricciardi-Castagnoli P. 1999. Microglia induce myelin basic protein-specific T cell anergy or T cell activation, according to their state of activation. *Eur J Immunol* 29(10):3063-76.
- Matyszak MK, Perry VH. 1996. The potential role of dendritic cells in immune-mediated inflammatory diseases in the central nervous system. *Neuroscience* 74(2):599-608.
- 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 wholemount preparations. *J Comp Neurol* 405(4):553-62.
- Minagar A, Shapshak P, Fujimura R, Ownby R, Heyes M, Eisdorfer C. 2002. The role of macrophage/microglia and astrocytes in the pathogenesis of three neurologic disorders: HIV-associated dementia, Alzheimer disease, and multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 202(1-2):13-23.
- Nakajima K, Kohsaka S. 2004. Microglia: neuroprotective and neurotrophic cells in the central nervous system. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 4(1):65-84.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308(5726):1314-8.
- Olson JK, Girvin AM, Miller SD. 2001. Direct activation of innate and antigen-presenting functions of microglia following infection with Theiler's virus. *J Virol* 75(20):9780-9.
- Olson JK, Miller SD. 2004. Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol* 173(6):3916-24.
- Ponomarev ED, Shriver LP, Dittel BN. 2006. CD40 expression by microglial cells is required for their completion of a two-step activation process during central nervous system autoimmune inflammation. *J Immunol* 176(3):1402-10.
- Ponomarev ED, Shriver LP, Maresz K, Dittel BN. 2005. Microglial cell activation and proliferation precedes the onset of CNS autoimmunity. *J Neurosci Res* 81(3):374-89.
- Proescholdt MA, Merrill MJ, Ikejiri B, Walbridge S, Akbasak A, Jacobson S, Oldfield EH. 2001. Site-specific immune response to implanted gliomas. *J Neurosurg* 95(6):1012-9.
- Rabchevsky AG, Streit WJ. 1997. Grafting of cultured microglial cells into the lesioned spinal cord of adult rats enhances neurite outgrowth. *J Neurosci Res* 47(1):34-48.

- Re F, Belyanskaya SL, Riese RJ, Cipriani B, Fischer FR, Granucci F, Ricciardi-Castagnoli P, Brosnan C, Stern LJ, Strominger JL and others. 2002. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces an expression program in neonatal microglia that primes them for antigen presentation. *J Immunol* 169(5):2264-73.
- Reis e Sousa C, Germain RN. 1995. Major histocompatibility complex class I presentation of peptides derived from soluble exogenous antigen by a subset of cells engaged in phagocytosis. *J Exp Med* 182(3):841-51.
- Rock RB, Gekker G, Hu S, Sheng WS, Cheeran M, Lokensgard JR, Peterson PK. 2004. Role of microglia in central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev* 17(4):942-64, table of contents.
- Rodriguez A, Regnault A, Kleijmeer M, Ricciardi-Castagnoli P, Amigorena S. 1999. Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat Cell Biol* 1(6):362-8.
- Sanderson S, Shastri N. 1994. LacZ inducible, antigen/MHC-specific T cell hybrids. *Int Immunol* 6(3):369-76.
- Santambrogio L, Belyanskaya SL, Fischer FR, Cipriani B, Brosnan CF, Ricciardi-Castagnoli P, Stern LJ, Strominger JL, Riese R. 2001. Developmental plasticity of CNS microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(11):6295-300.
- Shen L, Rock KL. 2006. Priming of T cells by exogenous antigen cross-presented on MHC class I molecules. *Curr Opin Immunol* 18(1):85-91.
- Walker PR, Calzascia T, Schnuriger V, Scamuffa N, Saas P, de Tribolet N, Dietrich PY. 2000. The brain parenchyma is permissive for full antitumor CTL effector function, even in the absence of CD4 T cells. *J Immunol* 165(6):3128-35.
- Walker WS, Gatewood J, Olivás E, Askew D, Havenith CE. 1995. Mouse microglial cell lines differing in constitutive and interferon-gamma-inducible antigen-presenting activities for naive and memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *J Neuroimmunol* 63(2):163-74.
- Watts C. 1997. Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu Rev Immunol* 15:821-50.
- Wick W, Naumann U, Weller M. 2006. Transforming growth factor-beta: a molecular target for the future therapy of glioblastoma. *Curr Pharm Des* 12(3):341-9.
- Yewdell JW, Bennink JR. 1999. Immunodominance in major histocompatibility complex class I-restricted T lymphocyte responses. *Annu Rev Immunol* 17:51-88.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 : Phenotype and morphology of microglial cells. a) Flow cytometric analysis of C8-B4, neonatal microglia and adult microglia, stained for the indicated markers (white histograms) or with corresponding isotype control mAbs (grey histograms). b) Phase contrast photomicrograph of the three microglial types (magnification : x 200, bar = 20 μ m)

Figure 2 : Ovalbumin cross-presentation by microglia. C8-B4 cells (\star), neonatal microglial cells (\bullet), adult primary microglial cells (\boxtimes), peritoneal macrophages (ρ , positive control) and LB27.4 cells (\times , negative control) were pulsed with different concentrations of ovalbumin and used to stimulate the OVA-specific CD8⁺ T cell hybridoma. B3Z activation was monitored by quantifying the β -galactosidase activity. Results are expressed in stimulation index (SI ; n=4) as described in materials and methods.

Figure 3 : Microglia cross-present ovalbumin to naive OT-1 CD8⁺ T cells. OVA-pulsed C8-B4 (\boxtimes), neonatal microglia (\boxtimes), adult microglia (\blacksquare) and peritoneal macrophages (\square) were incubated with naive OVA-specific CD8⁺ T cells from OT-1 mice. After 24h, IL-2 was quantified by ELISA in the supernatants. Results are expressed in ng/ml (mean \pm SD, n=3).

Figure 4: Microglia cross-present antigen in a TAP and proteasome dependent manner. a) C8-B4 cells, treated or not with lactacystin, were pulsed with OVA and used to stimulate OT-1 CD8⁺ T cells. b) Adult microglia from wild type (WT) and TAP^{-/-} mice were pulsed with ovalbumin and used to stimulate OT-1 CD8⁺ T cells. a & b, after 24h, IL2 concentration was determined by ELISA. Results are expressed in ng/ml, mean \pm SD, n=3.

Figure 5: Microglia cross-present antigen after antigen uptake *in vivo*. a) Mice were challenged with OVA intracerebrally and CD11b⁺ cells were purified. Their CD45 expression was analyzed by flow cytometry to discriminate between CD45^{low} quiescent microglia and CD45^{hi} peripheral APCs. b) Microglial cells from OVA-injected (“OVA-microglia”) or PBS-injected (“microglia”) brains were purified and immediately used to stimulate B3Z hybridoma. *means p<0.05.

Figure 6: Influence of GM-CSF and CpG on OVA cross-presentation by adult microglia. Primary adult microglia were pre-treated with GM-CSF and/or CpG, pulsed with OVA and incubated with OT-1 CD8⁺ T cells. T cell activation was assessed by measuring IL-2 in the supernatants. Results are expressed in ng/ml (mean \pm SD of 3 separate experiments). $p < 0.05$.

Les illustrations de cette partie sont consultables dans la partie Annexe de TEL, dans le fichier Figures Article2.ppt

Le groupe de Walker et collaborateurs (Walker *et al.*, 2000; Calzascia *et al.*, 2003) avait démontré que la présentation croisée pouvait être un mécanisme efficace dans le système nerveux central pour éliminer une tumeur, mais sans apporter de données concernant les cellules responsables de cette présentation croisée.

Par ce travail, nous montrons que les cellules microgliales (une lignée, les cellules néonatales et la microglie adulte) « cross-présentent » un antigène soluble et sont capables *in vitro* d'activer efficacement l'hybridome CD8⁺ B3Z ainsi que des lymphocytes T naïfs. Cette présentation croisée fait intervenir, comme pour les cellules dendritiques, le protéasome ainsi que le complexe TAP comme montré par l'utilisation d'un inhibiteur du protéasome ainsi que de cellules issues de souris déficientes en TAP.

Les trois types de cellules n'ont pas la même efficacité pour activer les lymphocytes T CD8⁺, ce qui pourrait s'expliquer par leur état d'activation respectif. La ligne C8-B4 est ainsi constitutivement activée et exprime les molécules du CMH cl.I et II ainsi que CD80 et 86, ce qui peut expliquer leur plus grande performance. Les cellules néonatales ont quant à elle un niveau intermédiaire d'activation (CMH cl.II, CMH cl.I⁺, CD86⁻, CD80⁺) mais sont quasiment aussi efficaces que la lignée. Une caractéristique des cellules microgliales néonatales est leur grande capacité à phagocyter les antigènes ainsi que leur expression des récepteurs d'épuration qui peuvent leur permettre d'endocyter plus efficacement les antigènes ce qui expliquerait leurs performances. Quant aux cellules adultes, malgré un processus d'isolement assez long, elles sont restées quiescentes ce qui est en corrélation avec leur plus faible capacité à présenter les antigènes. D'autre part, les cellules microgliales sont hétérogènes et l'existence de sous-populations a été suggérée par l'obtention de clones de cellules morphologiquement et phénotypiquement distincts à partir de cellules du cerveau de souris saines cultivées en présence de M-CSF ou de GM-CSF (Walker *et al.*, 1995; Kanzawa *et al.*, 2000). Ainsi, les résultats obtenus pourraient ne représenter que l'activité d'une sous-population parmi toutes les cellules isolées.

En injectant de l'ovalbumine dans le cerveau des souris, nous avons également montré que les cellules microgliales, malgré le microenvironnement particulier du parenchyme nerveux, étaient capables *in vivo* de capturer, apprêter et présenter l'antigène dans le contexte des molécules du CMH cl.I. La présentation croisée peut aboutir soit à l'activation des lymphocytes T ou à leur déplétion ce qui dépend de la cellule présentatrice d'antigène, du contexte cytokinique ou encore de la nature de l'antigène (Heath et Carbone, 2001). Dans le cerveau, les conséquences de cette présentation croisée ne sont pas encore connues à l'heure actuelle.

Les cellules microgliales quiescentes sont peu efficaces pour présenter les antigènes. En revanche, après activation, elles deviennent capables d'activer les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ (Mack *et al.*, 2003; Ponomarev *et al.*, 2006). L'IFN γ est fréquemment utilisé pour favoriser les fonctions de présentation antigénique de la microglie même si certaines équipes ont montré que cette seule stimulation n'était pas suffisante (Matyszak *et al.*, 1999). D'un autre côté, la présentation croisée par les cellules dendritiques est augmentée par les oligodéoxynucléotides CpG par l'intermédiaire des IFN de type I (Lapenta *et al.*, 2006). Cet agoniste du TLR9 est également efficace pour activer les cellules microgliales et potentialise leur fonction de présentation antigénique (Dalpke *et al.*, 2002). Mais la stimulation de la microglie adulte par ces divers stimuli n'a pas permis d'augmenter leur capacité de présentation croisée.

Plusieurs travaux ont montré que le GM-CSF entraînait la différenciation des cellules microgliales en cellule type dendritique et améliorait leur capacité à présenter les antigènes (Fischer *et al.*, 1993; Fischer et Reichmann, 2001; Santambrogio *et al.*, 2001). La combinaison entre GM-CSF et CpG a significativement augmenté leur efficacité pour activer les lymphocytes T CD8⁺, montrant la possibilité de potentialiser encore cette fonction de présentation croisée chez la microglie adulte.

A l'heure actuelle, les traitements pour les tumeurs cérébrales sont limités et l'immunothérapie représente une voie prometteuse pour éliminer ces tumeurs très agressives. En particulier il serait très intéressant de tester la capacité de présentation croisée de cellules microgliales infiltrant une tumeur cérébrale et soumises à un traitement local par du GM-CSF et des CpG-ODN. La démonstration que la microglie est capable de présenter les antigènes exogènes dans le CMH cI.I ouvre ainsi de nouvelles perspectives dans la mise en place de thérapies antigènes spécifiques au sein du système nerveux central.

TROISIEME PUBLICATION

Evaluation of brain tumors immunotherapy combining regulatory T cells depletion and CpG-ODN injection.

Sabrina Donnou, Ulrich Jarry and Dominique Couez.

Article en préparation.

Les tumeurs cérébrales sont parmi les plus agressives de l'organisme. Elles tirent en effet parti du statut immunologique particulier du système nerveux central, notamment son isolement relatif par la barrière hémato-encéphalique, et sont également caractérisées par leur grande capacité à infiltrer le tissu sain, ce qui les rend extrêmement difficiles à traiter par les thérapies conventionnelles (Proescholdt *et al.*, 2001). L'immunothérapie offre donc des possibilités très intéressantes, d'autant plus que le cerveau possède son propre réseau de cellules immunocompétentes résidentes : la microglie (Aloisi, 2001). Infiltrant largement les tumeurs cérébrales (Strik *et al.*, 2004), ces cellules, comme les autres cellules présentatrices d'antigènes de l'organisme, savent endocyter ou phagocyter les antigènes, les préparer et les associer aux molécules du CMH cI.I ou II, sécréter des cytokines, des chimiokines et ainsi organiser au mieux la réponse immunitaire locale (Gehrmann *et al.*, 1995; Hanisch, 2002; Hussain *et al.*, 2006a; Hussain *et al.*, 2006b). Il paraîtrait donc intéressant d'utiliser tout le potentiel de ces cellules face à la tumeur (Mariani *et al.*, 2006) tout en réussissant à recruter le système immunitaire périphérique de façon précoce. Cependant, toutes ces cellules seront soumises non seulement à l'immunosuppression constitutive du système nerveux central mais aussi à celle générée par la tumeur (Gomez et Kruse, 2006). Ainsi, il faudrait réussir à lever au moins en partie cette immunosuppression pour espérer combattre efficacement les tumeurs cérébrales.

Dans ce sens, les agonistes des TLR sont très prometteurs. Appartenant à une famille très conservée, les TLR reconnaissent certains motifs communs des microorganismes tels que les peptidoglycanes de la paroi bactérienne, la flagelline ou encore le matériel génétique des virus et bactéries (Akira, 2003). Les oligodéoxynucléotides contenant des motifs CpG non méthylés (CpG-ODN), agonistes du TLR9, sont particulièrement attractifs car ils activent quasiment toutes les cellules immunes ainsi que les cellules nerveuses et favorisent une réponse de type cellulaire (Weiner, 2000; Carpentier *et al.*, 2003). Ils ont ainsi déjà été utilisés avec succès, surtout en tant qu'adjuvants, dans le traitement de diverses tumeurs expérimentales et sont en évaluation clinique (Meng *et al.*, 2005; Carpentier *et al.*, 2006).

Les lymphocytes T régulateurs participent aussi à l'immunosuppression de la plupart des tumeurs en inhibant l'activation des lymphocytes T spécifiques des auto-antigènes tumoraux (Wang, 2006b). L'injection d'anticorps anti-CD25 permet de les dépler au moins fonctionnellement de façon temporaire et a permis de faire régresser certaines tumeurs périphériques (Onizuka *et al.*, 1999; Knutson *et al.*, 2006). Par contre, leur implication dans l'échappement des tumeurs cérébrales n'était pas connue au début de ce travail. Après avoir mis en place et caractérisé deux modèles de tumeurs plus ou moins immunogènes implantées

par stéréotaxie dans le cerveau de souris adultes, nous avons évalué l'effet de la déplétion des lymphocytes T régulateurs sur le développement des tumeurs. Afin de potentialiser la réponse obtenue, nous avons combiné cette déplétion avec l'injection locale de CpG-ODN et avons comparé le résultat de cette thérapie sur les mêmes tumeurs implantées dans le flanc des animaux.

EVALUATION OF BRAIN TUMORS IMMUNOTHERAPY COMBINING
REGULATORY T CELLS DEPLETION AND CpG-ODN INJECTION.

Sabrina DONNOU, Ulrich JARRY and Dominique COUEZ*

INSERM U564, 4 rue Larrey, Bâtiment Montclair, 49033 Angers CEDEX 01

Running title : Treg depletion and CpG-ODN treatment against brain tumors

Number of figures : 4

* to whom correspondence should be addressed : Dominique Couez, INSERM U564, CHU, 4,
rue Larrey, F-49033 Angers, France. E-mail address: dominique.couez@univ-angers.fr

Key words: active non specific immunotherapy, central nervous system, CpG-ODN,
Treg

ABSTRACT :

Brain tumors are often difficult to treat due at least to high infiltrative properties. Immunotherapy thus seems a promising approach to fight these aggressive cancers. Non specific active immunotherapy strategies are interesting because they avoid the choice of a specific target tumoral antigen that are not well defined for cerebral malignancies. Regulatory T cells (Treg) generated in the thymus or by peripheral mechanisms have often been demonstrated to favour tumor immune escape. We first characterized two tumor models implanted in the brain of normal adult mice and evaluated consequences of Treg depletion on their growth. We showed either a net benefit or no clear effect depending on the aggressiveness of the tumor. To increase immune responses, we co-injected phosphorothioate oligodeoxynucleotides (CpG-ODN) in the tumor bed. Despite an ameliorated survival time in mice bearing the less aggressive tumor, this treatment wasn't synergistic with Treg depletion. All our results suggest that a more drastic treatment should be developed to fight poorly immunogenic brain tumors or to cure totality of animals bearing more immunogenic tumors.

INTRODUCTION

Cerebral tumors are hidden in a constitutively immunosuppressed site, behind the blood-brain barrier. Their highly infiltrative behavior renders conventional treatments such as surgery, chemotherapy or radiotherapy either ineffective or on the contrary dangerous for healthy tissue. However, despite a particular immune status, the immune system is not absent from the brain parenchyma and local microglial cells can assume different functions including antigen phagocytosis and processing, antigen presentation to T lymphocytes, secretion of pro-inflammatory or anti-inflammatory factors, secretion of chemokines to recruit peripheral immune system and also neuroprotective functions (Aloisi, 2001; Hanisch, 2002; Mack *et al.*, 2003; Nakajima et Kohsaka, 2004; Streit *et al.*, 2005). Active immunotherapy could thus be a new interesting way to cure cerebral malignancies by specifically targeting malignant cells and not healthy neuronal cells and by generating an immunological memory. But a great attention must be taken by the fact that in the context of a growing tumor, constitutive immunosuppression of the cerebral parenchyma is reinforced by immunosuppressive factors secreted by tumor cells such as PGE₂, TGFβ or IL-10 (Gomez et Kruse, 2006). It would thus be imperative to reverse this environment to allow an efficient reactivation of the immune system.

Toll-like receptors (TLRs) are innate immune receptors, homologues of Toll receptor in *Drosophila*, that recognize conserved pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) expressed by a lot of micro-organisms (Akira *et al.*, 2001). TLRs are mainly found on innate immune cells, likely to be the first to encounter pathogens, but are also found on many other cell types (Visintin *et al.*, 2001; Bellocchio *et al.*, 2004; Olson et Miller, 2004). To date, at least 10 different TLRs have been described and recognize different classes of PAMPs (Kaisho et Akira, 2004): TLR2 after dimerization with either TLR1 or TLR6 allows for the recognition of bacterial lipoproteins, TLR3 recognize double stranded RNAs, TLR4 is the receptor for lipopolysaccharide, TLR5 is implicated in flagellin detection, TLR7 and 8 recognize viral single stranded RNA and TLR9 binds to non methylated CpG motifs found in bacterial and viral DNA. TLR10 agonists are not known. CpG-ODN, synthetic form of the TLR9 agonists, allow the activation of many cell types including microglia (Dalpke *et al.*, 2002), monocyte/macrophages family (Visintin *et al.*, 2001), dendritic cells (Hoshino *et al.*, 2002), NK cells (Sivori *et al.*, 2006) or even lymphocytes (Rothenfusser *et al.*, 2001; Heit *et al.*, 2005; Montoya *et al.*, 2006) and favour their acquisition of a pro-inflammatory phenotype. As such, they have been successfully tested in anti-tumor immunotherapy and

seem to represent efficient adjuvant (Heckelsmiller *et al.*, 2002; Meng *et al.*, 2005; Brown *et al.*, 2006).

Another possible source of tumor escape is brought by suppressive cells, especially regulatory T cells (Terabe et Berzofsky, 2004). Characterized by expression of CD4 and CD25, they also express the transcription factor FoxP3 and are able to suppress activation of “conventional” CD8⁺ T lymphocytes by direct contact or via inhibitory cytokines (Beissert *et al.*, 2006; Mempel *et al.*, 2006). Their implication in the tolerance against tumors is now widely recognized (Sakaguchi, 2005; Wang, 2006) and their depletion is thus a very promising way to enhance anti-tumor responses, as has been shown by numerous studies (Onizuka *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 2002; Knutson *et al.*, 2006).

In this work, we evaluated the efficiency of a treatment combining regulatory T cell depletion and CpG-ODN injection in two tumor models presenting different aggressiveness implanted in the brain of C57Bl/6 mice. For comparison, this treatment was also applied on the same cells implanted subcutaneously.

MATERIALS AND METHODS

Animals

C57BL/6J mice were purchased from Charles River laboratories (France), bred in our animal facilities under specific pathogen-free conditions and were manipulated according to institutional guidelines. They were used between 6 and 12 weeks of age.

Cells

E.G7-OVA (Moore *et al.*, 1988) is derived from EL4 cell line (resulting from T lymphoma induced by 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene), transfected by electroporation with pAc-neo-OVA plasmid to express chicken ovalbumin. Cells, kindly provided by Pr P. Jeannin, were grown in RPMI supplemented with 10 % heat inactivated FBS (fetal bovine serum), 1mM sodium pyruvate, 10mM HEPES (N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)), 2mM L-Glutamin, 25 nM non essentials amino acid and 0.5 mg.mL⁻¹ G418.

B16F10_{GP33-41}, kindly provided by Dr D. Klatzmann, is an adherent melanoma cell line transfected to express the peptide 33-41 of the glycoprotein of LCMV (lymphocytic choriomeningitis virus). Cells were grown in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplemented with 10 % heat inactivated FBS.

CpG ODN injection and Treg depletion :

Cytosin-guanosin (CpG) oligodeoxynucleotide 1826 was previously described as a specific ligand of TLR9 (Yi and Krieg, 1998). CpG 1826, purified single-stranded phosphorothioate oligodeoxynucleotides of sequence “TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT”, was purchased from MWG-biotech. The same oligodeoxynucleotide without CG sequences (TCC ATG AGC TTC CTG AGC TT) served as a negative control.

Depletion of regulatory T cells was performed by injecting 100µg of PC61 antibody in the peritoneal cavity of adult mice. As a control, mice received the same volume of PBS or an irrelevant antibody.

Tumor implantation :

For cerebral implantation, mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine 10 mg/mL and xylazine 0.1 mg/mL (10 µL per gram) and were placed in a stereotactic frame (David KOPF instruments). The animal underwent a delicate injection (0.5

$\mu\text{L}/\text{min}$) of 3 μL of solution (sterile PBS, 2×10^3 tumoral cells and/or 10 μg CpG) with a Hamilton syringe, 2mm on the right of the medial suture and 0,5mm in front of the Bregma at a depth of 2,5mm. Syringe was held in place for a additional minute and was slowly removed to avoid backfilling of the solution.

For peripheral injection, 2.10^5 cells were injected subcutaneously in the right flank of anesthetized animals in a final volume of 50 μL .

Antibodies

Anti-CD16/CD32 (clone 2.4G2, rat IgG2b), biotin anti-CD80 (clone 16-10A1, hamster IgG) biotin anti-CD86 (clone GL1, rat IgG2a) mAbs were from BD-Pharmingen (Le Pont de Claix, France). PE- or biotin-anti-CD4 (clone RM4-5, rat IgG2a), biotin-anti-CD8 α (clone 53-6.7, rat IgG2a), biotin-anti-CD11b (clone M1/70, rat IgG2b), biotin anti-CD11c (clone N418, hamster IgG), biotin anti-CD19 (clone MB19-1, mouse IgA), biotin-anti-CD25 (clone 7D4 or clone PC61.5, rat IgG1), biotin-anti-CD45 (clone 30-F11, rat IgG2b), biotin anti-NK (clone DX5, rat IgM), biotin anti-Gr1 (clone RB6-8C5, rat IgG2b), biotin anti H-2Db (clone 28-14-8, mouse IgG2a), biotin anti-I-Ab (clone M5/114.15.2, rat IgG2b), and all corresponding isotype controls were from e-Biosciences (San Diego, USA). Biotin anti-CD3 (clone 145-2C11, Hamster IgG) was from Southern Biotech (Birmingham, USA).

Flow cytometric analysis:

Cells were incubated at 4°C for 30 minutes with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of indicated primary mAb, after Fc receptor saturation by 20 min incubation with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of anti-CD16/CD32 mAb. Isotype-matched species specific mAbs were used as controls. Cells were then washed and further stained where needed for 20 min at 4°C with Cy-Chrome-conjugated streptavidin (1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, BD-Pharmingen). After extensive washing, cells were gated according to scatter characteristics, and FACScalibur analyses were performed with the CellQuest (Becton Dickinson) software.

Immunohistochemistry :

Mice were euthanized by anaesthetics overdose. Central nervous system (CNS) was snap-frozen in isopentan prechilled with nitrogen, embedded in Tissue Tek and serially sectioned at 10 μm in a cryostat. For immunochemistry stainings, slides were defrosted, fixed during 5 minutes in absolute ethanol, saturated 30 min with 10% normal mouse serum and incubated at

4°C overnight with 10 µg/mL biotin-coupled mAb diluted in 4% BSA. Isotype-matched species specific mAbs were used as controls. Slides were then washed and incubated 15 min with PBS containing 0.3% H₂O₂ to inactivate endogenous peroxydase. Revelation was made with Avidin–biotin-peroxydase complex (Vectastain ABC kit, Vector, Burlingame, USA) and 5 to 8 min incubation with a Tris solution containing 0,4mg/mL DAB, 0,03% H₂O₂ and 2,5% NiCl.

Magnetic Resonance Imaging :

Experiments were performed with a Brucker Avance DRX300 equipped with a vertical superwide-bore magnet and shielded gradient insert. Brains of animals bearing an intracranial tumor were analysed 7, 10, 12, 14 and 17 days after tumor cell implantation. For E.G7 model, gadolinium diethyl-anatriaminepenta-acetic acid was used as a contrasting agent and was injected intravenously 5 minutes before analysis.

RESULTS

development and analysis of the two tumor models :

In order to better appreciate effects of our treatments, we first characterized our two tumor models. After injection of 2000 cells in the right striatum of the mice, we observed no behavioural changes of the animals until two days before their death, that was correlated with a rapid loss of weight. We thus used this weight indication to euthanize mice during all experiments. Follow up of the tumoral development by MRI showed no sign of tumor mass until day 12 for B16-F10 melanoma and day 15 for E.G7 (Figure 1) and a subsequent very rapid increase in the tumor volume resulting in the death of the animals on average day 16 for B16-F10 and day 22 for E.G7. Both tumor types developed exclusively in the right hemisphere without invasion of the ventricular system and occasionally reached the surface of the brain. No metastases were ever observed in the cervical lymph nodes, lungs or intestinal tracts.

Cerebral malignancies grow behind the blood brain barrier, that restrict infiltration of peripheral immune cells. We thus analysed by immunohistochemistry the immune cells associated with our two tumor models at the end of the tumor development.

Photomicrographs figure 2 show results obtained with the E.G7 model. We observed a very strong CD45 staining associated with strong CD11b, CD11c, MHC I, CD4 and MHC II stainings. There was only weak staining with anti-CD80 and anti-CD86 antibodies and few Gr1⁺ cells could also be detected. For each of these antibodies, staining was absolutely restricted to the tumor mass and didn't concerned the rest of the brain parenchyma (not shown). By contrast, no CD19⁺, CD3⁺, CD8⁺ or CD25⁺ cells were ever detected (results are summarized in table 1). Concerning the B16-F10 model, infiltration was very poor (see table 1) and only very few cells were observed, quite often in close proximity with blood vessels or in the haemorrhagic zones, and preferentially at the periphery of the tumor (data not shown). CD11b⁺ cells were the most represented immune cells. As for E.G7, no significant staining was observed outside of the tumor mass.

Effect of Treg depletion on the intracerebral tumor growth :

Regulatory T cells (Tregs) are implicated in the peripheral tolerance of T cells against self antigens, but can be deleterious during cancer development by inhibiting specific T cell responses (Sakaguchi, 2005; Mempel *et al.*, 2006; Wang, 2006). Their depletion has therefore been shown to be beneficial to fight some peripheral malignancies (Onizuka *et al.*, 1999;

Knutson *et al.*, 2006). To see if they contribute to immune escape of our two models, we injected depleting PC61 (anti-CD25) antibodies in mice peritoneum and studied the consequences on the tumor development. As shown in figure 3A, application of the antibody resulted in a significant reduction in the number of CD4⁺ CD25⁺ T cells. We then first determined the optimal time for Treg depletion and showed that injection of the antibody ten days before tumor implantation gave best results (not shown). When practiced in these conditions, Treg depletion resulted in a marked effect on the E.G7 tumor, allowing 80% of mice to reject their tumor (Figure 3B). On the contrary, this treatment didn't significantly improved survival time of mice bearing the B16-F10 tumor, with on the best cases an improvement of the survival time of 10 to 15% of some mice (Figure 3B).

Combination of Treg depletion and CpG-ODN injection :

Our results thus show that Treg depletion alone is not sufficient to eliminate a cerebral tumor. Indeed, the cerebral parenchyma is characterized by an immunosuppressed environment and we reasoned that to enhance the local immune response and allow antigen presenting cells to mature, it should be necessary to fight this immunosuppression. One of the best way to activate all arms of innate and adaptive immune system is to engage the TLRs (Akira *et al.*, 2001). CpG-ODN (TLR9 agonists) especially, are able to activate quite all immune cells including microglia that constitutively express the TLR9 (Weiner, 2000; Dalpke *et al.*, 2002). We therefore evaluated a therapy combining Treg depletion and CpG-ODN local application and compared results obtained for peripheral and cerebral tumor localizations. As illustrated figure 4A, when this treatment was applied on subcutaneous E.G7 cells, all treated mice rejected the tumor. It also led to a delay in the B16-F10 subcutaneous tumor growth but mice bearing these cells invariably succumbed from their cancer.

By comparison, results obtained in the brain were less evident. Concerning the melanoma, the treatment was not sufficient to fight this aggressive tumor (data not shown). For the E.G7 cells, 80% of treated mice rejected the tumor, but the combined treatment didn't improved the survival time of mice treated by Treg depletion alone (Figure 4B). However, CpG-ODN had a positive effect on the antitumoral immune response, allowing a 30% increase in the overall survival time but also a rejection of the tumor in 30% of the mice treated by this component alone (Figure 4B). All the mice that survived were re-challenged with E.G7 cells but remained tumor free during all the experiment time (120 days, data not shown).

DISCUSSION

In this study, we showed that a treatment combining Treg and CpG-ODN injection allowed or not to cure majority of mice bearing intracranial tumors with moderate or high aggressiveness respectively.

We developed two models of intracranial tumors with different aggressiveness to compare the efficiency of our treatment. The very aggressive melanoma B16-F10 was characterized by a poor infiltration with cells of the immune system. Most of them were only found at the periphery of the tumor mass in close proximity with blood vessels. The B16-F10 tumor being haemorrhagic at least in the brain, these cells may represent non specific blood cells trapped in the blood stream. Microglial cells can occasionally be observed on the margins of tumor but are no more stained in the rest of the hemisphere or in the controlateral side. In agreement with this, the E.G7 model was also poorly infiltrated with peripheral immune cells and no CD3⁺, CD8⁺, CD25⁺, CD19⁺ or NK cells were observed. However, rare Gr1⁺ cells were scattered in the tumor mass and could represent myeloid suppressive cells that are often recruited by tumors. In the brain, GM-CSF can be secreted by astrocytes (Aloisi *et al.*, 1992; Fischer et Bielinsky, 1999) and allows the attraction of these myeloid cells that in the context of a tumor, adopt an immunosuppressive phenotype (Bronte *et al.*, 1999; Bronte *et al.*, 2000). The CD4 staining was not very strong and was not found on all tumor cells. Moreover, E.G7 cells at least *in vitro* don't express this marker (not shown) and it is thus probable that some microglial cells could be responsible for this expression (Alliot *et al.*, 1996; Dick *et al.*, 1997). We also observed a strong CD11c and MHC II staining. Given the fact that no other blood cells are present, it seems unlikely that only dendritic cells are recruited. On another hand, these two staining seemed to be colocalized with some CD11b⁺ cells most probably representing microglia known to be highly infiltrating cerebral tumors (Badie et Schartner, 2001; Hussain *et al.*, 2006). In these conditions, one might hypothesize that some microglial cells, under the influence of E.G7 secreted factor, hypothetically GM-CSF, could differentiate in dendritic cells. Indeed, some researchers have demonstrated that microglial cells cultivated in the presence of this cytokine were able to generate a population of dendritic like cells, but it has not been definitely proven *in vivo* (Fischer et Reichmann, 2001; Santambrogio *et al.*, 2001; Ponomarev *et al.*, 2005). Nevertheless, despite the presence of these dendritic cells that express MHC II, the tumor was not eliminated, suggesting that other factors direct the phenotype of the cells toward an immunosuppressive one. Candidates

will be IL-10, TGF- β , PGE₂ or a combination of these, known to be highly expressed in brain tumors (Gomez et Kruse, 2006). Moreover, there was no or very few CD80 and CD86 staining confirming that the local APCs were not able to generate an optimal costimulation signal and to efficiently activate T cells, as has been already shown by others (Badie *et al.*, 2002).

Tumors often use many ways to escape the immune response and this include the recruitment and generation of regulatory T lymphocytes (Nomura et Sakaguchi, 2005). These CD4⁺ CD25⁺ cells allow tolerance to self antigens, thus including tumor antigens, and are often over-represented in cancer patients (Woo *et al.*, 2002; Andaloussi et Lesniak, 2006; Fecci *et al.*, 2006). To study if they were implicated in tolerance against our two models, we depleted this population using well known PC61 antibody. This treatment led to a great increase in the survival time and 80% of mice rejecting the intracranial E.G7 tumor. On the contrary, there was no clear benefit of this treatment on the B16-F10 tumor, thus suggesting that depending on the aggressiveness of the tumor, benefits of Treg depletion will be translated or not in survival time increase. In the periphery, depletion of Treg is not sufficient to eliminate the B16-F10 tumor and must be coupled to other strategies such as IL-12 expression (Nagai *et al.*, 2004) and it is thus probable that such complementary strategies will be necessary to fight the same tumor located in the brain. Using glioma models, other groups obtained intermediate results with an overall increase in survival time but ultimately tumors that continued to grow (El Andaloussi *et al.*, 2006a). Nevertheless, all these results suggest that elimination of regulatory T cells has a positive effect to eliminate brain tumors, but is not sufficient to eradicate them. To complete this strategy, we choose to inject a pro-inflammatory mediator to convert the local immunosuppressive environment toward a pro-inflammatory one. TLR agonists are very efficient to activate innate immune cells including microglia but also T and B lymphocytes (Medzhitov et Janeway, 2000; Dalpke *et al.*, 2002; Akira, 2003; Kaisho et Akira, 2004; Olson et Miller, 2004; Caron *et al.*, 2005; Kielian, 2006). In particular, CpG-ODN have already been shown to be efficient adjuvants in diverse tumor models, justifying their evaluation in clinical protocols (Carpentier *et al.*, 2003; Carpentier *et al.*, 2006). We therefore tested a therapy combining Treg depletion and CpG-ODN injection on our two tumor models. We first analysed the consequence on the tumor implanted in periphery. For the most aggressive tumor model, we observed a delay in the tumor growth but all the mice ultimately died from the melanoma. With the E.G7 model, the treatment allowed all the mice to reject malignant cells, thus validating efficiency of this therapy. When the same experiment was performed on cells implanted in the brain, no clear significant benefit

was observed on the melanoma but 80% of mice bearing E.G7 cells were cured. This combined treatment did however not ameliorated results obtained with Treg depletion alone, suggesting that the two treatments were not synergistic. It is known that APCs activated by TLR agonists and notably CpG-ODN are able to inhibit the suppressive functions of regulatory T cells (Pasare et Medzhitov, 2003; von Boehmer, 2005) and as such our two treatments act by the same way. But given all the other activating mechanisms engaged by CpG-ODN, we were surprised to not ameliorate the median survival time of our mice. Nevertheless, CpG-ODN had positive effects because when used alone, they provoked a 30% increase in survival time and cured 30% of mice that received E.G7 cells. Interestingly, CpG-ODN injection also provoked a great increase in the number of infiltrating cells (not shown) that could explain the increased survival time. But the window of action of CpG-ODN is maybe too short to allow for a sustained infiltration, and several successive injections could be evaluated. Our results correlates quite well with those of Andaloussi and colleagues (2006b) working on a glioma model showing a significant increase in survival time by a single CpG-ODN injection. But in this study, they also demonstrated a direct toxic effect of CpG on glioma cells, that could explain their better results compared to our B16-F10 model. Carpentier and colleagues (2000) performed similar experiments in the rat and obtained nice results with, depending on the conditions tested, almost all the animals rejecting their glioma. Differences with our results could be due to species differences or different kind of CpG-ODN used. Indeed, there exist many different types of CpG-ODN that can harbour varying effects on the anti-tumor response (Carpentier *et al.*, 2003; Vollmer *et al.*, 2004). It would thus be interesting to test other CpG-ODN families or a combination of them.

In conclusion, our results show that combination of Treg depletion and a single CpG-ODN injection can have variable effects depending on the tumor aggressiveness. In all cases, it would be necessary to find another complementary way to increase the anti-tumor response to cure all the animals. One possibility would be to use other TLR agonists, such as Pam3Cys, that is able to reverse the suppressive phenotype of Tregs and favour a pro-inflammatory response (Sutmuller *et al.*, 2006a; Sutmuller *et al.*, 2006b). Another possibility is that no sufficient amounts of tumoral antigens are released to be efficiently taken up by antigen presenting cells. In this sense, it would be interesting to take advantage of our two models and to direct the immune response toward a given tumoral antigen by injecting the antigenic peptide or protein and to evaluate if it increases the anti-tumor response.

ACKNOWLEDGMENTS :

We are grateful to Pr. P. Jeannin for providing the E.G7 cell line, to Dr D. Klatzmann for the B16-F10gp33-41 cell line, and to Dr. B. Salomon for the depleting PC61 antibody. We thank F. Franconi and L. Lemaire for technical assistance with the magnetic resonance imaging, R. Filmon for confocal microscopy studies and P. Chiron for animal breeding assistance. This work was supported by the “ Ligue Contre le Cancer” (comité départemental de Maine et Loire). S. Donnou was funded by a fellowship from the “Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC)” and the Angers University.

REFERENCES

- Akira, S., 2003. Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 15, 5-11.
- Akira, S., Takeda, K., Kaisho, T., 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2, 675-680.
- Alliot, F., Marty, M.C., Cambier, D., Pessac, B., 1996. A spontaneously immortalized mouse microglial cell line expressing CD4. *Brain Res Dev Brain Res* 95, 140-143.
- Aloisi, F., 2001. Immune function of microglia. *Glia* 36, 165-179.
- Aloisi, F., Care, A., Borsellino, G., Gallo, P., Rosa, S., Bassani, A., Cabibbo, A., Testa, U., Levi, G., Peschle, C., 1992. Production of hemolymphopoietic cytokines (IL-6, IL-8, colony-stimulating factors) by normal human astrocytes in response to IL-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 149, 2358-2366.
- Andaloussi, A.E., Lesniak, M.S., 2006. An increase in CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in tumor-infiltrating lymphocytes of human glioblastoma multiforme. *Neuro-oncol* 8, 234-243.
- Badie, B., Bartley, B., Schartner, J., 2002. Differential expression of MHC class II and B7 costimulatory molecules by microglia in rodent gliomas. *J Neuroimmunol* 133, 39-45.
- Badie, B., Schartner, J., 2001. Role of microglia in glioma biology. *Microsc Res Tech* 54, 106-113.
- Beissert, S., Schwarz, A., Schwarz, T., 2006. Regulatory T cells. *J Invest Dermatol* 126, 15-24.
- Bellocchio, S., Moretti, S., Perruccio, K., Fallarino, F., Bozza, S., Montagnoli, C., Mosci, P., Lipford, G.B., Pitzurra, L., Romani, L., 2004. TLRs govern neutrophil activity in aspergillosis. *J Immunol* 173, 7406-7415.
- Bronte, V., Apolloni, E., Cabrelle, A., Ronca, R., Serafini, P., Zamboni, P., Restifo, N.P., Zanovello, P., 2000. Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells. *Blood* 96, 3838-3846.
- Bronte, V., Chappell, D.B., Apolloni, E., Cabrelle, A., Wang, M., Hwu, P., Restifo, N.P., 1999. Unopposed production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by tumors inhibits CD8+ T cell responses by dysregulating antigen-presenting cell maturation. *J Immunol* 162, 5728-5737.
- Brown, L., Roda, J., Terrell, C., Chaudhury, A.R., Crespin, T., Carson, W.E., Lesinski, G.B., 2006. Interferon alpha and CPG oligodeoxynucleotides elicit additive immunostimulatory and antitumor effects. *Surgery* 140, 297-306.

- Caron, G., Duluc, D., Fremaux, I., Jeannin, P., David, C., Gascan, H., Delneste, Y., 2005. Direct stimulation of human T cells via TLR5 and TLR7/8: flagellin and R-848 up-regulate proliferation and IFN-gamma production by memory CD4+ T cells. *J Immunol* 175, 1551-1557.
- Carpentier, A., Laigle-Donadey, F., Zohar, S., Capelle, L., Behin, A., Tibi, A., Martin-Duverneuil, N., Sanson, M., Lacomblez, L., Taillibert, S., Puybasset, L., Van Effenterre, R., Delattre, J.Y., Carpentier, A.F., 2006. Phase 1 trial of a CpG oligodeoxynucleotide for patients with recurrent glioblastoma. *Neuro-oncol* 8, 60-66.
- Carpentier, A.F., Auf, G., Delattre, J.Y., 2003. CpG-oligonucleotides for cancer immunotherapy : review of the literature and potential applications in malignant glioma. *Front Biosci* 8, e115-127.
- Carpentier, A.F., Xie, J., Mokhtari, K., Delattre, J.Y., 2000. Successful treatment of intracranial gliomas in rat by oligodeoxynucleotides containing CpG motifs. *Clin Cancer Res* 6, 2469-2473.
- Dalpke, A.H., Schafer, M.K., Frey, M., Zimmermann, S., Tebbe, J., Weihe, E., Heeg, K., 2002. Immunostimulatory CpG-DNA activates murine microglia. *J Immunol* 168, 4854-4863.
- Dick, A.D., Pell, M., Brew, B.J., Foulcher, E., Sedgwick, J.D., 1997. Direct ex vivo flow cytometric analysis of human microglial cell CD4 expression: examination of central nervous system biopsy specimens from HIV-seropositive patients and patients with other neurological disease. *Aids* 11, 1699-1708.
- El Andaloussi, A., Han, Y., Lesniak, M.S., 2006a. Prolongation of survival following depletion of CD4+CD25+ regulatory T cells in mice with experimental brain tumors. *J Neurosurg* 105, 430-437.
- El Andaloussi, A., Sonabend, A.M., Han, Y., Lesniak, M.S., 2006b. Stimulation of TLR9 with CpG ODN enhances apoptosis of glioma and prolongs the survival of mice with experimental brain tumors. *Glia* 54, 526-535.
- Fecci, P.E., Mitchell, D.A., Whitesides, J.F., Xie, W., Friedman, A.H., Archer, G.E., Herndon, J.E., 2nd, Bigner, D.D., Dranoff, G., Sampson, J.H., 2006. Increased regulatory T-cell fraction amidst a diminished CD4 compartment explains cellular immune defects in patients with malignant glioma. *Cancer Res* 66, 3294-3302.
- Fischer, H.G., Bielinsky, A.K., 1999. Antigen presentation function of brain-derived dendriform cells depends on astrocyte help. *Int Immunol* 11, 1265-1274.
- Fischer, H.G., Reichmann, G., 2001. Brain dendritic cells and macrophages/microglia in central nervous system inflammation. *J Immunol* 166, 2717-2726.
- Gomez, G.G., Kruse, C.A., 2006. Mechanisms of malignant glioma immune resistance and sources of immunosuppression. *Gene Ther Mol Biol* 10, 133-146.
- Hanisch, U.K., 2002. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 40, 140-155.

- Heckelsmiller, K., Beck, S., Rall, K., Sipos, B., Schlamp, A., Tuma, E., Rothenfusser, S., Endres, S., Hartmann, G., 2002. Combined dendritic cell- and CpG oligonucleotide-based immune therapy cures large murine tumors that resist chemotherapy. *Eur J Immunol* 32, 3235-3245.
- Heit, A., Schmitz, F., O'Keeffe, M., Staib, C., Busch, D.H., Wagner, H., Huster, K.M., 2005. Protective CD8 T cell immunity triggered by CpG-protein conjugates competes with the efficacy of live vaccines. *J Immunol* 174, 4373-4380.
- Hoshino, K., Kaisho, T., Iwabe, T., Takeuchi, O., Akira, S., 2002. Differential involvement of IFN-beta in Toll-like receptor-stimulated dendritic cell activation. *Int Immunol* 14, 1225-1231.
- Hussain, S.F., Yang, D., Suki, D., Aldape, K., Grimm, E., Heimberger, A.B., 2006. The role of human glioma-infiltrating microglia/macrophages in mediating antitumor immune responses. *Neuro-oncol* 8, 261-279.
- Kaisho, T., Akira, S., 2004. Pleiotropic function of Toll-like receptors. *Microbes Infect* 6, 1388-1394.
- Kielian, T., 2006. Toll-like receptors in central nervous system glial inflammation and homeostasis. *J Neurosci Res* 83, 711-730.
- Knutson, K.L., Dang, Y., Lu, H., Lukas, J., Almand, B., Gad, E., Azeke, E., Disis, M.L., 2006. IL-2 immunotoxin therapy modulates tumor-associated regulatory T cells and leads to lasting immune-mediated rejection of breast cancers in neu-transgenic mice. *J Immunol* 177, 84-91.
- Mack, C.L., Vanderlugt-Castaneda, C.L., Neville, K.L., Miller, S.D., 2003. Microglia are activated to become competent antigen presenting and effector cells in the inflammatory environment of the Theiler's virus model of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 144, 68-79.
- Medzhitov, R., Janeway, C., Jr., 2000. The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol* 8, 452-456.
- Mempel, T.R., Pittet, M.J., Khazaie, K., Weninger, W., Weissleder, R., von Boehmer, H., von Andrian, U.H., 2006. Regulatory T cells reversibly suppress cytotoxic T cell function independent of effector differentiation. *Immunity* 25, 129-141.
- Meng, Y., Carpentier, A.F., Chen, L., Boisserie, G., Simon, J.M., Mazon, J.J., Delattre, J.Y., 2005. Successful combination of local CpG-ODN and radiotherapy in malignant glioma. *Int J Cancer* 116, 992-997.
- Montoya, C.J., Jie, H.B., Al-Harhi, L., Mulder, C., Patino, P.J., Rugeles, M.T., Krieg, A.M., Landay, A.L., Wilson, S.B., 2006. Activation of plasmacytoid dendritic cells with TLR9 agonists initiates invariant NKT cell-mediated cross-talk with myeloid dendritic cells. *J Immunol* 177, 1028-1039.
- Moore, M.W., Carbone, F.R., Bevan, M.J., 1988. Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation. *Cell* 54, 777-785.

- Nagai, H., Horikawa, T., Hara, I., Fukunaga, A., Oniki, S., Oka, M., Nishigori, C., Ichihashi, M., 2004. In vivo elimination of CD25⁺ regulatory T cells leads to tumor rejection of B16F10 melanoma, when combined with interleukin-12 gene transfer. *Exp Dermatol* 13, 613-620.
- Nakajima, K., Kohsaka, S., 2004. Microglia: neuroprotective and neurotrophic cells in the central nervous system. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 4, 65-84.
- Nomura, T., Sakaguchi, S., 2005. Naturally arising CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in tumor immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* 293, 287-302.
- Olson, J.K., Miller, S.D., 2004. Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol* 173, 3916-3924.
- Onizuka, S., Tawara, I., Shimizu, J., Sakaguchi, S., Fujita, T., Nakayama, E., 1999. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res* 59, 3128-3133.
- Pasare, C., Medzhitov, R., 2003. Toll pathway-dependent blockade of CD4⁺CD25⁺ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 299, 1033-1036.
- Ponomarev, E.D., Novikova, M., Maresz, K., Shriver, L.P., Dittel, B.N., 2005. Development of a culture system that supports adult microglial cell proliferation and maintenance in the resting state. *J Immunol Methods*.
- Rothenfusser, S., Hornung, V., Krug, A., Towarowski, A., Krieg, A.M., Endres, S., Hartmann, G., 2001. Distinct CpG oligonucleotide sequences activate human gamma delta T cells via interferon-alpha/-beta. *Eur J Immunol* 31, 3525-3534.
- Sakaguchi, S., 2005. Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 6, 345-352.
- Santambrogio, L., Belyanskaya, S.L., Fischer, F.R., Cipriani, B., Brosnan, C.F., Ricciardi-Castagnoli, P., Stern, L.J., Strominger, J.L., Riese, R., 2001. Developmental plasticity of CNS microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6295-6300.
- Sivori, S., Carlomagno, S., Moretta, L., Moretta, A., 2006. Comparison of different CpG oligodeoxynucleotide classes for their capability to stimulate human NK cells. *Eur J Immunol* 36, 961-967.
- Streit, W.J., Conde, J.R., Fendrick, S.E., Flanary, B.E., Mariani, C.L., 2005. Role of microglia in the central nervous system's immune response. *Neurol Res* 27, 685-691.
- Sutmuller, R.P., den Brok, M.H., Kramer, M., Bennink, E.J., Toonen, L.W., Kullberg, B.J., Joosten, L.A., Akira, S., Netea, M.G., Adema, G.J., 2006a. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J Clin Invest* 116, 485-494.
- Sutmuller, R.P., Morgan, M.E., Netea, M.G., Grauer, O., Adema, G.J., 2006b. Toll-like receptors on regulatory T cells: expanding immune regulation. *Trends Immunol* 27, 387-393.

- Tanaka, H., Tanaka, J., Kjaergaard, J., Shu, S., 2002. Depletion of CD4⁺ CD25⁺ regulatory cells augments the generation of specific immune T cells in tumor-draining lymph nodes. *J Immunother* 25, 207-217.
- Terabe, M., Berzofsky, J.A., 2004. Immunoregulatory T cells in tumor immunity. *Curr Opin Immunol* 16, 157-162.
- Visintin, A., Mazzoni, A., Spitzer, J.H., Wyllie, D.H., Dower, S.K., Segal, D.M., 2001. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol* 166, 249-255.
- Vollmer, J., Weeratna, R., Payette, P., Jurk, M., Schetter, C., Laucht, M., Wader, T., Tluk, S., Liu, M., Davis, H.L., Krieg, A.M., 2004. Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *Eur J Immunol* 34, 251-262.
- von Boehmer, H., 2005. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol* 6, 338-344.
- Wang, R.F., 2006. Immune suppression by tumor-specific CD4⁺ regulatory T-cells in cancer. *Semin Cancer Biol* 16, 73-79.
- Weiner, G.J., 2000. The immunobiology and clinical potential of immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides. *J Leukoc Biol* 68, 455-463.
- Woo, E.Y., Yeh, H., Chu, C.S., Schlienger, K., Carroll, R.G., Riley, J.L., Kaiser, L.R., June, C.H., 2002. Cutting edge: Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. *J Immunol* 168, 4272-4276.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 : MRI images of the two brain tumor models. Mice were analysed at days 7, 10, 12, 14 and 17 following tumor implantation for the presence of a tumoral mass. No tumors were visible until day 14 for B16-F10 and day 17 for E.G7 models. The haemorrhagic B16-F10 tumor appeared black whereas the E.G7 tumor needed contrasting agent injection and appeared yellow.

Figure 2 : immunohistochemical analysis of the immune response at the endpoint development of intracranial E.G7 tumor. Mice were euthanized and 10µm brain slices were stained with the indicated biotinylated antibodies. Inserts show control staining with appropriate isotype matched antibody. Magnification X100.

Figure 3 : Treg depletion with the PC61 antibody. (A) Mice received a single intraperitoneal injection of 100µg irrelevant or PC61 antibody and were euthanized five days thereafter. Splenocytes were then analyzed by flow cytometry for the presence of CD4⁺ CD25⁺ lymphocytes (encircled population). (B) Survival curve of mice bearing intracranial B16-F10 (black) or E.G7 (grey) tumors and treated (squares) or not (lines) with PC61 injection ten days before tumor implantation. n=7 mice per group.

Figure 4 : Effect of the combined treatment on B16-F10 and E.G7 growth. (A) Development of B16-F10 or E.G7 subcutaneous tumors in mice treated (squares) or not (lines) with PC61 antibody and CpG-ODN injection. Mice were assessed daily for the presence of a palpable tumor. n=3 mice per group, one representative result is shown. (B) Survival curve of mice bearing intracranial E.G7 tumor and treated or not with PC61 injection ten days before tumor implantation (circles), CpG-ODN injection the day of tumor implantation (squares) or both (full line). n=7 mice per group.

Table 1 : Assessment of immune cell infiltration in E.G7 and B16-F10 intracranial tumors at endpoint development. 10µm brain slices, at the approximate initial implantation site, were analysed by immunohistochemistry for the presence of the indicated cell markers. Five analyzed fields per marker.

Les illustrations de cette partie sont consultables dans la partie Annexe de TEL, dans le fichier Figures Article3.ppt

Les thérapies conventionnelles (chirurgie, chimio- ou radiothérapie), malgré tous les progrès réalisés dans ces domaines, restent relativement inefficaces pour éliminer les tumeurs cérébrales. Une immunothérapie active offre l'avantage de cibler spécifiquement les cellules tumorales, mêmes infiltrées à grande distance de la masse tumorale principale, tout en épargnant les cellules nerveuses et permet une mémoire immunologique pour éviter les récurrences.

Afin de mieux comprendre le développement de réponses anti-tumorales spécifiques d'antigènes dans le cerveau, nous avons développé deux modèles de tumeurs ayant une agressivité moyenne ou très forte (modèle E.G7-OVA ou B16-F10gp33-41), déjà bien caractérisées en périphérie et pour lesquelles divers outils ont été développés (antigène « tumoral » connu, souris transgéniques ayant des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de ces antigènes disponibles, tétramères permettant de détecter les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques). Après implantation intracérébrale, les deux tumeurs se développent rapidement et entraînent le décès des animaux dans un délai de 15 à 22 jours respectivement. L'analyse par immunohistochimie de la réponse immunitaire au terme de la maladie a révélé une infiltration très modeste, voire inexistante, par le système immunitaire périphérique. Dans les deux cas, les cellules microgliales sont les plus nombreuses, ce qui est en accord avec de précédents travaux (Proescholdt *et al.*, 2001; Strik *et al.*, 2004), et suggérerait que les tumeurs, en particulier le modèle E.G7 attirent ces cellules, comme cela a déjà été montré par ailleurs (Platten *et al.*, 2003). Dans ce modèle, de façon intéressante, un marquage CD11c et CMH cl.II est associé aux cellules microgliales, qui pourraient donc, sous l'influence d'un facteur sécrété par cette tumeur (le GM-CSF paraîtrait un candidat sérieux), dériver en cellule type dendritique (Fischer et Reichmann, 2001; Santambrogio *et al.*, 2001).

La déplétion des lymphocytes T régulateurs a donné des résultats variables en fonction du modèle : sur le modèle le plus agressif (B16-F10), cette seule déplétion n'a pas de conséquence significative sur la survie de l'animal. L'analyse immunohistochimique de la réponse immunitaire à des temps précoces devrait permettre de déterminer si juste après ce traitement quelques lymphocytes T cytotoxiques infiltrent quand même la tumeur. Concernant le modèle E.G7, 80% des animaux sont capables par ce seul traitement d'éliminer leur tumeur. Dans la mesure où cette tumeur dérive d'un thymome, nous nous sommes assurés au préalable par cytofluorométrie en flux ainsi que par immunohistochimie après implantation dans le cerveau de l'absence d'expression du récepteur CD25. Ces résultats confirment donc que les lymphocytes T régulateurs, bien que non détectables dans le cerveau, ont une

influence sur les réponses immunitaires locales (Schwartz et Kipnis, 2005; Yu *et al.*, 2005). Par ailleurs, nos résultats vont aussi dans le sens d'expériences réalisées sur des gliomes où ce traitement améliore le temps de survie des animaux sans toutefois les guérir (El Andaloussi *et al.*, 2006a), ce qui montre que selon l'agressivité et/ou l'immunogénicité de la tumeur, la déplétion des lymphocytes T régulateurs se traduira ou non par un bénéfice concernant la survie de l'animal.

En couplant cette déplétion à l'injection d'agents pro-inflammatoires comme les CpG-ODN, aucun changement n'a été observé quant à la survie des animaux porteurs de tumeurs intracérébrales. Pourtant, lorsque la même expérience est réalisée sur les tumeurs implantées en périphérie, toutes les souris rejettent la tumeur E.G7 et la croissance de la tumeur B16-F10 est retardée. Les CpG-ODN ont malgré tout un effet positif au moins sur le modèle E.G7 intracérébral puisque leur utilisation seule augmente le temps de survie des souris et provoque le rejet de la tumeur chez 30% de celles-ci, ce qui là aussi est en accord avec des études réalisées sur des gliomes (Carpentier *et al.*, 2000; El Andaloussi *et al.*, 2006b). De plus, tous les animaux survivants ont été re-soumis à l'injection de cellules tumorales en sous-cutané mais aucun n'a développé de tumeur, montrant donc qu'une mémoire immunitaire a été développée suite à notre traitement.

Nos résultats suggèrent donc que ces deux thérapies (injection de CpG-ODN et déplétion des cellules CD25⁺) ne permettent pas de cumuler leurs effets, ce qui pourrait s'expliquer par le fait que les CpG-ODN agissent aussi, comme les anticorps anti-CD25, sur l'inhibition de l'effet des lymphocytes T régulateurs (von Boehmer, 2005). Pourtant, étant donné leur large spectre d'action, les CpG-ODN auraient pu permettre une réponse immune plus efficace. Dans la mesure où différentes classes de CpG-ODN existent (Carpentier *et al.*, 2003), il serait intéressant d'évaluer d'autres oligodéoxynucléotides stimulants, voire un mélange de plusieurs oligodéoxynucléotides. De plus, il pourrait être bénéfique de les injecter à plusieurs reprises pour favoriser un recrutement massif d'effecteurs immunitaires à proximité de la tumeur. Une autre possibilité pour expliquer nos résultats serait que les antigènes tumoraux ne soient pas assez relargués dans l'environnement pour permettre une initiation de la réponse immunitaire adéquate. Dans ce sens, nos deux modèles sont intéressants puisqu'ils nous laissent l'opportunité d'analyser cette question en injectant, en plus de notre traitement, les antigènes tumoraux appropriés.

QUATRIEME PUBLICATION

Expression and regulation of IRG-1, an early IFN and TLR activation factor, in murine and human microglia and in experimental brain tumors.

Sabrina Donnou, Ulrich Jarry, Sylvain Fisson, Yves Delneste and Dominique Couez.

Article en préparation.

Les processus d'activation des cellules microgliales sont encore mal connus. Une banque soustractive réalisée au laboratoire entre deux clones de cellules microgliales stimulés par l'IFN γ avait permis de mettre en évidence l'immune responsive gene 1 (IRG-1) comme un nouveau marqueur d'activation de la microglie (Mahe *et al.*, 2001). Auparavant, il avait été décrit dans des macrophages stimulés par le LPS (Lee *et al.*, 1995) puis ensuite il a été mis en évidence dans des cellules dendritiques activées par le LPS (Hoshino *et al.*, 2002). De façon intéressante, ces auteurs avaient également montré une induction originale de cette molécule par le TLR4 dans la mesure où elle peut être induite, comme les autres gènes de réponse à l'IFN, par une voie dépendant du facteur MyD88, mais aussi par une voie indépendante de ce facteur. D'autre part, l'expression de ce gène est dérégulée après infection par certaines souches de mycobactéries (Basler *et al.*, 2006).

Bien que son rôle dans l'animal adulte ne soit pas connu, l'ensemble de ces résultats ainsi que sa grande conservation dans l'évolution, suggèrent que IRG-1 pourrait être un facteur important de l'activation des cellules présentatrices d'antigènes suite à leur stimulation par l'IFN γ ou les agonistes des TLR.

Pour ce travail, nous avons ainsi cherché à mieux caractériser l'IRG-1. Après avoir cloné les séquences murine et humaine, leur expression a été analysée dans divers tissus et types cellulaires. Par ailleurs, son expression après stimulation par les IFN de type I ou II et par les agonistes TLR a également été étudiée, ainsi que sa régulation au cours du développement de tumeurs cérébrales.

Expression and regulation of IRG-1, an early IFN and TLR activation factor, in murine and human microglia and in experimental brain tumors.

Sabrina Donnou^{1,2}, Ulrich Jarry^{1,2}, Sylvain Fisson^{2,3}, Yves Delneste¹ and Dominique Couez^{1,2,☉}

¹Equipe Avenir-INSERM U 564, Angers University, University Hospital of Angers, France;
²Laboratoire de Biologie Moléculaire, Immunologie et Thérapeutique des Cancers (BMITC), Angers University, France ; ³present address : INSERM U 255, Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, Centre de Recherche des Cordeliers, IFR58, Paris, France.

Running title : IRG-1 in microglia and brain tumors.

Number of figures : 8

☉Address correspondence and reprint requests to Dominique Couez, INSERM U564, CHU, 4, rue Larrey, F-49033 Angers, France.

E-mail address: dominique.couez@univ-angers.fr

Phone : +33 2 41354145

Fax : + 33 2 41731630

Key words: microglia, IRG-1, antigen presentation, TLRs, IFNs

ABSTRACT

Microglial cells are the major immune competent cells of the central nervous system but their activation process is still poorly understood. In a subtractive bank between two IFN γ stimulated microglial clones, we previously highlighted IRG-1 as a new potential activation marker of microglial cells. With the aim to better characterize this molecule, we derived the human counterpart and showed that IRG-1 is expressed in quite all activated immune cells except T lymphocytes. We also demonstrated its induction in antigen presenting cells stimulated with type I/II IFNs or TLR agonists. Moreover, we observed its downregulation during intracerebral development that could be reversed with pro-inflammatory treatment, suggesting its potential application as a predictive marker of efficient anti-tumor response.

INTRODUCTION

Microglial cells are the main resident antigen presenting cells (APCs) of the central nervous system (Gehrmann *et al.*, 1995; Aloisi, 2001). Quiescent in a healthy brain, they are rapidly activated following any injury of the brain parenchyma (Kim et de Vellis, 2005). However, their activation process is still poorly understood. As for other APCs, IFN γ allows microglial cells to be activated and to increase their antigen presentation potential (Aloisi *et al.*, 2000). In order to better characterize these cells, we previously studied differentially expressed genes between two IFN γ activated microglial clones and highlighted the immune responsive gene 1 (IRG-1) as a novel activation marker of these cells (Mahe *et al.*, 2001). The initial description of IRG-1 concerned lipopolysaccharide (LPS)- activated macrophages (Lee *et al.*, 1995), and many subtractive hybridization or DNA chips analysis on dendritic cells or macrophages stimulated by LPS or *Mycobacterium tuberculosis* highlighted IRG-1 as an upregulated gene (McCaffrey *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2005). Even if its role in adult animals is still unclear, the only functional available data showed its implication in embryo implantation (Chen *et al.*, 2003; Cheon *et al.*, 2003), and suggested that it could represent an important factor of APCs activation, either following IFN γ or toll-like receptor (TLR) stimulation. The TLR family plays a crucial role in innate immunity against microbial pathogens as well as in the subsequent induction of adaptive immune response. TLRs are conserved evolutionary receptors that have evolved to recognize conserved pathogenic motifs and allow to activate very efficiently the immune system by inducing expression of pro-inflammatory cytokines, chemokines, interferon inducible genes or by favouring the maturation of antigen presenting cells (Medzhitov et Janeway, 2000; Pasare et Medzhitov, 2004; Kielian, 2006). To achieve these functions, TLRs ultimately lead to the NF- κ B transcription factor activation, by transducing the signal via MyD88 except for the TLR3 which uses the TRIF (TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β) adaptor molecule and the IRF3 (IFN regulatory factor 3) transcription factor. Interestingly, a MyD88 independent pathway implicating TRIF has also been associated with TLR4 (Akira et Takeda, 2004; Kawai et Akira, 2006).

Belonging to the interferon inducible genes, induced notably by a TLR4 stimulation, IRG-1 has however a distinct regulation profile. In macrophages and dendritic cells, the IRG-1 mRNA is rapidly upregulated following TLR4 stimulation in a MyD88 dependant pathway but also in a MyD88 independent pathway as indicated by the use of TRIF, MyD88 and/or STAT1 deficient mice (Hoshino *et al.*, 2002; Hirotani *et al.*, 2005). Moreover, infection of

macrophages with *Mycobacterium tuberculosis* induces IRG-1 expression, even if MyD88, TRIF, TIRAP, TLR2 and/or TLR4 are disrupted (Shi *et al.*, 2005), thus suggesting that other membrane receptors and/or other adaptors could be responsible for this induction. The unique features of IRG-1 induction among interferon inducible genes and the highly conserved sequence of this molecule throughout evolution thus also suggest a key role of immune responsive gene 1 in the activation of antigen presenting cells.

Analysis of the activation process of APCs is a very challenging issue. Indeed, at the interface between innate and adaptive immunity, they are implicated in every immune response of the body. As a consequence, pathogens often try to subvert these cells. Notably, during infection with *Mycobacterium paratuberculosis*, even if the membrane cell's phenotype is not altered, some intracellular molecules are disturbed and allow the pathogen to proliferate (Zur Lage *et al.*, 2003). Following the same idea, APCs during tumoral development are submitted to immunosuppressed environment and are unable to assume their pro-inflammatory effects even if they express protein such as MHC class II or B7 costimulatory molecules, suggesting that some important intracellular pathways are inhibited (Dutta *et al.*, 2003; Schartner *et al.*, 2005). Manipulation of all these altered pathways should thus give some new therapeutic options to fight these tumoral diseases.

To get further insights into the potential function of IRG-1, we cloned the mouse microglial sequence, found the human counterpart and studied their expression in diverse tissues and cells. IRG-1 regulation by type I and II IFNs and TLR agonists was also studied at the messenger and protein level. Moreover, we analyzed its expression during the development of an intracranial tumor and following local treatment with pro-inflammatory signals.

MATERIALS AND METHODS

MICE

C57Bl/6J mice were bred under specific pathogen-free conditions in our animal facilities using breeding pairs originally obtained from Charles River Laboratories (France). For all experiments, animals were used between 6 and 12 weeks of age and were manipulated according to European Union guidelines.

CELL CULTURES

Murine cells

EOC microglial cell lines (EOC 20, 9), kindly provided by Dr W. S. Walker, were cultured in polymethylpentene (PMP) dishes (Nalgen, Rochester, NY) and maintained in DMEM medium supplemented by 10% heat-inactivated foetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine and 20% conditioned medium from the mouse bone marrow cell line LADMAC, which secretes macrophage-colony stimulating factor (M-CSF).

Isolation of primary adult microglial cells was described elsewhere (Donnou *et al.*, 2005). Briefly, brains from 10 to 20 perfused animals were removed and homogenized tissue was fractionated on a discontinuous 30:70% isotonic Percoll gradient (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). CD11b⁺ microglial cells from the interface were then magnetically sorted with biotin anti CD11b mAb (M1/70, eBiosciences) and anti-biotin microbeads (Miltenyi Biotech) and further highly sorted by flow cytometry when indicated as previously described (Donnou *et al.* 2005).

To isolate splenic CD11b⁺ macrophages, CD11c⁺ dendritic cells, CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, CD19⁺ B lymphocytes and DX5⁺ NK cells, spleens were subjected to enzymatic dissociation by DNase I (0,1mg/mL) and collagenase (50U/mL) (Roche), red cells were lysed by osmotic shock and wanted cells were magnetically sorted with appropriate biotinylated antibodies and anti-biotin microbeads. Purity of the cells was assessed by flow cytometry. To isolate dendritic subpopulations, CD11c⁺ cells were first enriched by magnetic cell sorting and CD11b⁺, CD8 α ⁺ and B220⁺ were highly purified by flow cytometry sorting on a FACStar⁺ (Becton Dickinson).

The DO11.10 CD4⁺ T cell hybridoma was cultivated in DMEM supplemented with 10% FCS and the B3Z CD8⁺ T cell hybridoma was maintained in RPMI medium supplemented with 1mM sodium pyruvate, 10mM HEPES, 2mM L-glutamin (L-Gln) and 25nM non essential

amino acids. The B16-F10gp₃₃₋₄₁ melanoma cell line was grown in DMEM supplemented with 10% FCS. E.G7 thymoma cells were maintained in RPMI medium supplemented with 1mM sodium pyruvate, 10mM HEPES, 2mM L-glutamin (L-Gln), 25nM non essential amino acids and 0.5mg/ml G418.

HUMAN CELLS

CHME microglial cell line was maintained in EMEM supplemented with 10% FCS, 7,5% NaPO₄³⁻, NaHCO₃ and 4mM L-Gln. Jurkat (T lymphocytes) and SK64 (B lymphocytes) cell lines were cultivated in RPMI supplemented with 10% FCS.

Ex vivo human monocytes, NK cells, B and T lymphocytes were obtained after blood centrifugation on a Ficoll gradient, platelet elimination, red blood cell lysis and cell isolation by magnetic sorting. Dendritic cells were generated from the enriched monocyte fraction after a 5 to 7 days culture in RPMI supplemented with 10% FCS and 20ng/mL GM-CSF and IL-4. Where indicated, dendritic cell maturation was induced by 20ng/mL LPS.

TISSUE BANKS :

Mice received an intravenous injection of sterile 1X PBS or PBS (1μg/g) and were euthanized 18 hours later. Organs were isolated after 2 min of intracardiac perfusion with 0,9% NaCl and were rapidly frozen in liquid nitrogen. Human cDNAs were from Clontech (Mountain view, USA).

REAGENTS AND TREATMENT CONDITIONS

Murine type I (IFN α , IFN β ; 100U/mL) and type II (IFN γ ; 50U/mL) IFNs and human recombinant IFN γ (100U/mL) were all from R&D (R&D systems, UK). TLR ligands were obtained from Invivogen (Toulouse, France) and were used at the following concentrations : Pam₃CSK₄ (TLR2), 1μg/mL ; zymosan (TLR2 and 6) ; Poly(I:C) (TLR3), 0.5μg/mL ; ultrapure LPS (TLR4), 0.5μg/mL ; flagellin (TLR5), 1μg/mL ; R837 (TLR7 and 8), 1μg/mL. CpG oligodeoxynucleotides (5' TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT 3', TLR9 ligand) were purchased at MWG biotech and used at 1μM. TLR stimulation were performed during 2 or 6 hours as indicated. T lymphocytes were stimulated where indicated for 24 hours with anti-CD3 antibody (1μg/mL, BD-Pharmingen, San Diego, CA), anti-CD28 antibody (2μg/mL BD-Pharmingen), PMA (100ng/mL) and/or ionomycin (1μM).

For kinetics studies, EOC cells were plated at 2.10⁵/mL 24h before stimulation and were then analysed 1 to 48 hours after stimulation. Primary cells (0.5X10⁶/mL) were stimulated during

24h with recombinant human IFN γ (100U/mL), recombinant murine IFN γ (50U/mL) or LPS (5 μ g/mL for murine cells and 50ng/mL for human cells) after 12 to 24 hours of culture to allow adherent cells to recover their normal morphology.

FLOW CYTOMETRIC ANALYSES

In all the experiments, cells were first incubated for 20 min with 10 μ g/ml anti-CD16/CD32 mAb (clone 2.4G2, rat IgG2b; BD-Pharmingen) to saturate Fc receptors and 30 min with 10 μ g/ml mAbs. Fixation of biotin-labeled mAb was revealed by Cy-Chrome-conjugated streptavidin (1,25 μ g/mL, BD-Pharmingen). The following mAb, either biotin or fluorochrome conjugated, were from e-Biosciences (San Diego, CA) : anti-CD11b (clone M1/70), anti-CD11c (clone HL3), anti-CD45 (clone 30-F11), anti-I-Ab (clone AF6-120.1), anti-CD49b (clone DX5), anti-B220 (clone RA3-6B2), anti-CD4 (clone RM4-5), anti-CD8 (clone 53-6.7), anti-CD19 (clone MB19-1). Anti-CD16/CD32 (clone 2.4G2, rat IgG2b) mAbs and isotype control mAbs were all from BD-Pharmingen (San Diego, CA). Phenotype or purity of the cells was analyzed by flow cytofluorometry using a FACScalibur cytofluorometer (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium).

RT-PCR ANALYSIS

Total cellular RNA was extracted using TRIzol reagent as indicated by the manufacturer (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). To avoid genomic DNA contamination, RNA was treated by DNase I (1U/ μ g of RNA) for 15 minutes at room temperature (Sigma). 2 μ g total RNA was then reverse transcribed at 37°C for 1 hour in a 50 μ L reaction containing 200 μ M of dNTP, 1 μ g of random primer pd(N)₆ (Amersham Biosciences, Orsay, France), 40U of RNase inhibitor (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) and 200U of MMLV reverse transcriptase (Promega, Lyon, France).

For PCR, 2 μ L of the reverse transcription products were used for amplification in a 50 μ L reaction containing 1.5mM MgCl₂, 800 μ M of dNTPs, 1 μ M of each primer and 0.5U of Taq DNA polymerase (Promega, Lyon, France). PCRs were performed in a Hybaid PCR Express thermal cycler (Hybaid, Ashford, UK) with a denaturing temperature of 94°C (45 sec), annealing temperature depending on the primers used (60 sec) and extension temperature of 72°C (60 sec/1000bp) repeated for 34 cycles, the last cycle being followed by an extension of 15 min at 72°C. Negative control lacking RT were included in each experiment to ensure specificity.

Real-time PCR was performed using a Biorad DNA Engine PTC-200 (Biorad, Marnes-La-Coquette, France). The PCR reaction mixture contained the following : 0.5µL of reverse transcription product, 7.5µL of Sybr Green Master mix (Biorad) and 5µM of each primers in a final volume of 15µL. The PCR amplification profile was as follows : initial denaturation at 94°C for 10min, followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 15 sec, annealing at 55°C for 11 sec and extension at 72°C for 22 sec. Specificity of the amplified product was verified by generating melting peaks and by confirmatory electrophoretic analysis of a tenth aliquot of PCR products. The modulation factor (Q) determining the relative variation of expression of the tested mRNA in a stimulated cell compared to the non stimulated one was calculated as follows : $Q=2^{-\Delta\Delta Ct}$, with Ct corresponding to the crossing point and $\Delta\Delta Ct = (Ct_{mRNA} - Ct_{GAPDH})_{stimulated\ cells} - (Ct_{mRNA} - Ct_{GAPDH})_{unstimulated\ cells}$.

Cloning and Sequencing

PCR products were first purified using Wizard SV gel and PCR clean up System from Promega (Madison, USA) following manufacturer's instructions. Selected sequences were then inserted into pcDNA3.1 V5/His TOPO TA vector and E.Coli bacteria were transformed as indicated by the manufacturer (pcDNA3.1/V5-His TOPO TA expression kit, Invitrogen, France). Insert's orientation was checked by PCR using one primer in the insert and the other on the plasmid and sequencing was performed on an automatic DNA sequencer (Beckman Coulter) using CEQ2000 sequencing kit (Beckman Coulter).

Recombinant protein expression and Polyclonal antibodies

pcDNA vectors containing IRG-1 sequence were transfected into COS or CHO cells using lipofectamine as the transfection reagent. The same vector containing the β -galactosidase sequence was transfected separately as a positive control. COS or CHO cells were then cultivated for 24 or 48 hours before being harvested for Western blotting.

Polyclonal antibodies raised against the murine IRG1 were generated by immunizing rabbits with 2 different 14mers peptides, and specific antibodies were purified on affinity column (Covalab, Nice, France).

WESTERN BLOTTING :

Cells were harvested, lysed in a buffer containing 50mM Tris ; 0.01% Nonidet P40 ; 10^{-2} mM sodium orthovanadate ; 150mM NaCl ; 2×10^{-3} mM EDTA ; 2.5mM sodium fluoride ; 10^{-2}

mM PMSF and 1X complete protease inhibitor mixture (Roche). Cell lysates were then separated on a 7.5% acrylamide gel in denaturing conditions and protein were transferred to Immobilon membrane. Membranes were then saturated with 5% nonfat dry milk powder and incubated with anti-IRG1 antibodies (3 μ g/mL). Detection was made with an anti rabbit horseradish peroxydase secondary antibody (1/5000 ; Southern Biotech) and ECL Plus detection system (Amersham Pharmacia Biosciences).

Immunocytofluorescence

Cells grown on a glass microscopic slide were treated 5 minutes with absolute ethanol. Non specific binding sites were saturated with 10% normal mouse serum for 30 minutes and cells were incubated overnight with following primary antibodies : mouse anti rabbit IRG-1 polyclonal antibodies at 1/500 and FITC coupled rat IgG2b anti mouse CD11b monoclonal antibody at 1/100 (clone M1/70, eBiosciences). After extensive washing in 1X PBS, slides were incubated 1 hour at room temperature with PE coupled goat anti-rabbit secondary antibodies (Biosources, Nivelles, Belgium). Observations were made on a Olympus Fluoview confocal microscope using 488 and 543nm lasers.

Intracranial Tumor Models

For intracerebral tumor implantation, mice were deeply anesthetized by intraperitoneal (IP) injection of a mixture of 90 mg/kg of ketamine and 10 mg/kg of xylazine and placed into a stereotaxic frame (Kopf). 2X10³ tumoral cells or PBS were slowly injected into the right frontal lobe (2mm right to the median suture, 0.5mm ahead the Bregma and 2.5mm from the surface of the brain) through a Hamilton syringe attached to a penetrating depth controller. After each injection, the syringe was held in place for an additional minute and was slowly removed to reduce backfilling of injected solution. Seven (B16-F10 cells) or ten (E.G7 cells) days later, animals were re-anesthetized and IFN γ (1500U) and/or CpG-ODN (20 μ g) or PBS solutions were injected in the same coordinates following the same procedure as for tumoral cells. Animals were euthanized 48 hours after the second injection, were intracardiacally perfused with cold NaCl and their brain was removed and snap frozen in liquid nitrogen. Total RNA of the right hemisphere were then extracted and used for RT-PCR analyses as described above.

RESULTS

Identification of IRG1 as an activation marker of murine adult microglia

The molecular events occurring during IFN γ activation and the identification of potential markers of the CNS-resident macrophage subpopulations were previously investigated by our group using the subtractive process of cDNA representational difference analysis (cRDA) on IFN γ activated EOC20 and EOC9 microglial cells. Out of the 16 molecules differentially expressed, the IRG-1 messenger originally found in LPS stimulated macrophages (Lee *et al.*, 1995), was identified and reported for the first time as a novel IFN γ activation marker for microglial cells (Mahe *et al.*, 2001). As shown by RT-PCR in Figure 1A, IRG-1 displayed a characteristic profile being strongly upregulated in the EOC20 and induced in the EOC9 following IFN γ or LPS stimulation. To confirm the results obtained with EOC clones, CD11b⁺ I-Ak⁻ CD45^{low} parenchymal microglia were highly purified from brain of normal adult mice as shown by flow cytometric analysis (Fig 1B) and analysis of IRG-1 expression was performed by RT-PCR (Fig 1C). Although IRG-1 cDNA was not expressed in primary microglia, the stimulation by IFN γ or LPS induced its expression.

Identification and cloning of the human IRG-1 homologue

With primers designed using the previously published sequence by Lee and co-workers (sequence with accession number 950649) (Lee *et al.*, 1995), we cloned the microglial murine IRG-1 open reading frame by PCR amplification. The sequence we obtained present three major differences involving in a shift of the reading frame (Figure 2) but perfectly matched with the fourteen's chromosomal sequence and the predicted mRNA sequence (gi94398293) in NCBI data bases.

Murine IRG-1 cDNA sequence was used to screen the human genomic National Center for Biotechnology Information database, and a sequence with more than 80% homology was found on the thirteen's chromosome (Fig 3A). The murine IRG-1 matched also with the same homology to a predicted cDNA (gi113424431), already named "homo sapiens similar to IRG-1". Primers pairs were designed and used to identify cell lines expressing a corresponding mRNA. Human IRG-1 open reading frames (ORFs) were independently isolated from human activated microglial and macrophagic cells, cloned in a pcDNA expression vector and sequenced. As show in Fig 3B, we obtained an open reading frame of

1506bp encoding a predicted polypeptide of 502aa residues. Our sequence was slightly different from the predicted one, lacking a 156bp region (position 187 to 343 on the predicted sequence) without disturbing the reading frame.

As for the murine one, the human sequence displayed glycosylation and phosphorylation sites but no predictable transmembrane region or sequence signal (Fig 3B). These *in silico* predictions were confirmed by expressing our human cDNA in COS and CHO cells. The protein was expressed as a V5 and His tagged protein allowing us to reveal a 50 to 60kDa band in the cell lysate (Fig 4) but not in the supernatants (not shown).

Murine and human IRG tissue and cell distribution

To assess the tissular distribution of the IRG-1, organs were isolated from normal adult mice or human and RT-PCR analyses on total RNA were performed. IRG-1 mRNA is detectable only in the spleen in mice (Fig 5A) and in spleen and barely in thymus and lung in human (Fig 5B). However as indicated by our results and by previous reports (Lee *et al.*, 1995; Mahe *et al.*, 2001), IRG-1 is induced or highly amplified after cellular activation. We then evaluated its expression in animals submitted to a septic shock. 24h after an intravenous injection of LPS, IRG-1 was still expressed in the spleen but was now detectable in the CNS, the heart, the lung and weakly in the thymus. The murine IRG initial description in the RAW macrophagic cell line (Lee *et al.*, 1995) and in microglial EOC (Mahe *et al.*, 2001), its expression in lung that might be attributable to infiltrating alveolar macrophages, and its major expression in lymphoid organs, led us to look at its repartition in cells of the immune system.

Expression of IRG-1 in microglia and subsets of spleen cells (macrophages, dendritic cells, neutrophils, NK cells, T and B lymphocytes) for mice and blood cells for human was analysed by RT-PCR after purification. As shown in Figure 5C, the IRG-1 mRNA distribution was strictly the same in the murine and human cells analyzed. Whereas IRG-1 is not or very weakly detected in resting cells, its expression is clearly induced in microglial, macrophagic, dendritic, NK, B cells after IFN γ or LPS stimulation. Distribution of IRG-1 was further studied in the three distinct subpopulations of mouse spleen DC (Fig 5D). Whereas IRG-1 was expressed constitutively in plasmacytoid (B220⁺) DCs, its expression could be induced in myeloid (CD11b⁺) DCs by LPS. Our results indicate a preferential expression of IRG-1 in the innate immune cells rather than in lymphocytes in the tested conditions.

Regulation of IRG-1 expression by type I and II interferons

Plasmacytoid dendritic cells that express constitutively IRG-1 have been shown to correspond to a specialized cell population that produces large amounts of type I interferons upon viral infection (Nakano *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2002). Moreover, LPS response are mediated via TLR4 by both MyD88 dependent pathway, essential for the inflammatory response and the TRIF pathway, involved in IRF3 activation and induction of type I IFN (Akira, 2006). Once secreted, IFN α and β can bind to the type I interferon receptor, a heterodimer molecule consisting of IFNAR-1 and IFNAR-2, and can enhanced expression of a set of IFN inducible genes. As type I and II IFNs activate STAT1 transcription factor, we compared the ability of IFN α , β or γ to induce IRG-1 in the EOC20 cell line.

The IRG-1 messenger appears in macrophages 1.5 hours following LPS exposure (Lee *et al.*, 1995). To determine if the kinetic of apparition of the IRG-1 mRNA following IFN stimulations was the same, induction of IRG1 was evaluated in microglial EOC20 by quantitative real time PCR. The time course analysis revealed a very rapid (less than two hours) and potent induction of the IRG-1 mRNA by the three types of IFNs (Fig 6A). However, type I IFNs caused only a transient expression of the messenger with a maximum expression at two hours post-stimulation and a rapid decrease leading to basal level between 8 and 12 hours for IFN α and between 12 and 24 hours for IFN β . On the contrary, stimulation by IFN γ provoked a sustained upregulation of the mRNA for at least 48 hours.

Regulation of IRG expression by the TLR agonists

Among the characterized TLRs, TLR4 like TLR1, 2, 5 and 6 are represented on the cell surface and seem to specifically recognize bacterial and fungal products that are not made by the host whereas TLR 3, 7, 8 and 9 resides in intracellular endosomes and specialize in the detection of nucleic acids of pathogens. If all the 10 members of this conserved TLR family use the MyD88 adaptor, only TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 and TLR9 induce type I IFN (Kawai et Akira, 2006). Since microglial EOC are derived from C3H/HeJ mice naturally deficient in TLR4 (Poltorak *et al.*, 1998) and are cultured with M-CSF that perturbs the CpG response (Sweet *et al.*, 2002), we then tested if stimulation of each TLR was able to induce IRG-1 upregulation in DC2.4 dendritic cells (Fig 6B). Myeloid APCs express TLRs, but it was recently described that T lymphocytes were also capable to respond to certain TLR agonists (Sobek *et al.*, 2004; Caron *et al.*, 2005). We thus also stimulated T lymphocytes with the

different TLR agonists. After 6 hours of stimulation, IRG-1 was upregulated by all the TLR agonists tested in the dendritic cell line (Fig 6B). On the contrary, there was no detectable IRG-1 expression in T-cells whatever the stimulus used (Fig 6C). TLR2, TLR5 and TLR7/8 have been reported to be functional in T-cells and to synergize with TCR dependent stimuli (Sobek *et al.*, 2004; Caron *et al.*, 2005). We thus activated CD4⁺ or CD8⁺ T cell lines with anti-CD3 mAb, anti-CD3 plus anti-CD28 mAbs and/or these TLR agonists. Once again, no clear induction of the IRG-1 was noted (Fig 6D).

Detection and localization of the IRG protein

14 mer peptides were used to immunize rabbits and to generate polyclonal antibodies against the murine IRG-1 protein. Western blotting experiments were carried out in EOC20 and 9 cells stimulated or not for 24 hours with IFN α , β or γ using rabbit anti-IRG-1 Ab. As shown in Fig 7A, a band of approximately 55kDa was only detected in the IFN γ activated cell lysates and not in the culture supernatants (data not shown). No such band was obtained in the IFN α and β activated cells, in agreement with our previous kinetic analysis on the messenger. We then looked at the kinetic of expression of the protein induced by IFN γ stimulation of the EOC20 cells (Fig 7B). Results clearly show the induction of the protein 4 hours after stimulation and its subsequent accumulation in the cells for at least 24 hours in complete agreement with the mRNA expression.

We next studied by confocal microscopy the localization of the protein in the EOC 20 cells before and after 24 hours IFN γ activation, a time sufficient for protein accumulation. Photomicrographs confirmed the predicted cytoplasmic localization of the protein colored in red, in all the cell including its ramifications (Fig 7C). This was confirmed with the green staining of the CD11b at the cell membrane which did not colocalize with IRG-1. Activation of the cells did not modify its cellular repartition (not shown).

REGULATION OF IRG-1 DURING TUMORAL DEVELOPMENT

It is thought that IRG-1 could represent a marker of the activated toxic form of microglial cells in the CNS (Li *et al.*, 2006). During tumoral development, APCs are confronted to an immunosuppressed milieu and are thus not fully activated. Notably, Schartner and colleagues (2005) shown that in the context of a glioma, microglia were not able to normally respond to an IFN γ stimulation by upregulating MHC II molecules. We thus wanted to assess if the IRG-1 expression was affected in the same way. We implanted two

types of syngeneic tumoral cells in the CNS of adult mice, the immunogenic lymphoma EG7 and the very aggressive melanoma B16-F10, and treated them or not one week after (50% of their predicted survival time without treatment) with a single injection of IFN γ , CpG-ODN or both. Expression of the IRG-1 mRNA was then analysed in treated hemispheres by quantitative RT-PCR. Healthy mice who received only PBS injection served as a reference and their IRG-1 expression level was normalized to 1 (Fig 8). In the presence of the more immunogenic E.G7 tumor, IRG-1 was upregulated 27 times but only 3.7 times with the very aggressive B16-F10 tumor, what is in great correlation with the infiltration level of these two tumors by cells of the immune system (Donnou *et al.*, in preparation). Following IFN γ treatment, we observed a 36 times upregulation of IRG-1 mRNA in tumor free mice but surprisingly, we did not find any significant upregulation of IRG-1 in mice bearing the two types of tumor after IFN γ injection compared to mice bearing the tumor alone. CpG-ODN were more potent in inducing IRG-1, with values ranging from 136 times overexpression in tumor free mice to 73 times overexpression in B16-F10 bearing mice. The combination of CpG-ODN plus IFN γ was dramatically more efficient to induce IRG-1, with a considerable 660 times upregulation in the tumor free mice, that was reduced to 390 times in the context of the E.G7 tumor. On the contrary, there was only a modest IRG-1 upregulation in mice bearing the B16-F10 tumor, compared to the non treated ones.

DISCUSSION

The IRG-1 messenger, originally found in LPS stimulated macrophages (Lee *et al.*, 1995), was identified for the first time in microglia in our previous subtractive bank between two IFN γ activated EOC clones (Mahe *et al.*, 2001). Its expression was confirmed here in activated primary adult microglia stimulated by IFN γ but also by LPS. Using the previously published sequence by Lee and coworkers (1995), we cloned the murine microglial IRG-1 open reading frame. The sequence we obtained presented three major differences resulting in a shift of the reading frame, but perfectly matched with the fourteen's chromosomal sequence and the predicted mRNA sequence with accession number gi94398293 in NCBI data bases. Since IRG-1 is highly conserved throughout evolution, our murine IRG-1 sequence was used to search for the human counterpart. A genomic sequence was found with more than 80% homology on the thirteen's chromosome. Encoding IRG-1 cDNAs were independently isolated and cloned from human activated microglial and macrophagic cells. The fragments we obtained presented a major difference with the prediction, lacking a 156bp region that could reflect either an alternative splice or an intron oversight in the predicted sequence. *In silico* analyses gave no indication for a potential function of this molecule. Human and mouse sequences can potentially be glycosylated, but they lack a sequence signal or a transmembrane region indicative of an extracellular localization, suggesting that IRG-1 would rather be cytoplasmic. This cytoplasmic localization was confirmed by our western blot results revealing the IRG-1 protein only in the cell lysate and by our confocal microscopy study. These data reinforce results from Li and colleagues (2006) showing that the IRG-1 protein was regulated by phosphorylation.

To gain insight into its potential function, the expression profile of the immune responsive gene 1 was further characterized. The tissular distribution of IRG-1 was restricted to spleen in mice and to spleen and barely thymus and lung in humans. In mice subjected to systemic inflammation, IRG-1 was also found in the thymus, the brain, corresponding to microglia, the lungs, where the many alveolar macrophages could be responsible for this expression, and the heart. Its major expression in lymphoid organs led us to look at its repartition in immune cells. As was already shown before, we found IRG-1 in activated macrophages (Lee *et al.*, 1995), microglia (Mahe *et al.*, 2001) and dendritic cells (Hoshino *et al.*, 2002), that would have suggested a preferential expression in myeloid antigen presenting cells. However, we also detected it for the first time in activated NK cells and neutrophils,

thus suggesting that IRG-1 is a molecule playing a role in the activation of cells of the innate immune system.

A classical way to activate innate immune cells is to engage TLRs or to stimulate them with interferons. Type I and II IFNs provoked a rapid induction of IRG-1 at the mRNA and protein level in microglial and dendritic cells, suggesting a direct induction. This upregulation was only transitory with type I IFNs but was sustained with IFN γ . The IRG-1 mRNA upregulation was previously shown following TLR4 stimulation via a MyD88 dependant pathway but also in a TRIF dependant pathway, probably by IRF3 (Hoshino *et al.*, 2002; Hirotani *et al.*, 2005). We showed for the first time that all well characterized TLRs are able to induce IRG-1 upregulation although with different efficiencies. Given the fact that just some TLRs are able to induce type I IFN secretion, our data show that TLR signalling could directly induce IRG-1 expression. Our results are also in agreement with the induction of IRG-1 in TLR4^{-/-} and/or TLR2^{-/-} macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis* suggesting that other receptors could be responsible for this induction (Shi *et al.*, 2005). All these informations thus suggest that IRG-1 can be regulated by at least STAT-1, NF- κ B and IRF-3 transcription factors.

T lymphocytes also express TLRs. However, we were unable to induce IRG-1 expression in these cells after TLR stimulation. Sobek and colleagues (2004) showed that TLR2 can act as a costimulator and as such needs the TCR signal to activate T cells. But even with anti-CD3 mAb stimulation and eventually anti-CD28 mAb costimulation, TLR agonists did not induce IRG-1 in these cells. These results suggest either a different TLR transduction pathway between APCs and T lymphocytes, or that the stimuli applied were not optimal to induce IRG-1 expression.

Despite all these results, few is known about the function of IRG-1 in immune cells. Recently, Li and colleagues (2006) observed that IRG-1 expression was correlated with different activities of microglial cells: neuroprotective cells were IRG-1⁻ whereas neurotoxic cells were IRG-1⁺. During tumoral development, APCs are subjected to an immunosuppressed environment and it is not known whether they can efficiently be reactivated in this context. Using tumor models developed in the laboratory, we studied IRG-1 regulation before and after application of an inflammatory treatment. Interestingly, there was an existing IRG-1 signal even without any treatment, suggesting that activated cells infiltrated the tumor mass. After IFN γ application, IRG-1 expression was greatly enhanced (more than 30 times) in the brain of healthy mice, but was not upregulated in the presence of the tumors, showing an altered transduction pathway. If CpG-ODN were used as the treatment, there was

again a considerable increase in IRG-1 expression in healthy brains, but even in the presence of the two types of tumors, suggesting the greater efficiency of these compounds to fight a cerebral tumor. Interestingly, E.G7 bearing mice treated by this way were often able to reject their tumor (Donnou *et al.*, in preparation). When the two treatments were combined, we observed a synergistic effect, because IRG-1 expression was much more important than with either treatment alone. Surprisingly, even in the tumor mass, this combination provoked a very important increase in IRG-1 expression at least for the E.G7 model, showing that CpG-ODN were able to reverse the inhibition of the IFN pathway. However, this treatment was very aggressive and provoked the death of more than half of the mice, probably through a massive cytotoxic response of local antigen presenting cells (Adachi *et al.*, 2006; Schroder *et al.*, 2006). Concerning the very aggressive B16-F10 model, IRG-1 was clearly less expressed in all the condition tested but this correlated well with the modest benefit of these treatments to increase mice survival time.

Other functional data concern macrophages infected with different mycobacterium species (Basler *et al.*, 2006). In this work, authors showed that some mycobacterium species were able to block the acidification of the endosome and its fusion with lysosomes and also showed that in this case, the IRG-1 mRNA was destabilized, thus suggesting that the protein was involved in one of these altered functions. Moreover, it is also known that mycobacterium can alter MHC II presentation (Zur Lage *et al.*, 2003). During tumoral development, Schartner and colleagues (2005) demonstrated that the MHC II induction on local APCs was altered and given our results showing IRG-1 regulation in this context, it is tempting to speculate that this molecule could be implicated in the antigen processing and/or antigen presentation machinery of immune cells. The best way to elucidate IRG-1 function will certainly be to generate knock-out mice, but considering work from Chen or Cheon and colleagues (Chen *et al.*, 2003; Cheon *et al.*, 2003), showing IRG-1 implication in embryo implantation, it will be necessary to generate conditional knock-out mice.

AKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Pr. P. Jeannin for providing the E.G7 and DC2.4 cell lines, and to Dr D. Klatzmann for the B16-F10gp33-41 cell line. This work was supported by the comité départemental de Maine et Loire of the Ligue Contre le Cancer. S. Donnou was funded by a fellowship from the “Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC)” and the Angers University.

REFERENCES

- Adachi, Y., Kindzelskii, A.L., Petty, A.R., Huang, J.B., Maeda, N., Yotsumoto, S., Aratani, Y., Ohno, N., Petty, H.R., 2006. IFN-gamma primes RAW264 macrophages and human monocytes for enhanced oxidant production in response to CpG DNA via metabolic signaling: roles of TLR9 and myeloperoxidase trafficking. *J Immunol* 176, 5033-5040.
- Akira, S., 2006. TLR signaling. *Curr Top Microbiol Immunol* 311, 1-16.
- Akira, S., Takeda, K., 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4, 499-511.
- Aloisi, F., 2001. Immune function of microglia. *Glia* 36, 165-179.
- Aloisi, F., De Simone, R., Columba-Cabezas, S., Penna, G., Adorini, L., 2000. Functional maturation of adult mouse resting microglia into an APC is promoted by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interaction with Th1 cells. *J Immunol* 164, 1705-1712.
- Basler, T., Jeckstadt, S., Valentin-Weigand, P., Goethe, R., 2006. Mycobacterium paratuberculosis, Mycobacterium smegmatis, and lipopolysaccharide induce different transcriptional and post-transcriptional regulation of the IRG1 gene in murine macrophages. *J Leukoc Biol* 79, 628-638.
- Caron, G., Duluc, D., Fremaux, I., Jeannin, P., David, C., Gascan, H., Delneste, Y., 2005. Direct stimulation of human T cells via TLR5 and TLR7/8: flagellin and R-848 up-regulate proliferation and IFN-gamma production by memory CD4+ T cells. *J Immunol* 175, 1551-1557.
- Chen, B., Zhang, D., Pollard, J.W., 2003. Progesterone regulation of the mammalian ortholog of methylcitrate dehydratase (immune response gene 1) in the uterine epithelium during implantation through the protein kinase C pathway. *Mol Endocrinol* 17, 2340-2354.
- Cheon, Y.P., Xu, X., Bagchi, M.K., Bagchi, I.C., 2003. Immune-responsive gene 1 is a novel target of progesterone receptor and plays a critical role during implantation in the mouse. *Endocrinology* 144, 5623-5630.
- Donnou, S., Fisson, S., Mahe, D., Montoni, A., Couez, D., 2005. Identification of new CNS-resident macrophage subpopulation molecular markers for the discrimination with murine systemic macrophages. *J Neuroimmunol* 169, 39-49.
- Dutta, T., Spence, A., Lampson, L.A., 2003. Robust ability of IFN-gamma to upregulate class II MHC antigen expression in tumor bearing rat brains. *J Neurooncol* 64, 31-44.
- Gehrmann, J., Matsumoto, Y., Kreutzberg, G.W., 1995. Microglia: intrinsic immuneffector cell of the brain. *Brain Res Brain Res Rev* 20, 269-287.
- Hirotsani, T., Yamamoto, M., Kumagai, Y., Uematsu, S., Kawase, I., Takeuchi, O., Akira, S., 2005. Regulation of lipopolysaccharide-inducible genes by MyD88 and Toll/IL-1

- domain containing adaptor inducing IFN-beta. *Biochem Biophys Res Commun* 328, 383-392.
- Hoshino, K., Kaisho, T., Iwabe, T., Takeuchi, O., Akira, S., 2002. Differential involvement of IFN-beta in Toll-like receptor-stimulated dendritic cell activation. *Int Immunol* 14, 1225-1231.
- Kawai, T., Akira, S., 2006. TLR signaling. *Cell Death Differ* 13, 816-825.
- Kielian, T., 2006. Toll-like receptors in central nervous system glial inflammation and homeostasis. *J Neurosci Res* 83, 711-730.
- Kim, S.U., de Vellis, J., 2005. Microglia in health and disease. *J Neurosci Res* 81, 302-313.
- Lee, C.G., Jenkins, N.A., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., O'Brien, W.E., 1995. Cloning and analysis of gene regulation of a novel LPS-inducible cDNA. *Immunogenetics* 41, 263-270.
- Li, H., Gang, Z., Yuling, H., Luokun, X., Jie, X., Hao, L., Li, W., Chunsong, H., Junyan, L., Mingshen, J., Youxin, J., Feili, G., Boquan, J., Jinquan, T., 2006. Different neurotropic pathogens elicit neurotoxic CCR9- or neurosupportive CXCR3-expressing microglia. *J Immunol* 177, 3644-3656.
- Mahe, D., Fisson, S., Montoni, A., Morel, A., Couez, D., 2001. Identification and IFN-gamma-regulation of differentially expressed mRNAs in murine microglial and CNS-associated macrophage subpopulations. *Mol Cell Neurosci* 18, 363-380.
- Martin, P., Del Hoyo, G.M., Anjuere, F., Arias, C.F., Vargas, H.H., Fernandez, L.A., Parrillas, V., Ardavin, C., 2002. Characterization of a new subpopulation of mouse CD8alpha+ B220+ dendritic cells endowed with type 1 interferon production capacity and tolerogenic potential. *Blood* 100, 383-390.
- McCaffrey, R.L., Fawcett, P., O'Riordan, M., Lee, K.D., Havell, E.A., Brown, P.O., Portnoy, D.A., 2004. A specific gene expression program triggered by Gram-positive bacteria in the cytosol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 11386-11391.
- Medzhitov, R., Janeway, C., Jr., 2000. The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol* 8, 452-456.
- Nakano, H., Yanagita, M., Gunn, M.D., 2001. CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 194, 1171-1178.
- Pasare, C., Medzhitov, R., 2004. Toll-like receptors and acquired immunity. *Semin Immunol* 16, 23-26.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., Beutler, B., 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282, 2085-2088.

- Schartner, J.M., Hagar, A.R., Van Handel, M., Zhang, L., Nadkarni, N., Badie, B., 2005. Impaired capacity for upregulation of MHC class II in tumor-associated microglia. *Glia* 51, 279-285.
- Schroder, K., Sweet, M.J., Hume, D.A., 2006. Signal integration between IFN γ and TLR signalling pathways in macrophages. *Immunobiology* 211, 511-524.
- Shi, S., Blumenthal, A., Hickey, C.M., Gandotra, S., Levy, D., Ehrt, S., 2005. Expression of Many Immunologically Important Genes in Mycobacterium tuberculosis-Infected Macrophages Is Independent of Both TLR2 and TLR4 but Dependent on IFN- α Receptor and STAT1. *J Immunol* 175, 3318-3328.
- Sobek, V., Birkner, N., Falk, I., Wurch, A., Kirschning, C.J., Wagner, H., Wallich, R., Lamers, M.C., Simon, M.M., 2004. Direct Toll-like receptor 2 mediated co-stimulation of T cells in the mouse system as a basis for chronic inflammatory joint disease. *Arthritis Res Ther* 6, R433-446.
- Sweet, M.J., Campbell, C.C., Sester, D.P., Xu, D., McDonald, R.C., Stacey, K.J., Hume, D.A., Liew, F.Y., 2002. Colony-stimulating factor-1 suppresses responses to CpG DNA and expression of toll-like receptor 9 but enhances responses to lipopolysaccharide in murine macrophages. *J Immunol* 168, 392-399.
- Zur Lage, S., Goethe, R., Darji, A., Valentin-Weigand, P., Weiss, S., 2003. Activation of macrophages and interference with CD4 $^{+}$ T-cell stimulation by Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis and Mycobacterium avium subspecies avium. *Immunology* 108, 62-69.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: IRG-1 is highly upregulated or induced in activated microglial cells. (A) EOC20 or 9 cells were stimulated or not for 24 hours with IFN γ or LPS and IRG-1 or GAPDH cDNA were amplified by 35 cycles of PCR. (B) Flow cytometric profile of *ex vivo* microglia showing great purity of the cells. (C) Highly purified adult microglial cells were stimulated or not for 24 hours with IFN γ or LPS and RT-PCR analyses were performed to amplify the IRG-1 or GAPDH cDNA.

Figure 2: Murine IRG-1 sequence. Alignment between the previously published sequence of IRG-1 (“950649”) and the sequence obtained in the laboratory from microglial cells (“labo”). Discrepancies between the two sequences are shown in blue (substitutions) and black (gaps).

Figure 3: Identification and cloning of the human IRG-1 sequence. (A) Drawing illustrating homology between the murine IRG-1 partial sequence obtained in the laboratory, the human thirteen’s chromosome and the predicted human IRG-1 mRNA available in NCBI databank under the accession number gi113424431. (B) nucleic acid and proteic sequence of the human IRG-1 cloned in the laboratory. The predictable glycosylation (squares) and phosphorylation (circles) sites of the human sequence are shown.

Figure 4 : Expression of the recombinant human IRG-1. Cloned human IRG-1 sequence was transfected in COS or CHO cells and Western Blot analyses were performed after 24 hours to detect the recombinant protein. Line 1 : mock transfected ; lines 2 to 4 : IRG-1 transfection.

Figure 5: Localization of the IRG-1 mRNA in murine and human tissues and cells. (A) Mice (n=3) were subjected to intravenous PBS or LPS injection and organs were isolated as indicated in materials and methods. RT-PCR analyses were then performed on total RNA to reveal IRG-1 mRNA and GAPDH mRNA as a positive control. (B) Human organs cDNAs were obtained from Clontech and used to amplify IRG-1 after 35 cycles of PCR. (C) RT-PCR analyses of mouse and human cells stimulated (+) or not (-) with IFN γ or LPS for 24 hours.

(D) IRG-1 expression in sorted splenic dendritic cell subpopulations. CD11c splenic dendritic cells were isolated, and CD11b⁺, CD8α⁺ or B220⁺ subpopulations were highly purified by flow cytometry before 24 hours stimulation with LPS and subsequent RT-PCR analyses.

Figure 6: Regulation of IRG-1 expression by interferons or TLR agonists. **(A)** Kinetic of expression of IRG-1 following IFNα, IFNβ or IFNγ stimulation (1 to 48 hours) of the EOC20 microglial cell line. The modulation factor was calculated as described in materials and methods and represents the relative variation of expression of the analysed mRNA in the stimulated cells compared to the non stimulated ones whose expression level is normalized to 1 (n=3, one representative result is shown). **(B)** Modulation of IRG-1 expression in the DC2.4 cell line following 6 hours stimulation with the different TLR agonists. Pam : Pam₃CSK₄ ; Zym : zymosan ; I:C : poly I:C ; LPS : lipopolysaccharide ; Fla : flagelline ; R848 : imiquimod ; CpG : CpG-ODN 1826. **(C,D)** RT-PCR analyses showing the absence of IRG-1 expression in T lymphocytes after stimulation with the different TLR agonists **(C)** or stimulation with Pam₃CSK₄, flagelline or imiquimod combined or not with anti CD3 and/or anti-CD28 activation **(D)**.

Figure 7: Expression of the IRG-1 protein in murine cells. **(A)** Western blot analysis of IRG-1 expression in EOC20 cells stimulated or not for 24 hours with IFNγ, IFNα or IFNβ. **(B)** kinetic of expression of IRG-1 in EOC20 cells following IFNγ stimulation. **(C)** Photomicrographs of EOC20 stained with rabbit polyclonal anti-IRG-1 antibody (red) and rat anti-CD11b antibody (green) and analysed by confocal microscopy. The insert shows staining with the secondary goat anti-rabbit antibody (red) and the rat anti-CD11b antibody (green).

Figure 8: Regulation of the IRG-1 mRNA expression in a tumoral environment. Adult mice received an intracranial injection of PBS, E.G7 or B16-F10 tumor cells as described in materials and methods. They were subsequently treated (7 or 9 days following tumor implantation for E.G7 and B16-F10 respectively) or not with IFNγ or CpG-ODN alone or in combination. Treated hemispheres were then isolated and total RNA was used to study the expression of IRG-1 by quantitative RT-PCR. Results are expressed in modulation factor representing the fold induction of IRG-1 in the diverse brains compared to the PBS injected tumor free brain whose IRG-1 expression level is normalized to 1 (n=2, one representative result is shown).

Les illustrations de cette partie sont consultables dans la partie Annexe de TEL, dans le fichier Figures Article4.ppt

L'immune responsive gene 1 (IRG-1) avait initialement été décrit dans les cellules microgliales (Mahe *et al.*, 2001), les macrophages (Lee *et al.*, 1995) puis les cellules dendritiques (Hoshino *et al.*, 2002) activées par l'IFN γ ou le LPS, laissant penser qu'il s'agissait d'une molécule impliquée dans l'activation des cellules présentatrices d'antigènes. Afin de mieux caractériser cette molécule, nous avons cloné la séquence murine, en révélant des différences par rapport à la précédente séquence publiée (Lee *et al.*, 1995). En se servant de notre séquence, nous avons également cloné pour la première fois l'homologue humain de l'IRG-1, présentant plus de 80% d'homologie avec la séquence murine et confirmant donc le haut degré de conservation de cet ARNm au cours de l'évolution, jusqu'au xénope (Schmidt et Richter, 2000). L'IRG-1 est exprimé constitutivement dans la rate des souris ainsi que dans la rate, les poumons et le thymus de l'homme. Après injection systémique de LPS aux souris, l'IRG-1 est induit dans le cerveau, le thymus, les poumons et le cœur des animaux. Ces résultats suggèrent donc un lien étroit de l'IRG-1 avec le système immunitaire, les raisons de l'expression dans le cœur n'étant pas connues à l'heure actuelle. Au niveau cellulaire, l'IRG-1 a été détecté comme attendu dans les cellules microgliales, macrophagiques et dendritiques activées (Lee *et al.*, 1995; Mahe *et al.*, 2001; Hoshino *et al.*, 2002). Cependant, nous avons mis en évidence pour la première fois son expression dans les neutrophiles et les cellules NK activés, alors qu'elle est très faible ou indétectable dans les lymphocytes B et les lymphocytes T dans les conditions testées, ce qui montre une expression préférentielle de ce messager au sein du système immunitaire inné.

En plus de l'induction d'expression de l'IRG-1 par l'IFN γ ou le LPS, déjà montrée auparavant (Lee *et al.*, 1995; Mahe *et al.*, 2001; Hoshino *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2003), nous avons mis en évidence que les IFN de type I ainsi que l'ensemble des agonistes TLR étaient capables d'induire au moins transitoirement ce messager dans les cellules présentatrices d'antigènes, ce qui suggère là encore une fonction importante d'IRG-1 dans l'activation de ces cellules. Etant donné que seuls certains TLR induisent la sécrétion d'IFN de type I (Kawai et Akira, 2006), nos résultats suggèrent que les voies de signalisation des TLR sont capables d'induire directement l'IRG-1. Des analyses par Western Blot ont également permis de révéler une régulation tout à fait superposable de la protéine. Par ailleurs, l'IRG-1 a une localisation cytoplasmique, aussi bien dans les cellules quiescentes qu'après activation.

La capacité des cellules présentatrices d'antigènes à assurer leur fonction au sein d'une tumeur est capitale pour espérer obtenir une réponse anti-tumorale efficace. Nous avons donc analysé la régulation d'IRG-1 dans le cerveau de souris porteuses de tumeurs intracérébrales avant et après application de traitements pro-inflammatoires. L'environnement tumoral est

régulièrement décrit comme immunodéprimé (Gomez et Kruse, 2006) et nos résultats mettent en évidence une expression atténuée d'IRG-1 suite à une injection d'IFN γ dans ce contexte. En revanche, les CpG-ODN s'avèrent très efficaces pour ré-induire l'expression d'IRG-1, ce qui se traduit à terme par une augmentation du temps de survie de l'animal voire le rejet de la tumeur (Donnou *et al.*, en préparation). Une combinaison CpG-ODN et IFN γ a permis d'augmenter considérablement l'expression d'IRG-1 mais s'est traduite par une mort précoce des animaux, certainement en raison d'une réponse inflammatoire et cytotoxique trop violente (Adachi *et al.*, 2006). Ces résultats vont aussi dans le sens des travaux effectués par Li et collègues (2006), montrant une forte expression d'IRG-1 dans les cellules microgliales neurotoxiques et une absence d'expression dans les cellules neuroprotectrices dans divers modèles de pathologies cérébrales.

Malgré toutes ces données, la fonction d'IRG-1 n'est toujours pas connue. Les seules données disponibles montrent un rôle important d'IRG-1 dans l'implantation embryonnaire puisque le blocage de son expression empêche la nidation de l'œuf (Chen *et al.*, 2003; Cheon *et al.*, 2003; Catalano *et al.*, 2005). Les travaux de Basler et collègues (2006) ont également montré une corrélation entre le blocage de la fusion du lysosome avec le phagosome dans des macrophages infectés par des mycobactéries et une diminution de l'expression d'IRG-1, suggérant une possible implication de celui-ci dans ce processus.

Afin de mieux préciser sa fonction, la technologie de l'interférence d'ARN est actuellement en cours de mise au point au laboratoire.

DISCUSSION

Les cellules microgliales sont les principales cellules immunocompétentes résidentes du système nerveux central mais restent encore très mal caractérisées à l'heure actuelle. D'origine myéloïde, elles expriment constitutivement CD11b ainsi qu'un faible niveau de CD45. Colonisant très tôt le parenchyme nerveux, elles assurent chez le fœtus le remodelage du tissu nerveux, régulent la survie des neurones (Marin-Teva *et al.*, 2004) et ont donc une grande capacité de phagocytose (Giulian et Baker, 1986). Chez l'adulte, elles deviennent quiescentes et ont un phénotype moins activé que les autres macrophages de l'organisme, en exprimant de très faibles niveaux des molécules du CMH cl.I ou II ainsi que des co-stimulateurs de la famille B7 (Ford *et al.*, 1995). En cas de perturbation même mineure de leur environnement, elles s'activent, migrent sur le site de la lésion, prolifèrent puis expriment plus fortement les molécules nécessaires à la présentation de l'antigène (Aloisi, 2001; Mack *et al.*, 2003; Rock *et al.*, 2004). Elles changent également de morphologie et perdent petit à petit les prolongements caractérisant leur état quiescent pour adopter une morphologie de type macrophage (Gehrmann *et al.*, 1995). En cas de neurodégénérescence, des cellules immunitaires périphériques sont susceptibles d'infiltrer le parenchyme nerveux et en particulier des monocytes se différenciant *in situ* en macrophages. Un des problèmes majeurs en neuroimmunologie est de réussir à différencier sans ambiguïté ces macrophages des cellules microgliales activées (Guillemin et Brew, 2004).

Au laboratoire, une banque soustractive obtenue par l'amplification de la différence représentative entre deux clones de cellules microgliales activées par l'IFN γ avait permis d'isoler seize ADNc (Mahe *et al.*, 2001). Nous avons donc cherché si parmi ces messagers, certains pouvaient permettre la discrimination entre cellules microgliales et macrophagiques. L'analyse initiale par Northern blot a révélé que trois messagers (1F3, 1H4 et 1D12) étaient absents de la lignée macrophagique J774 ainsi que des macrophages péritonéaux primaires, ce qui a ensuite été confirmé par RT-PCR, technique nettement plus sensible. Ces trois molécules n'ont également pas été détectées dans des macrophages primaires purifiés de la rate, ni dans les macrophages dérivant de monocytes sanguins, plus susceptibles de pénétrer dans le parenchyme nerveux. Par ailleurs, aucune n'est exprimée de façon constitutive dans les monocytes, précurseurs des macrophages. Elles permettraient donc une discrimination précoce entre cellules microgliales et macrophages au cours d'une pathologie neurodégénérative. L'IFN γ , le TNF α et l'IL-10 sont trois cytokines ayant un rôle actif dans le système nerveux central, que ce soit pour induire l'activation des cellules microgliales, réguler l'activité neuronale ou encore terminer une réponse immunitaire, mais aucune n'a

permis d'induire l'expression de 1F3, 1H4 ou 1D12 dans les macrophages, suggérant que ces messagers puissent rester discriminant même dans ces environnements cytokiniques particuliers. Cependant, les réactions immunes sont caractérisées par un environnement beaucoup plus complexe avec de multiples facteurs sécrétés par les différentes cellules présentes et il ne peut pas être exclu que l'un ou l'autre des messagers soit induit dans ces conditions.

Nos résultats montrent également que ces trois messagers sont exprimés dans la microglie adulte primaire et *ex vivo*. *In vitro*, ils se répartissent différemment dans les lignées EOC, 1F3 étant présent dans toutes les lignées EOC testées, alors que 1H4 serait restreint à l'EOC20 et 1D12 à l'EOC20 activée. L'existence de sous populations microgliales étant soupçonnée, ces molécules pourraient être de nouveaux marqueurs permettant de dévoiler ces sous populations *in situ*. Ainsi, il serait particulièrement intéressant de pouvoir analyser l'expression de 1F3, 1H4 et 1D12 *in situ*, au cours du développement d'une maladie neurodégénérative telle que l'EAE. S'ils restaient discriminants aux différentes phases de la maladie, cela permettrait de mieux analyser la localisation respective de la microglie, voire de sous populations microgliales, par rapport aux macrophages et peut-être de déduire certaines fonctions différentes pour ces types cellulaires.

La molécule 1F3 correspond à la sulfatase extracellulaire sulf-2. Cette enzyme, active à pH neutre, fonctionne à la surface de la cellule qui la secrète ou peut être excrétée dans le milieu. Elle élimine les groupements sulfate des chaînes d'héparane sulfate constituant la matrice extra-cellulaire et peut également avoir pour substrat l'héparine (Morimoto-Tomita *et al.*, 2002). De façon intéressante, le niveau de sulfatation des héparanes détermine leur possibilité de lier différentes molécules telles que des cytokines, chimiokines ou encore facteurs de croissance (Uchimura *et al.*, 2006). Ainsi, sulf-2 permet de réguler la prolifération des cellules, l'angiogenèse ou encore la disponibilité des cytokines dans le microenvironnement immédiat de la cellule la secrétant. Par conséquent, l'expression constitutive de sulf-2 dans la microglie suggère que cette molécule soit impliquée dans le maintien de l'homéostasie du parenchyme nerveux. De façon intéressante, la dérégulation de cette enzyme peut avoir des conséquences très néfastes et sulf-2 est considéré comme un facteur de risque lié aux tumeurs cérébrales notamment (Johansson *et al.*, 2004). Les cellules microgliales infiltrant très largement les gliomes, il serait intéressant de voir si elles peuvent contribuer par l'expression de Sulf-2 à favoriser la prolifération et l'angiogenèse associée à ces tumeurs.

Le messager 1H4 correspond à la protéase nexine 1, inhibiteur des activateurs de la cascade de dégradation de la matrice extracellulaire et faisant partie de la famille des serpinines. Elle avait déjà été décrite au sein du système nerveux central notamment dans les astrocytes (Choi *et al.*, 1990), mais pas jusqu'alors dans la microglie. La protéase nexine est aussi un puissant inhibiteur de la thrombine qui présente de nombreux effets dans le système nerveux central : prolifération astrocytaire, blocage de la croissance neuritique, clivage de la protéine basique de la myéline, chimiotactisme des monocytes, activation des cellules endothéliales, perméabilisation des vaisseaux sanguins. En bloquant ces activités, la protéase nexine 1 aurait plutôt des fonctions anti-inflammatoires, notamment au cours de l'EAE, même si des expériences complémentaires sont nécessaires pour en être certain (Beilin *et al.*, 2005). En effet, cette protéine peut avoir des conséquences aussi bien bénéfiques que néfastes sur la population neuronale, le tout dépendant généralement de sa concentration (Smirnova *et al.*, 1996; Luthi *et al.*, 1997; Meins *et al.*, 2001; de Castro Ribeiro *et al.*, 2006). En bloquant la dégradation de la matrice extracellulaire, la protéase nexine peut également réguler la migration des cellules l'exprimant, suggérant que les cellules microgliales exprimant 1H4 soient moins mobiles que les cellules ne l'exprimant pas. Il est de ce fait tentant de penser que les cellules microgliales 1H4⁺ soient proches des vaisseaux sanguins (localisation juxtavasculaire par exemple) et régulent précocement l'activité de la thrombine, ainsi que l'infiltration leucocytaire, à l'image de la forte expression de la protéase nexine 1 dans les pieds astrocytaires au contact des vaisseaux (Choi *et al.*, 1990).

Le troisième messenger permettant de discriminer entre microglie et macrophages est 1D12. Toujours pas identifié à l'heure actuelle, il présente 90% d'homologie avec la protéine de rat liant les fragments Fc des immunoglobulines G (FcγBP). Bien que les tailles observées sur les Northern Blot soit très différentes, il est possible que 1D12 représente l'homologue souris de cette FcγBP. La FcγBP peut lier toutes les IgG, est produite par certaines cellules du colon et est sécrétée dans le mucus de la lumière intestinale où elle participe certainement à la protection immunitaire de l'intestin chez l'homme (Harada *et al.*, 1997). Elle a été également décrite dans la thyroïde où son niveau d'expression serait un marqueur diagnostique possible de différents types de tumeurs (O'Donovan *et al.*, 2002) et son niveau d'expression sérique est plus élevé chez les patients atteints de maladies autoimmunes (Kobayashi *et al.*, 2001). Cependant, la fonction de cette protéine dans ces différents organes et par conséquent dans le cerveau est inconnue. Son expression sélective dans l'EOC20, au même titre que la protéase nexine, pourrait signifier qu'elle joue un rôle dans la protection du parenchyme nerveux contre l'infiltration d'IgG potentiellement autoréactives.

Ces trois messagers pourraient donc représenter de nouveaux marqueurs de discrimination entre cellules microgliales et macrophagiques. Jusqu'à présent, aucun outil de ce type n'a encore été développé chez la souris. La seule autre étude s'intéressant à ce problème a utilisé une technique de protéomique entre des cellules microgliales néonatales et différents autres macrophages, sans réussir à identifier de réelles différences (Enose *et al.*, 2005). La seule protéine ayant un profil différent était la superoxyde dismutase, plus exprimée dans les macrophages, mais la microglie pouvant générer une flambée oxydative est susceptible d'exprimer cette protéine après activation. Ainsi, 1F3, 1H4 et 1D12 sont de nouveaux outils moléculaires susceptibles d'apporter de nouvelles informations quant aux fonctions respectives de la microglie et des macrophages. Il serait ainsi particulièrement intéressant de voir si les protéines correspondantes sont exprimées de la même manière et donc de réussir à cloner la séquence de 1D12. Etant donnée leur répartition dans les EOC, il est aussi envisageable que ces molécules permettent de distinguer au moins deux sous-populations microgliales et des expériences de double marquage par hybridation *in situ* et immunohistochimie pourraient être envisagées pour observer la colocalisation ou non des messagers ou protéines.

Lors d'inflammation du parenchyme nerveux, en plus des macrophages périphériques, des cellules dendritiques, absentes d'un cerveau sain, apparaissent. Hormis l'infiltration par des cellules sanguines, l'une des hypothèses pour expliquer leur apparition est qu'elles pourraient dériver des cellules microgliales. En effet, certains auteurs ont montré que la microglie cultivée en présence de GM-CSF pouvait générer une population de cellules de type dendritique, tout au moins *in vitro* (Fischer et Reichmann, 2001; Santambrogio *et al.*, 2001; Ponomarev *et al.*, 2005a). Les cellules obtenues expriment CD11c, CD11b et selon les modèles un faible niveau de CD205, mais par contre n'expriment pas CD8, ce qui les placerait dans la famille des cellules de type myéloïdes (Fischer *et al.*, 2000; Suter *et al.*, 2003). Elles expriment aussi les molécules du CMH cl.II ainsi que des costimulateurs comme CD80 et sont donc capables d'interagir efficacement avec les lymphocytes T naïfs. Cependant, les conséquences de cette interaction semblent dépendre des situations ou des modèles employés : isolées de cerveaux de souris atteintes d'EAE, Fischer et Reichmann en 2001 ont montré que ces cellules étaient capables de faire proliférer des lymphocytes T en test de présentation allogénique ou en présentation antigénique directe, avec une efficacité accrue au pic de la maladie ; peu après, Suter et collègues (2003) ont quant à eux montré que les cellules issues de leur modèle EAE inhibaient la prolifération des cellules T. Lors d'une

infection par le parasite toxoplasme, ces cellules dendritiques semblent encore plus performantes que les cellules spléniques et secrètent beaucoup d'IL-12 (Fischer *et al.*, 2000) alors que dans un modèle d'ischémie, elles restent loin des lésions et ne semblent même pas interagir avec des lymphocytes T (Reichmann *et al.*, 2002). Ainsi, à l'image des cellules microgliales, les cellules dendritiques « cérébrales » pourraient avoir des fonctions bénéfiques comme néfastes, et contribuer à l'inflammation ou au contraire inhiber l'activation des lymphocytes T. Pour le moment, il n'existe pas de moyen de distinguer ces cellules d'origine microgliale des cellules sanguines infiltrant le parenchyme nerveux. Aussi, il serait intéressant d'exploiter à nouveau la banque soustractive du laboratoire pour voir si une ou plusieurs molécule(s) pourraient être spécifiquement exprimée(s) par ces cellules. En effet, des analyses préliminaires ont montré que si tous les messagers étaient présents dans les cellules dendritiques générées à partir de moelle osseuse, leur répartition était inégale dans diverses sous populations dendritiques spléniques. Malheureusement, dans la mesure où les cellules microgliales sont difficiles à cultiver et qu'elles ne génèrent qu'une certaine proportion de cellules dendritiques filles, il est très compliqué d'arriver à isoler suffisamment de ces cellules pour les analyser plus précisément. L'immortalisation de quelques cellules permettrait donc de travailler plus facilement.

Ainsi, cellules microgliales et dendritiques ont un lien particulier. Or, les cellules dendritiques offrent des potentiels très intéressants dans le traitement de diverses pathologies et en particulier des tumeurs. En effet, ce sont les cellules présentatrices d'antigènes les plus performantes dans la mesure où elles migrent vers les ganglions lymphatiques et sont capables d'activer les lymphocytes T naïfs par présentation antigénique classique ou par présentation croisée. Ce dernier mode de présentation de l'antigène est particulièrement important dans le cadre de la réponse anti-tumorale puisqu'il permet d'activer directement les lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de la tumeur. Il avait déjà été montré que la présentation croisée pouvait avoir lieu dans le parenchyme nerveux et était suffisamment efficace pour éliminer une tumeur située dans cet environnement immunologique particulier (Walker *et al.*, 2000; Calzascia *et al.*, 2003; Calzascia *et al.*, 2005). Cependant, les cellules responsables de l'activation des lymphocytes T n'avaient pas été identifiées. Les candidats potentiels étaient les cellules dendritiques et les macrophages infiltrants, dont la capacité à présenter les antigènes de cette manière a déjà été démontrée (Brode et Macary, 2004) et/ou les cellules microgliales, dont la capacité de présentation croisée n'avait jamais été étudiée.

En utilisant l'antigène modèle ovalbumine et des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de cet antigène, nous avons démontré pour la première fois la capacité de la microglie à effectuer la présentation croisée. La plupart du temps, les équipes travaillant sur la microglie choisissent comme modèle les cellules primaires issues de cultures mixtes de cellules néonatales. Or, ces cellules n'ont pas nécessairement les mêmes propriétés que les cellules adultes, enfermées dans un environnement immunosuppresseur (Floden et Combs, 2006). De ce fait, nous avons inclus dans notre étude la microglie adulte primaire, les cellules primaires néonatales issues de culture mixte et une lignée microgliale. La présentation croisée de l'ovalbumine par les trois types cellulaires provoque la sécrétion d'IL-2 par un hybridome T CD8⁺. Cependant, l'hybridome ayant une dépendance faible pour le signal costimulateur, nous avons reproduit nos expériences sur des lymphocytes T naïfs isolés de souris OT-1, avec un résultat similaire. Les cellules microgliales utilisent une ou plusieurs voies de présentation croisée dépendant au moins en partie du protéasome et du complexe TAP, ce qui permet d'exclure *a priori* la voie vacuolaire de présentation croisée pour cet antigène modèle (Guermonprez et Amigorena, 2005; Rock et Shen, 2005).

Toutes les microglies testées ont donc été capables d'activer les lymphocytes T CD8, mais avec une efficacité différente. La lignée C8-B4 (Alliot *et al.*, 1996) est systématiquement la plus efficace. De façon intéressante, elle présente le phénotype le plus activé des trois cellules, avec une expression constitutive des molécules du CMH ainsi que de CD80 et CD86. Les cellules néonatales sont un peu moins performantes. Elles ont un niveau d'activation intermédiaire, mais elles sont généralement décrites comme ayant une grande capacité à endocyter/phagocyter les antigènes, ce qui peut expliquer leur efficacité à présenter les antigènes par la voie croisée. Quant aux cellules microgliales adultes que nous avons isolées, elles sont quiescentes et n'expriment pas ou très peu les molécules nécessaires à la présentation de l'antigène, ce qui peut être relié à leur plus faible performance. Par ailleurs, il est possible que diverses sous populations microgliales existent et qu'elles n'aient pas la même capacité à présenter les antigènes, à l'image de ce qui est rencontré pour les cellules dendritiques où les cellules CD8⁺ semblent plus efficaces (Heath *et al.*, 2004; Schnorrer *et al.*, 2006). De ce fait, les résultats obtenus avec la microglie adulte pourraient ne représenter l'activité que d'une sous population donnée, ce qui expliquerait également la présentation croisée modeste obtenue avec ces cellules. Dans ce sens, il serait aussi intéressant de pouvoir utiliser les données de la banque soustractive pour trier diverses sous-populations potentielles et d'analyser leur capacité respective à présenter les antigènes.

En injectant l'ovalbumine directement dans le cerveau et en isolant les cellules microgliales par la suite, nous avons également montré que la microglie *ex vivo* était capable de présenter l'antigène aux lymphocytes T CD8⁺ spécifiques, malgré l'environnement particulier du système nerveux central. *In vivo*, l'issue de la présentation croisée peut être double : soit induction de la prolifération du lymphocyte T (« cross-priming »), soit élimination de celui-ci (« cross-tolerance »)(Heath et Carbone, 2001). L'environnement cytokinique, le type de cellule présentatrice d'antigènes et le type d'antigène ont un rôle prépondérant dans cette issue. Il est donc probable que la microglie selon les circonstances puisse induire une tolérance (parenchyme non activé) ou une activation (situation inflammatoire).

Dans l'idée d'améliorer sa capacité de présentation croisée et de favoriser si possible l'activation des lymphocytes T, nous avons appliqué divers stimuli pro-inflammatoires sur la microglie adulte. Les interférons de type I sont très efficaces pour activer les cellules présentatrices d'antigènes et permettent même de favoriser la présentation antigénique croisée des cellules dendritiques (Lapenta *et al.*, 2006). Quant à l'IFN γ , il augmente l'expression des molécules de CMH ainsi que des costimulateurs et favorise donc la fonction de présentation de l'antigène (Aloisi *et al.*, 1999a). Cependant, aucun de ces stimulus n'a permis dans nos conditions d'améliorer significativement l'efficacité de la microglie à « cross-présenter » l'antigène. Les oligonucléotides CpG sont aussi des stimulateurs efficaces du système immunitaire, y compris dans le système nerveux central où les cellules microgliales expriment leur récepteur TLR9 (Dalpke *et al.*, 2002; Kuchtey *et al.*, 2005). Là encore, la stimulation par les CpG-ODN seuls n'a pas eu d'effet visible sur la microglie. Une autre alternative pour optimiser les fonctions de présentation antigénique de la microglie est de les stimuler au préalable par du GM-CSF, ce qui leur permet d'acquérir des propriétés proches des cellules dendritiques (Fischer et Reichmann, 2001; Santambrogio *et al.*, 2001). La combinaison GM-CSF et CpG s'est ainsi révélée efficace pour améliorer significativement la capacité de la microglie à présenter l'antigène aux lymphocytes T CD8⁺. Il serait particulièrement intéressant de ré-analyser le phénotype de la microglie soumise à cette stimulation afin d'apprécier les éventuels changements concernant l'expression des molécules du CMH et des costimulateurs associés.

Par ailleurs, il sera important de réussir à mettre en évidence la présentation croisée de la microglie *in vivo*. Pour cela, des souris chimères dans lesquelles seule la microglie exprimera les molécules du CMH cl.I seront générées. Après injection de l'antigène dans le cerveau, la réponse des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de celui-ci sera évaluée et

permettra de déterminer la réelle capacité des cellules microgliales à assurer la présentation croisée dans le contexte du système nerveux central. En effet, leurs potentiels de présentation croisée et de dérive en cellule dendritique pourraient s'avérer intéressants pour lutter contre les tumeurs cérébrales.

Les tumeurs cérébrales sont à l'heure actuelle de pronostic défavorable : leur site d'implantation ne permet pas toujours l'exérèse et limite l'utilisation de la radio ou chimiothérapie. Une alternative intéressante est donc l'immunothérapie active, un traitement non toxique permettant d'induire de façon spécifique le rejet tumoral et une mémoire immunologique évitant les récives. Bien que la vaccination par les cellules dendritiques soit très intéressante, notre choix s'est porté sur une immunothérapie active mais non spécifique d'antigènes pour plusieurs raisons : (1) tout d'abord, il n'existe pas encore d'antigène tumoral spécifique aux tumeurs cérébrales bien défini, même si de plus en plus de publications mettent en évidence des antigènes communs à d'autres tumeurs exprimés chez certains patients (Sasaki *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004; Schmitz *et al.*, 2007 ; (2) il est très difficile d'obtenir des quantités suffisantes de matériel tumoral pour envisager le chargement des cellules dendritiques, d'autant plus que les gliomes dérivent très rapidement en culture et changent donc de profil antigénique (Bilzer *et al.*, 1991; Imai *et al.*, 1993) ; (3) le choix de la population de cellules dendritiques à injecter est problématique, notamment dans le cerveau où ces cellules sont normalement absentes ; (4) une immunothérapie non spécifique évite toutes les déviations introduites par l'expérimentateur (choix de l'antigène, choix de la cellule dendritique, méthode de chargement de l'antigène...) et laisse les cellules présentatrices d'antigènes *in situ* se charger physiologiquement avec un antigène donné ; (5) le transfert en clinique paraît plus aisé dans la mesure où le traitement ne demande pas de protocole complètement individualisé.

De plus, il nous semble évident que pour pouvoir surpasser l'immunosuppression de la tumeur combinée à celle liée au système nerveux central lui-même, il faut envisager une multithérapie levant simultanément différents points de tolérance sans basculer pour autant vers l'autoimmunité.

Dans le but d'étudier de tels protocoles, nous avons développé deux modèles murins de tumeurs intra-cérébrales. Dans la mesure où les modèles de gliomes chez la souris ne proposent pas beaucoup d'outils d'analyse, nous avons opté pour le mélanome B16-F10_{gp33-41}, transfecté par le peptide 33-41 de la glycoprotéine du LCMV, très agressif, et pour le thymome E.G7 exprimant l'ovalbumine, plus immunogène. Il existe en effet pour chacun de ces modèles des tétramères permettant de repérer facilement la présence de lymphocytes T

spécifiques de la tumeur et des souris transgéniques ayant des lymphocytes T CD8⁺ avec un TCR spécifique de l'antigène tumoral (souris P14 pour le gp33-41 et souris OT-1 pour l'ovalbumine), laissant l'opportunité de mieux caractériser les réponses immunes antigènes spécifiques au sein du système nerveux central.

Dans un premier temps, afin de mieux évaluer par la suite les conséquences de différents traitements, nous avons caractérisé nos deux modèles de tumeurs implantées dans le cerveau de souris adultes. Après implantation de 2000 cellules B16-F10, les animaux décèdent dans un délai de quinze jours. Le second modèle, moins agressif, offre un délai de survie plus important, de l'ordre de 20 à 25 jours pour le même nombre initial de cellules. Les analyses effectuées par immunohistochimie au terme de la maladie révèlent pour les deux modèles une infiltration très modeste par les cellules immunitaires à l'exception notable de la microglie. Dans le modèle B16-F10, quelques cellules CD4⁺ (lymphocytes T auxiliaires), CD8⁺ (lymphocytes T cytotoxiques), CD11c⁺ (cellules dendritiques) ou CMH cI.II⁺ (cellules présentatrices d'antigènes) ont pu être observées, essentiellement en périphérie de la masse tumorale et/ou à proximité des vaisseaux sanguins. En revanche, très peu de cellules ont été trouvées au cœur de la tumeur. Concernant le modèle E.G7, la situation est à peu près similaire à l'exception remarquable d'un fort marquage CD11b, CD11c, CMH cI.II et CD4 occupant une grande partie de la tumeur. En l'absence de marquage CD3 ou CD8, il semble peu probable que les cellules CD4⁺ soient des lymphocytes T. Elles représentent plus certainement des cellules microgliales susceptibles d'exprimer ce marqueur (Dick *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 1998). De même, il semblerait étonnant, dans la mesure où les autres cellules sanguines sont très peu représentées, que le marquage CD11c soit dû à une infiltration massive par les cellules dendritiques périphériques. Il serait donc possible que les cellules microgliales aient dérivé en cellules dendritiques. Pourtant, malgré cette présence importante de cellules dendritiques, la tumeur n'est pas éliminée, suggérant que ces cellules présentatrices d'antigènes infiltrantes aient adopté un phénotype immunosuppresseur. L'effet du surnageant de cette tumeur sur la différenciation des cellules microgliales va donc être analysé au laboratoire.

Nos résultats sont ainsi en accord avec la plupart des études sur les tumeurs cérébrales montrant l'intervention limitée du système immunitaire périphérique, par rapport aux cellules microgliales (Badie et Schartner, 2001; Strik *et al.*, 2004). Dans ce sens, il serait intéressant de trouver un moyen permettant de recruter les cellules immunitaires périphériques et en même temps de réactiver le système immunitaire local. Cependant, il paraît indispensable de réussir auparavant à lever au moins en partie l'immunosuppression locale. L'un des

mécanismes d'échappement le plus important décrit récemment est l'existence de lymphocytes T régulateurs CD4⁺ présents au site même de la tumeur (Woo *et al.*, 2002) ou parmi les cellules sanguines des patients atteints notamment de gliomes (Andaloussi et Lesniak, 2006; Fecci *et al.*, 2006). Ceux-ci sont capables d'induire une tolérance spécifique d'antigène (Nomura et Sakaguchi, 2005; Wang, 2006a; Wang, 2006b) et d'inhiber les fonctions effectrices des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de la tumeur (Mempel *et al.*, 2006). La déplétion de ces cellules s'avère ainsi généralement bénéfique dans le cadre de traitements anti-tumoraux, ce qui a été montré sur plusieurs modèles de tumeurs périphériques (Onizuka *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 2002; Nagai *et al.*, 2004; Knutson *et al.*, 2006). Cependant, au début de ce travail, leur implication dans le système nerveux central n'avait pas été mise en évidence. Aussi, nous avons dans un premier temps analysé les conséquences de la déplétion de ces cellules à l'aide d'un anticorps anti-CD25 sur la croissance des deux types de tumeurs. Les résultats obtenus avec le modèle B16-F10 révèlent une efficacité très limitée de ce traitement sur une tumeur agressive avec dans le meilleur des cas un temps de survie amélioré d'environ 10%. Ces résultats sont cependant en accord avec une étude réalisée par Nagai et collaborateurs (2004) montrant que la déplétion des cellules CD25 n'avait pas d'effet sur la croissance de la tumeur B16-F10 implantée en sous-cutané sauf si elle était combinée avec une thérapie génique à l'IL-12, montrant l'intérêt de cette déplétion en tant que traitement adjuvant. En revanche, les résultats obtenus avec les cellules E.G7 sont nettement plus positifs dans la mesure où 80% des animaux traités de cette manière ont été capables de contrôler la croissance de la tumeur et de l'éliminer totalement. Nos résultats sont ainsi en accord avec des données obtenues en clinique. En effet, chez l'homme, une protéine de fusion entre l'IL-2 et une toxine diphtérique (« denileukin diphtitox, ONTAK ») a été évaluée en test clinique (Foss, 2006) et semble être intéressante essentiellement contre les lymphomes (Dang *et al.*, 2004; Frankel *et al.*, 2006), alors qu'elle n'a donné aucun résultat probant dans le cas de mélanomes (Attia *et al.*, 2005). Une nouvelle molécule, « LMB-2 », générée selon le même principe, a été évaluée *in vitro* et permettrait d'éliminer les lymphocytes FoxP3⁺ en épargnant les autres. Mais cette dernière n'a pas encore été testée *in vivo* (Attia *et al.*, 2006). Nos résultats sont également en accord avec une autre étude réalisée très récemment chez des souris porteuses d'un gliome où la déplétion des lymphocytes T régulateurs améliore le temps de survie des animaux, sans pour autant les guérir (El Andaloussi *et al.*, 2006a). Par ailleurs, des études récentes ont montré que certains agonistes des TLR, en plus de leur fonction pro-inflammatoire, étaient capables de réverser les fonctions suppressives des lymphocytes T régulateurs et pourraient donc représenter des molécules thérapeutiques prometteuses. Dans

ce sens, il pourrait être intéressant de comparer les effets de la déplétion des lymphocytes T régulateurs CD25⁺ par l'anticorps PC61 et ceux obtenus par notamment les agonistes du TLR2 et du TLR8 (Peng *et al.*, 2005; Suttmuller *et al.*, 2006).

Cette thérapie, bien qu'encourageante, n'est pourtant pas suffisante pour traiter les tumeurs implantées dans le cerveau des animaux. En effet, une autre cause majeure de la tolérance pourrait être la non maturation des cellules dendritiques. Une voie prometteuse pour provoquer leur maturation est de leur donner le signal de danger qui leur manque dans le contexte tumoral en mimant par exemple une infection. Parmi les différents ligands microbiens des TLR identifiés, les CpG-ODN, agonistes du TLR9, nous paraissent très intéressants pour leurs différentes propriétés immunostimulatrices. Afin de favoriser une réponse pro-inflammatoire, nous avons donc envisagé une thérapie combinant déplétion des lymphocytes T régulateurs et injection d'oligodéoxynucléotides CpG (CpG-ODN). L'intérêt des CpG-ODN est qu'ils permettent d'activer les différents bras de la réponse immunitaire (Weiner, 2000). Il existe cependant différentes classes de CpG-ODN n'ayant pas les mêmes propriétés sur les cellules immunitaires, certains (classe A), plus efficaces pour activer les cellules NK et d'autres, les plus utilisés (classe B), permettant aussi d'activer les lymphocytes B, les deux favorisant l'activation des cellules dendritiques. Les CpG-ODN de la classe C, activent l'ensemble de ces types cellulaires, mais sont moins bien connus (Carpentier *et al.*, 2003; Vollmer *et al.*, 2004; Abel *et al.*, 2005). Nous avons donc choisi un CpG-ODN de la classe B déjà décrit pour bien fonctionner en tant qu'adjuvant en immunothérapie anti-tumorale chez la souris (CpG-1826), que ce soit dans des modèles de fibrosarcomes (Mason *et al.*, 2005), de mélanome (Switaj *et al.*, 2004) ou encore de neuroblastome (Sandler *et al.*, 2003).

Lorsque qu'un tel traitement, combinant déplétion des lymphocytes T régulateurs et injection de CpG-ODN, est appliqué sur les tumeurs implantées dans le flanc de l'animal, les résultats sont encourageants puisque le temps avant de détecter une masse palpable B16-F10 est doublé chez les animaux même si ceux-ci développent invariablement une tumeur par la suite. Par contre, lorsque les cellules E.G7 sont implantées en périphérie, ce traitement provoque un rejet systématique de la tumeur. Dans le cas d'une implantation intracérébrale, aucun bénéfice net n'a été observé sur la tumeur B16 et des expériences complémentaires sont nécessaires pour optimiser le traitement sur cette tumeur. Concernant la lignée E.G7, le traitement combiné n'améliore pas les résultats obtenus avec la déplétion des lymphocytes T régulateurs seuls. Il est possible que l'absence de synergie entre déplétion des lymphocytes T CD4⁺CD25⁺ et CpG-ODN soit due au fait que les CpG-ODN ont aussi un effet indirect sur les

lymphocytes T régulateurs en rendant les lymphocytes T effecteurs insensibles à leur suppression (von Boehmer, 2005). Pourtant, les CpG-ODN ont un effet positif puisque lorsqu'ils sont utilisés seuls, ils entraînent un temps de survie de 30% supérieur à celui des animaux sans traitement et surtout permettent à 30% des animaux d'éliminer la tumeur. Ces résultats montrent encore une fois que les réponses immunitaires ne peuvent pas évoluer tout à fait de la même manière dans la périphérie et dans l'environnement particulier du parenchyme nerveux (Proescholdt *et al.*, 2001).

Dans un modèle de gliome chez le rat, Carpentier et collaborateurs (2000) avaient obtenu un rejet de la tumeur chez 30 à 88% des animaux par un simple injection de CpG-ODN, dépendant de la dose et du temps d'injection. Dans la même idée, différentes doses et temps d'injection des CpG-ODN sont évalués sur chacun de nos modèles. Récemment, El Andaloussi et collègues (2006b), là aussi en injectant des CpG-ODN, ont doublé le temps de survie de souris porteuses de gliomes GL261, mais ils ont également montré que l'effet était dû à une action pro-apoptotique directe sur la tumeur TLR9⁺. Nos résultats intermédiaires suggèrent donc un effet variable des CpG-ODN en fonction de l'agressivité de la tumeur. L'effet d'autres classes de CpG-ODN ou d'un mélange de plusieurs classes pourrait être évalué sur nos modèles pour voir s'ils offrent de meilleurs résultats.

Par ailleurs, dans la mesure où les deux modèles utilisés expriment un antigène cible, il serait intéressant de voir si le fait d'injecter l'antigène en même temps que les CpG-ODN permet d'augmenter la réponse anti-tumorale. En effet, nos deux modèles s'avèrent plutôt compacts (notamment la tumeur B16-F10) et peut être que les antigènes ne sont pas suffisamment accessibles aux cellules présentatrices d'antigènes. Si cette stratégie s'avère payante, l'injection d'un facteur favorisant l'apoptose ou la nécrose des cellules tumorales pourra être envisagée. En effet, la mort par nécrose des cellules tumorales induit la maturation des cellules dendritiques (Sauter *et al.*, 2000) de même que l'apoptose à condition que celle-ci soit accompagnée d'un signal de stress (Feng *et al.*, 2003; Obeid *et al.*, 2007). Par ailleurs, les travaux de Meng et collaborateurs (2005) avaient montré l'intérêt de la radiothérapie pour libérer plus d'antigènes tumoraux et favoriser le rejet d'un gliome expérimental chez le rat. Les agents chimiothérapeutiques pourraient également s'avérer particulièrement utiles en tant qu'adjuvant dans cette optique, notamment en étant vectorisés pour permettre une libération directement dans le lit tumoral et réduire les effets secondaires (Fournier *et al.*, 2003; Garcion *et al.*, 2006).

De plus, étant donné nos résultats sur la présentation croisée de la microglie adulte, il serait intéressant de tester un protocole combinant déplétion des lymphocytes T régulateurs,

injection de CpG-ODN et GM-CSF afin de recruter un maximum de cellules immunitaires et de favoriser la présentation croisée aux lymphocytes T cytotoxiques. L'analyse de la présence des lymphocytes T spécifiques des antigènes tumoraux dans les ganglions cervicaux et *in situ* dans le cerveau permettra non seulement d'évaluer leur activation mais également leur recrutement. Si celui-ci s'avère toujours insuffisant, il pourrait être envisagé l'utilisation de chimiokines en complément, telles que CXCL9 et 10 ayant pour récepteur CXCR3 et qui semblent importantes pour le recrutement et le maintien des lymphocytes T dans le cerveau (Rebenko-Moll *et al.*, 2006) ou encore MIP3 α et β *a priori* impliquées dans la migration intracérébrale des monocytes/macrophages au cours de l'EAE (Serafini *et al.*, 2000; Trebst *et al.*, 2001). Il sera également important d'appliquer ces thérapies sur des gliomes par comparaison et sur des tumeurs déjà établies. En effet, l'injection des CpG-ODN et la déplétion des lymphocytes T régulateurs de façon simultanée à l'implantation de la tumeur s'apparente plus à un cas où la masse tumorale aurait été éliminée par chirurgie et où l'on chercherait à éliminer les cellules tumorales résiduelles.

Au cours de la mise en place de telles thérapies, il n'existe pas vraiment de moyen prédictif de déterminer si le traitement a ou non un effet quelconque sur le système immunitaire, il faut généralement attendre que l'animal décède ou non. En particulier, il est important de pouvoir suivre l'état d'activation des cellules présentatrices d'antigènes qui déterminent en grande partie la réussite ou non de la réponse anti-tumorale. L'expression des molécules du CMH n'est pas un bon marqueur d'activation puisque comme nos résultats notamment l'indiquent, un fort marquage CMH cl.II peut être observé au sein d'une tumeur sans empêcher celle-ci de croître.

Au sein de la banque soustractive, une molécule, identifiée comme l'immune responsive gene 1, montrait un profil d'expression particulier, étant fortement induite ou surexprimée dans toutes les lignées microgliales après stimulation par l'IFN γ (Mahe *et al.*, 2001). Ce travail montrait pour la première fois l'expression de l'IRG-1 au sein de la microglie, la seule autre publication relative à ce messager concernait son induction rapide dans une lignée macrophagique stimulée par le LPS (Lee *et al.*, 1995), suggérant donc qu'IRG-1 puisse représenter un nouveau marqueur d'activation précoce des cellules présentatrices d'antigènes. Nous nous sommes donc intéressés à mieux caractériser cette molécule. Le clonage de la séquence exprimée par les cellules microgliales a révélé des différences importantes avec la séquence précédemment publiée, puisque 3 délétions ou

insertions par rapport à celle-ci provoquaient un décalage dans le cadre de lecture. Nos résultats étaient néanmoins en parfait accord avec la séquence nouvellement publiée du génome murin ainsi qu'avec des résultats de séquençages automatisés disponibles dans les banques de données de NCBI. Une caractéristique importante de ce gène est son très haut niveau de conservation tout au long de l'évolution puisqu'une séquence homologue est retrouvée depuis le xénope (Schmidt et Richter, 2000) et que par exemple entre le rat et la souris, elle présente plus de 99% d'homologies. Utilisant notre séquence murine, nous avons donc cherché son homologue sur le génome humain. Une séquence homologue à plus de 80% sur plus de 1000 pb a pu être identifiée sur le treizième chromosome et associée à celui-ci une prédiction du transcrit. En se basant sur ce dernier, la séquence codante potentielle de l'IRG-1 humaine a été clonée à partir d'une lignée microgliale humaine et de monocytes humains. Dans les deux cas, notre séquençage est parfaitement identique aux prédictions informatiques à l'exception notable d'une région de 156 pb située en 5' absente de notre fragment. La transfection de celui-ci dans les cellules COS ou CHO a permis de repérer une protéine recombinante d'environ 50kD dans le lysat cellulaire, indiquant que notre séquence pouvait être traduite. La région absente pourrait donc suggérer l'existence d'un épissage alternatif pour l'IRG-1 humaine, ou l'oubli d'un intron dans la prédiction informatique.

Les analyses informatiques réalisées à partir de nos séquences n'ont pas permis d'identifier de domaines communs avec d'autres protéines humaines, la seule homologie retrouvée concernant un domaine PrPD bactérien codant pour la méthylcitrate deshydrogénase, dont la fonction potentielle dans les cellules immunitaires n'est pas connue. La séquence IRG-1 est potentiellement glycosylable, mais l'absence d'une région transmembranaire et d'une séquence signal suggèrent une localisation cytoplasmique, confirmée par nos résultats de microscopie confocale et de Western Blot montrant la protéine recombinante uniquement dans le lysat cellulaire. En revanche, elle présente aussi de nombreux sites potentiels de phosphorylation, notamment une tyrosine (position 338 dans notre séquence), suggérant que l'activité de la protéine puisse être régulée de cette manière, ce qui semble confirmé par les travaux récents de Li et collaborateurs (2006).

Afin d'en savoir plus sur sa répartition dans l'organisme, et donc de gagner des indications quant à sa fonction, l'expression d'IRG-1 a été analysée dans des banques de tissus murins et humains. L'IRG-1 est exprimé constitutivement dans la rate des souris, ainsi que dans la rate, les poumons et le thymus de l'homme. Après injection systémique de LPS aux souris, son expression est induite dans le cerveau, ce qui confirme nos précédents

résultats montrant sa présence dans la microglie, ainsi que dans le thymus, le cœur et les poumons où l'expression est due probablement aux macrophages alvéolaires.

La répartition d'IRG-1 plus particulièrement dans les organes lymphoïdes nous a poussé à analyser plus précisément son expression dans les cellules immunitaires. Comme attendu, cette molécule a été détectée dans les cellules microgliales primaires, les macrophages activés et les cellules dendritiques comme précédemment montré (Lee *et al.*, 1995; Mahe *et al.*, 2001; Hoshino *et al.*, 2002). En revanche, pour la première fois, nous avons décrit l'IRG-1 dans les neutrophiles et les cellules NK activés alors qu'il est très faible ou indétectable dans les lymphocytes B et T. Ainsi, IRG-1 serait préférentiellement exprimé par les cellules du système immunitaire inné.

Pour activer les cellules immunitaires innées, les interférons de même que les agonistes des TLR sont classiquement utilisés. Nos résultats montrent une induction rapide (entre une et deux heures) et transitoire de l'IRG-1 dans la microglie par les IFN α et β alors qu'elle est nettement plus soutenue avec l'IFN γ , montrant que ce messager est induit par au minimum STAT1, facteur de transcription commun entre ces trois interférons. Par ailleurs, nous décrivons aussi pour la première fois que tous les agonistes TLR testés sont capables d'induire l'expression d'IRG-1 dans la microglie ainsi que les cellules dendritiques. Nos résultats sont en accord avec l'induction de l'IRG-1 dans des macrophages déficients en TLR2 et TLR4 infectés par *Mycobacterium tuberculosis* suggérant que d'autres récepteurs pouvaient être responsables de cette induction (Shi *et al.*, 2005). Auparavant, seule l'induction par le TLR4 et le TLR9 était connue (Hoshino *et al.*, 2002). Dans ces travaux, les auteurs avaient toutefois montré qu'en plus de la voie MyD88 dépendante, aboutissant à l'activation de NF- κ B, IRG-1 pouvait être exprimé aussi par la voie MyD88 indépendante du TLR4 sous l'influence du facteur de transcription IRF-3. Etant donné que seuls certains TLR aboutissent à la production d'IFN de type I, nos résultats montrent que la signalisation par les TLR peut induire directement IRG-1. Ainsi, IRG-1 pourrait être régulé par STAT-1, NF- κ B ou IRF-3.

Les lymphocytes T expriment également la plupart des TLR (Sobek *et al.*, 2004; Caron *et al.*, 2005) mais ne répondent qu'à certains d'entre eux. Ainsi, Sobek et collègues (2004) ont montré une fonction costimulatrice des agonistes TLR2 chez la souris, alors que Caron et collaborateurs (2005) ont montré un effet direct des agonistes TLR5 et 7/8, en particulier sur les lymphocytes T mémoires effecteurs humains, induisant leur prolifération et la sécrétion d'IFN γ notamment. Néanmoins, nous n'avons pas été en mesure d'induire l'expression d'IRG-1 dans des lymphocytes T murins après stimulation par les agonistes TLR

seuls ou en combinaison avec la stimulation du complexe CD3 et CD28. Ces résultats étonnants suggèrent donc des voies de transduction du signal différentes entre les lymphocytes T et les cellules du système immunitaire inné. Alternativement, il peut être envisagé que les stimulations utilisées ne soient pas optimales pour ce type cellulaire pour réussir à induire IRG-1 et des expériences complémentaires seront donc réalisées.

Malgré l'ensemble de ces résultats, peu d'informations existent quant à la fonction d'IRG-1. Des travaux récents de Li et collègues (2006) montrent que les cellules microgliales fortement activées, avec un potentiel cytotoxique expriment le récepteur de chimiokine CCR9 et IRG-1, alors que les cellules neuroprotectrices sont CXCR3⁺ IRG-1⁻. Dans le cadre d'une immunothérapie anti-tumorale, il paraîtrait donc intéressant d'arriver au phénotype cytotoxique permettant d'éliminer les cellules tumorales.

En se basant sur ces données, nous avons voulu analyser dans les deux modèles de tumeurs développés au laboratoire, la régulation de l'expression d'IRG-1 lors du développement d'une tumeur cérébrale et après application de divers traitements. La présence d'une tumeur établie est associée à une faible expression de l'IRG-1 suggérant la présence de cellules infiltrantes nouvellement activées. Après injection d'IFN γ , l'expression de ce messager est fortement induite dans les cerveaux sains alors qu'elle n'est pas modifiée en présence du lymphome ou du mélanome, montrant que la voie de transduction de l'IFN γ est altérée au sein de la tumeur. Par contre, l'expression d'IRG-1 est largement augmentée après application de CpG-ODN en présence ou en l'absence de tumeur. De façon intéressante, nos résultats précédents avaient montré une survie des animaux ayant été traités par les CpG-ODN seuls, notamment dans le cas de la tumeur E.G7. En combinant les deux stimuli, l'induction d'IRG-1 est nettement plus importante qu'avec les traitements séparés, montrant un effet synergique des voies de transduction des TLR et de l'IFN γ . Dans la tumeur, ce traitement réussit aussi à surpasser l'immunosuppression pesant sur les cellules immunitaires et provoque une très forte augmentation d'IRG-1, suggérant même que la stimulation du TLR9 réussisse à lever l'inhibition de la voie IFN γ , étant données les nombreuses interconnexions entre les deux voies (Schroder *et al.*, 2006). Cependant, ce traitement est très agressif et a provoqué la mort de plus de la moitié des animaux, certainement en raison d'une réponse cytotoxique massive des cellules présentatrices d'antigènes locales (Adachi *et al.*, 2006). Toutes ces données suggèrent que l'IRG-1, dans les modèles pré-cliniques, pourrait être un marqueur prédictif intéressant de l'efficacité et/ou de la cytotoxicité d'un traitement inflammatoire.

D'autres données fonctionnelles concernent des macrophages infectés par diverses souches de mycobactéries : une souche provoquant l'inhibition de l'acidification du phagosome et de sa fusion avec le lysosome (*Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*) entraîne aussi une diminution de l'expression d'IRG-1, l'ARNm ayant une demi-vie raccourcie (Basler *et al.*, 2006). De façon intéressante, ces macrophages présentent aussi une capacité de présentation antigénique altérée (Zur Lage *et al.*, 2003), suggérant qu'IRG-1 puisse intervenir dans l'un ou l'autre de ces phénomènes. Durant le développement tumoral, une étude réalisée par Schartner et collaborateurs (2005) avait montré que les cellules présentatrices d'antigènes infiltrant les tumeurs cérébrales avaient perdu la capacité à augmenter correctement les molécules du CMH cl.II même en réponse à un stimulus pro-inflammatoire. Etant donné nos résultats concernant la régulation d'IRG-1 dans ce contexte, il serait tentant de penser qu'IRG-1 puisse intervenir dans l'apprêtement et/ou la présentation antigénique des cellules présentatrices d'antigènes. Ces hypothèses seront explorées au laboratoire par la mise en place de la technologie de l'interférence d'ARN, qui devrait petit à petit permettre d'en savoir plus quant aux fonctions altérées en l'absence d'IRG-1. Afin de mieux comprendre les diverses fonctions de cette protéine, il pourrait être particulièrement intéressant, à plus long terme, de générer des souris déficientes en IRG-1. Cependant, deux publications avaient mis en évidence que IRG-1 était exprimé pendant une fenêtre très courte lors du développement et intervenait dans l'implantation de l'œuf dans l'utérus (Chen *et al.*, 2003; Cheon *et al.*, 2003), ce qui impliquera de générer des souris déficientes conditionnelles.

En conclusion, les cellules microgliales, principales cellules présentatrices d'antigènes du système nerveux central, présentent un potentiel intéressant dans la lutte contre les tumeurs cérébrales notamment par leur forte tendance à infiltrer ces tumeurs et par leur capacité à dériver en cellules dendritiques, mais elles restent encore assez mal connues à l'heure actuelle. Ce travail aura permis de mettre en évidence trois nouveaux marqueurs moléculaires de discrimination entre ces cellules et les macrophages périphériques chez la souris, outils qui à terme devraient permettre de mieux comprendre le déroulement des réponses immunitaires dans le cerveau. Par ailleurs, nous avons également montré que les cellules microgliales adultes, dans un contexte favorable (environnement inflammatoire mimé par le GM-CSF et les CpG-ODN notamment) étaient capables d'effectuer *in vitro* et *ex vivo* la présentation croisée et donc potentiellement d'activer des lymphocytes T cytotoxiques anti-tumoraux. En utilisant ces données, un traitement anti-tumoral a été développé, basé sur l'injection de ces CpG-ODN et la déplétion des lymphocytes T régulateurs. Celui-ci a montré des effets variables sur les deux modèles de tumeurs intracérébrales développés au cours de ce travail, en permettant la survie des animaux porteurs de la tumeur la plus immunogène alors qu'aucun bénéfice n'était mis en évidence pour la tumeur très agressive. Enfin, l'immune responsive gene 1 aura été mieux caractérisé et s'avère être un marqueur précoce d'activation des cellules immunitaires innées (notamment la microglie) stimulées par les IFN ou les agonistes des TLR. Nos données montrent également que sa régulation au cours du développement tumoral et suite à différents traitements pro-inflammatoires en fait un indicateur intéressant de la réponse du système immunitaire *in vivo*.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Aarum, J., Sandberg, K., Haeberlein, S.L., Persson, M.A., 2003. Migration and differentiation of neural precursor cells can be directed by microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15983-15988.
- Abel, K., Wang, Y., Fritts, L., Sanchez, E., Chung, E., Fitzgerald-Bocarsly, P., Krieg, A.M., Miller, C.J., 2005. Deoxycytidyl-deoxyguanosine oligonucleotide classes A, B, and C induce distinct cytokine gene expression patterns in rhesus monkey peripheral blood mononuclear cells and distinct alpha interferon responses in TLR9-expressing rhesus monkey plasmacytoid dendritic cells. *Clin Diagn Lab Immunol* 12, 606-621.
- Adachi, Y., Kindzelskii, A.L., Petty, A.R., Huang, J.B., Maeda, N., Yotsumoto, S., Aratani, Y., Ohno, N., Petty, H.R., 2006. IFN-gamma primes RAW264 macrophages and human monocytes for enhanced oxidant production in response to CpG DNA via metabolic signaling: roles of TLR9 and myeloperoxidase trafficking. *J Immunol* 176, 5033-5040.
- Adida, C., Berrebi, D., Peuchmaur, M., Reyes-Mugica, M., Altieri, D.C., 1998. Anti-apoptosis gene, survivin, and prognosis of neuroblastoma. *Lancet* 351, 882-883.
- Aguirre, K., Miller, S., 2002. MHC class II-positive perivascular microglial cells mediate resistance to *Cryptococcus neoformans* brain infection. *Glia* 39, 184-188.
- Akaaboune, M., Hantai, D., Smirnova, I., Lachkar, S., Kapsimali, M., Verdier-Sahuque, M., Festoff, B.W., 1998. Developmental regulation of the serpin, protease nexin I, localization during activity-dependent polyneuronal synapse elimination in mouse skeletal muscle. *J Comp Neurol* 397, 572-579.
- Akira, S., 2003. Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 15, 5-11.
- Alarcon, R., Fuenzalida, C., Santibanez, M., von Bernhardi, R., 2005. Expression of scavenger receptors in glial cells. Comparing the adhesion of astrocytes and microglia from neonatal rats to surface-bound beta-amyloid. *J Biol Chem* 280, 30406-30415.
- Algarra, I., Garcia-Lora, A., Cabrera, T., Ruiz-Cabello, F., Garrido, F., 2004. The selection of tumor variants with altered expression of classical and nonclassical MHC class I molecules: implications for tumor immune escape. *Cancer Immunol Immunother* 53, 904-910.
- Alliot, F., Godin, I., Pessac, B., 1999. Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Brain Res Dev Brain Res* 117, 145-152.
- Alliot, F., Lecain, E., Grima, B., Pessac, B., 1991. Microglial progenitors with a high proliferative potential in the embryonic and adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 1541-1545.
- Alliot, F., Marty, M.C., Cambier, D., Pessac, B., 1996. A spontaneously immortalized mouse microglial cell line expressing CD4. *Brain Res Dev Brain Res* 95, 140-143.
- Aloisi, F., 2001. Immune function of microglia. *Glia* 36, 165-179.

- Aloisi, F., De Simone, R., Columba-Cabezas, S., Levi, G., 1999a. Opposite effects of interferon-gamma and prostaglandin E2 on tumor necrosis factor and interleukin-10 production in microglia: a regulatory loop controlling microglia pro- and anti-inflammatory activities. *J Neurosci Res* 56, 571-580.
- Aloisi, F., De Simone, R., Columba-Cabezas, S., Penna, G., Adorini, L., 2000. Functional maturation of adult mouse resting microglia into an APC is promoted by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interaction with Th1 cells. *J Immunol* 164, 1705-1712.
- Aloisi, F., Penna, G., Cerase, J., Menendez Iglesias, B., Adorini, L., 1997. IL-12 production by central nervous system microglia is inhibited by astrocytes. *J Immunol* 159, 1604-1612.
- Aloisi, F., Ria, F., Columba-Cabezas, S., Hess, H., Penna, G., Adorini, L., 1999b. Relative efficiency of microglia, astrocytes, dendritic cells and B cells in naive CD4+ T cell priming and Th1/Th2 cell restimulation. *Eur J Immunol* 29, 2705-2714.
- Aloisi, F., Ria, F., Penna, G., Adorini, L., 1998. Microglia are more efficient than astrocytes in antigen processing and in Th1 but not Th2 cell activation. *J Immunol* 160, 4671-4680.
- Ambar, B.B., Frei, K., Malipiero, U., Morelli, A.E., Castro, M.G., Lowenstein, P.R., Fontana, A., 1999. Treatment of experimental glioma by administration of adenoviral vectors expressing Fas ligand. *Hum Gene Ther* 10, 1641-1648.
- Ambrosini, E., Aloisi, F., 2004. Chemokines and glial cells: a complex network in the central nervous system. *Neurochem Res* 29, 1017-1038.
- Amigorena, S., 1999. présentation antigénique par les cellules dendritiques. *Med/Sciences* 8-9, 931-938.
- Andaloussi, A.E., Lesniak, M.S., 2006. An increase in CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in tumor-infiltrating lymphocytes of human glioblastoma multiforme. *Neuro-oncol* 8, 234-243.
- Archambault, A.S., Sim, J., Gimenez, M.A., Russell, J.H., 2005. Defining antigen-dependent stages of T cell migration from the blood to the central nervous system parenchyma. *Eur J Immunol* 35, 1076-1085.
- Ardavin, C., 2003. Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 3, 582-590.
- Askew, D., Havenith, C.E., Walker, W.S., 1996. Heterogeneity of mouse brain macrophages in alloantigen presentation to naive CD8+ T cells as revealed by a panel of microglial cell lines. *Immunobiology* 195, 417-430.
- Attia, P., Maker, A.V., Haworth, L.R., Rogers-Freezer, L., Rosenberg, S.A., 2005. Inability of a fusion protein of IL-2 and diphtheria toxin (Denileukin Diftitox, DAB389IL-2, ONTAK) to eliminate regulatory T lymphocytes in patients with melanoma. *J Immunother* 28, 582-592.

- Attia, P., Powell, D.J., Jr., Maker, A.V., Kreitman, R.J., Pastan, I., Rosenberg, S.A., 2006. Selective elimination of human regulatory T lymphocytes in vitro with the recombinant immunotoxin LMB-2. *J Immunother* 29, 208-214.
- Baas, D., Prufer, K., Ittel, M.E., Kuchler-Bopp, S., Labourdette, G., Sarlieve, L.L., Brachet, P., 2000. Rat oligodendrocytes express the vitamin D(3) receptor and respond to 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *Glia* 31, 59-68.
- Badie, B., Bartley, B., Schartner, J., 2002. Differential expression of MHC class II and B7 costimulatory molecules by microglia in rodent gliomas. *J Neuroimmunol* 133, 39-45.
- Badie, B., Schartner, J., 2001. Role of microglia in glioma biology. *Microsc Res Tech* 54, 106-113.
- Badie, B., Schartner, J., Prabakaran, S., Paul, J., Vorpahl, J., 2001. Expression of Fas ligand by microglia: possible role in glioma immune evasion. *J Neuroimmunol* 120, 19-24.
- Baghdassarian, D., Toru-Delbauffe, D., Gavaret, J.M., Pierre, M., 1993. Effects of transforming growth factor-beta 1 on the extracellular matrix and cytoskeleton of cultured astrocytes. *Glia* 7, 193-202.
- Bailey, S.L., Carpentier, P.A., McMahon, E.J., Begolka, W.S., Miller, S.D., 2006. Innate and adaptive immune responses of the central nervous system. *Crit Rev Immunol* 26, 149-188.
- Ballabh, P., Braun, A., Nedergaard, M., 2004. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis* 16, 1-13.
- Banati, R.B., Hoppe, D., Gottmann, K., Kreutzberg, G.W., Kettenmann, H., 1991. A subpopulation of bone marrow-derived macrophage-like cells shares a unique ion channel pattern with microglia. *J Neurosci Res* 30, 593-600.
- Banchereau, J., Steinman, R.M., 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.
- Baratelli, F., Lin, Y., Zhu, L., Yang, S.C., Heuze-Vourc'h, N., Zeng, G., Reckamp, K., Dohadwala, M., Sharma, S., Dubinett, S.M., 2005. Prostaglandin E2 induces FOXP3 gene expression and T regulatory cell function in human CD4+ T cells. *J Immunol* 175, 1483-1490.
- Barker, C.F., Billingham, R.E., 1977. Immunologically privileged sites. *Adv Immunol* 25, 1-54.
- Bart, J., Groen, H.J., Hendrikse, N.H., van der Graaf, W.T., Vaalburg, W., de Vries, E.G., 2000. The blood-brain barrier and oncology: new insights into function and modulation. *Cancer Treat Rev* 26, 449-462.
- Basler, T., Jeckstadt, S., Valentin-Weigand, P., Goethe, R., 2006. Mycobacterium paratuberculosis, Mycobacterium smegmatis, and lipopolysaccharide induce different transcriptional and post-transcriptional regulation of the IRG1 gene in murine macrophages. *J Leukoc Biol* 79, 628-638.

- Basu, A., Krady, J.K., Enterline, J.R., Levison, S.W., 2002. Transforming growth factor beta1 prevents IL-1beta-induced microglial activation, whereas TNFalpha- and IL-6-stimulated activation are not antagonized. *Glia* 40, 109-120.
- Basu, A., Krady, J.K., Levison, S.W., 2004. Interleukin-1: a master regulator of neuroinflammation. *J Neurosci Res* 78, 151-156.
- Batchelor, P.E., Liberatore, G.T., Wong, J.Y., Porritt, M.J., Frerichs, F., Donnan, G.A., Howells, D.W., 1999. Activated macrophages and microglia induce dopaminergic sprouting in the injured striatum and express brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 19, 1708-1716.
- Becher, B., Durell, B.G., Noelle, R.J., 2003. IL-23 produced by CNS-resident cells controls T cell encephalitogenicity during the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 112, 1186-1191.
- Becher, B., Prat, A., Antel, J.P., 2000. Brain-immune connection: immuno-regulatory properties of CNS-resident cells. *Glia* 29, 293-304.
- Bechmann, I., Goldmann, J., Kovac, A.D., Kwidzinski, E., Simburger, E., Naftolin, F., Dirnagl, U., Nitsch, R., Priller, J., 2005. Circulating monocytic cells infiltrate layers of anterograde axonal degeneration where they transform into microglia. *Faseb J* 19, 647-649.
- Bechmann, I., Mor, G., Nilsen, J., Eliza, M., Nitsch, R., Naftolin, F., 1999. FasL (CD95L, Apo1L) is expressed in the normal rat and human brain: evidence for the existence of an immunological brain barrier. *Glia* 27, 62-74.
- Bechmann, I., Priller, J., Kovac, A., Bontert, M., Wehner, T., Klett, F.F., Bohsung, J., Stuschke, M., Dirnagl, U., Nitsch, R., 2001. Immune surveillance of mouse brain perivascular spaces by blood-borne macrophages. *Eur J Neurosci* 14, 1651-1658.
- Bechmann, I., Steiner, B., Gimsa, U., Mor, G., Wolf, S., Beyer, M., Nitsch, R., Zipp, F., 2002. Astrocyte-induced T cell elimination is CD95 ligand dependent. *J Neuroimmunol* 132, 60-65.
- Beilin, O., Karussis, D.M., Korczyn, A.D., Gurwitz, D., Aronovich, R., Hantai, D., Grigoriadis, N., Mizrachi-Kol, R., Chapman, J., 2005. Increased thrombin inhibition in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res* 79, 351-359.
- Beissert, S., Schwarz, A., Schwarz, T., 2006. Regulatory T cells. *J Invest Dermatol* 126, 15-24.
- Bellocchio, S., Moretti, S., Perruccio, K., Fallarino, F., Bozza, S., Montagnoli, C., Mosci, P., Lipford, G.B., Pitzurra, L., Romani, L., 2004. TLRs govern neutrophil activity in aspergillosis. *J Immunol* 173, 7406-7415.
- Bertolotto, A., Agresti, C., Castello, A., Manzardo, E., Riccio, A., 1998. 5D4 keratan sulfate epitope identifies a subset of ramified microglia in normal central nervous system parenchyma. *J Neuroimmunol* 85, 69-77.

- Bettinger, I., Thanos, S., Paulus, W., 2002. Microglia promote glioma migration. *Acta Neuropathol (Berl)* 103, 351-355.
- Beyer, M., Schultze, J.L., 2006. Regulatory T cells in cancer. *Blood* 108, 804-811.
- Bilzer, T., Stavrou, D., Wechsler, W., Wohler, B., Keiditsch, E., 1991. Antigen variation in a human glioblastoma: from the primary tumor to the second recurrence, permanent cell line and xenotransplantation tumors. *Anticancer Res* 11, 547-553.
- Blank, C., Gajewski, T.F., Mackensen, A., 2005. Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 54, 307-314.
- Bonomo, A., Kehn, P.J., Shevach, E.M., 1995. Post-thymectomy autoimmunity: abnormal T-cell homeostasis. *Immunol Today* 16, 61-67.
- Boonstra, A., Asselin-Paturel, C., Gilliet, M., Crain, C., Trinchieri, G., Liu, Y.J., O'Garra, A., 2003. Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation. *J Exp Med* 197, 101-109.
- Brode, S., Macary, P.A., 2004. Cross-presentation: dendritic cells and macrophages bite off more than they can chew! *Immunology* 112, 345-351.
- Broderick, C., Hoek, R.M., Forrester, J.V., Liversidge, J., Sedgwick, J.D., Dick, A.D., 2002. Constitutive retinal CD200 expression regulates resident microglia and activation state of inflammatory cells during experimental autoimmune uveoretinitis. *Am J Pathol* 161, 1669-1677.
- Bronte, V., Apolloni, E., Cabrelle, A., Ronca, R., Serafini, P., Zamboni, P., Restifo, N.P., Zanovello, P., 2000. Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells. *Blood* 96, 3838-3846.
- Bronte, V., Chappell, D.B., Apolloni, E., Cabrelle, A., Wang, M., Hwu, P., Restifo, N.P., 1999. Unopposed production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by tumors inhibits CD8+ T cell responses by dysregulating antigen-presenting cell maturation. *J Immunol* 162, 5728-5737.
- Brown, K.A., 2001. Factors modifying the migration of lymphocytes across the blood-brain barrier. *Int Immunopharmacol* 1, 2043-2062.
- Brown, L., Roda, J., Terrell, C., Chaudhury, A.R., Crespino, T., Carson, W.E., Lesinski, G.B., 2006. Interferon alpha and CPG oligodeoxynucleotides elicit additive immunostimulatory and antitumor effects. *Surgery* 140, 297-306.
- Bruce, A.J., Boling, W., Kindy, M.S., Peschon, J., Kraemer, P.J., Carpenter, M.K., Holtsberg, F.W., Mattson, M.P., 1996. Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. *Nat Med* 2, 788-794.
- Bruno, R., Sabater, L., Sospedra, M., Ferrer-Francesch, X., Escudero, D., Martinez-Caceres, E., Pujol-Borrell, R., 2002. Multiple sclerosis candidate autoantigens except myelin

- oligodendrocyte glycoprotein are transcribed in human thymus. *Eur J Immunol* 32, 2737-2747.
- Buhtoiarov, I.N., Lum, H.D., Berke, G., Sondel, P.M., Rakhmilevich, A.L., 2006. Synergistic activation of macrophages via CD40 and TLR9 results in T cell independent antitumor effects. *J Immunol* 176, 309-318.
- Cacci, E., Claasen, J.H., Kokaia, Z., 2005. Microglia-derived tumor necrosis factor-alpha exaggerates death of newborn hippocampal progenitor cells in vitro. *J Neurosci Res* 80, 789-797.
- Calzascia, T., Di Bernardino-Besson, W., Wilmotte, R., Masson, F., de Tribolet, N., Dietrich, P.Y., Walker, P.R., 2003. Cutting edge: cross-presentation as a mechanism for efficient recruitment of tumor-specific CTL to the brain. *J Immunol* 171, 2187-2191.
- Calzascia, T., Masson, F., Di Bernardino-Besson, W., Contassot, E., Wilmotte, R., Aurrand-Lions, M., Ruegg, C., Dietrich, P.Y., Walker, P.R., 2005. Homing phenotypes of tumor-specific CD8 T cells are predetermined at the tumor site by crosspresenting APCs. *Immunity* 22, 175-184.
- Carlson, N.G., Wieggl, W.A., Chen, J., Bacchi, A., Rogers, S.W., Gahring, L.C., 1999. Inflammatory cytokines IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, and TNF-alpha impart neuroprotection to an excitotoxin through distinct pathways. *J Immunol* 163, 3963-3968.
- Caron, G., Duluc, D., Fremaux, I., Jeannin, P., David, C., Gascan, H., Delneste, Y., 2005. Direct stimulation of human T cells via TLR5 and TLR7/8: flagellin and R-848 up-regulate proliferation and IFN-gamma production by memory CD4+ T cells. *J Immunol* 175, 1551-1557.
- Carpentier, A., Laigle-Donadey, F., Zohar, S., Capelle, L., Behin, A., Tibi, A., Martin-Duverneuil, N., Sanson, M., Lacomblez, L., Taillibert, S., Puybasset, L., Van Effenterre, R., Delattre, J.Y., Carpentier, A.F., 2006. Phase 1 trial of a CpG oligodeoxynucleotide for patients with recurrent glioblastoma. *Neuro-oncol* 8, 60-66.
- Carpentier, A.F., Auf, G., Delattre, J.Y., 2003. CpG-oligonucleotides for cancer immunotherapy : review of the literature and potential applications in malignant glioma. *Front Biosci* 8, e115-127.
- Carpentier, A.F., Xie, J., Mokhtari, K., Delattre, J.Y., 2000. Successful treatment of intracranial gliomas in rat by oligodeoxynucleotides containing CpG motifs. *Clin Cancer Res* 6, 2469-2473.
- Carpentier, P.A., Begolka, W.S., Olson, J.K., Elhofy, A., Karpus, W.J., Miller, S.D., 2004. Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli. *Glia*.
- Carson, M.J., Doose, J.M., Melchior, B., Schmid, C.D., Ploix, C.C., 2006. CNS immune privilege: hiding in plain sight. *Immunol Rev* 213, 48-65.
- Carson, M.J., Sutcliffe, J.G., Campbell, I.L., 1999. Microglia stimulate naive T-cell differentiation without stimulating T-cell proliferation. *J Neurosci Res* 55, 127-134.

- Catalano, R.D., Johnson, M.H., Campbell, E.A., Charnock-Jones, D.S., Smith, S.K., Sharkey, A.M., 2005. Inhibition of Stat3 activation in the endometrium prevents implantation: a nonsteroidal approach to contraception. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8585-8590.
- Catros-Quemener, V., Bouet, F., Genetet, N., 2003. [Antitumor immunity and cellular cancer therapies]. *Med Sci (Paris)* 19, 43-53.
- Chahlavi, A., Rayman, P., Richmond, A.L., Biswas, K., Zhang, R., Vogelbaum, M., Tannenbaum, C., Barnett, G., Finke, J.H., 2005. Glioblastomas induce T-lymphocyte death by two distinct pathways involving gangliosides and CD70. *Cancer Res* 65, 5428-5438.
- Chan, A., Seguin, R., Magnus, T., Papadimitriou, C., Toyka, K.V., Antel, J.P., Gold, R., 2003. Phagocytosis of apoptotic inflammatory cells by microglia and its therapeutic implications: termination of CNS autoimmune inflammation and modulation by interferon-beta. *Glia* 43, 231-242.
- Chao, C.C., Hu, S., Sheng, W.S., Tsang, M., Peterson, P.K., 1995. Tumor necrosis factor-alpha mediates the release of bioactive transforming growth factor-beta in murine microglial cell cultures. *Clin Immunol Immunopathol* 77, 358-365.
- Charles, K.J., Deuchars, J., Davies, C.H., Pangalos, M.N., 2003. GABA B receptor subunit expression in glia. *Mol Cell Neurosci* 24, 214-223.
- Chen, B., Zhang, D., Pollard, J.W., 2003. Progesterone regulation of the mammalian ortholog of methylcitrate dehydratase (immune response gene 1) in the uterine epithelium during implantation through the protein kinase C pathway. *Mol Endocrinol* 17, 2340-2354.
- Cheon, Y.P., Xu, X., Bagchi, M.K., Bagchi, I.C., 2003. Immune-responsive gene 1 is a novel target of progesterone receptor and plays a critical role during implantation in the mouse. *Endocrinology* 144, 5623-5630.
- Choi, B.H., Suzuki, M., Kim, T., Wagner, S.L., Cunningham, D.D., 1990. Protease nexin-1. Localization in the human brain suggests a protective role against extravasated serine proteases. *Am J Pathol* 137, 741-747.
- Choi, C., Gillespie, G.Y., Van Wagoner, N.J., Benveniste, E.N., 2002. Fas engagement increases expression of interleukin-6 in human glioma cells. *J Neurooncol* 56, 13-19.
- Christensen, J.E., Nansen, A., Moos, T., Lu, B., Gerard, C., Christensen, J.P., Thomsen, A.R., 2004. Efficient T-cell surveillance of the CNS requires expression of the CXC chemokine receptor 3. *J Neurosci* 24, 4849-4858.
- Condorelli, D.F., Dell'Albani, P., Mudo, G., Timmusk, T., Belluardo, N., 1994. Expression of neurotrophins and their receptors in primary astroglial cultures: induction by cyclic AMP-elevating agents. *J Neurochem* 63, 509-516.
- Condorelli, D.F., Salin, T., Dell'Albani, P., Mudo, G., Corsaro, M., Timmusk, T., Metsis, M., Belluardo, N., 1995. Neurotrophins and their trk receptors in cultured cells of the glial lineage and in white matter of the central nervous system. *J Mol Neurosci* 6, 237-248.

- Constam, D.B., Philipp, J., Malipiero, U.V., ten Dijke, P., Schachner, M., Fontana, A., 1992. Differential expression of transforming growth factor-beta 1, -beta 2, and -beta 3 by glioblastoma cells, astrocytes, and microglia. *J Immunol* 148, 1404-1410.
- Cornet, A., Bettelli, E., Oukka, M., Cambouris, C., Avellana-Adalid, V., Kosmatopoulos, K., Liblau, R.S., 2000. Role of astrocytes in antigen presentation and naive T-cell activation. *J Neuroimmunol* 106, 69-77.
- Coutinho, A., Caramalho, I., Seixas, E., Demengeot, J., 2005. Thymic commitment of regulatory T cells is a pathway of TCR-dependent selection that isolates repertoires undergoing positive or negative selection. *Curr Top Microbiol Immunol* 293, 43-71.
- Cuzner, M.L., Opdenakker, G., 1999. Plasminogen activators and matrix metalloproteases, mediators of extracellular proteolysis in inflammatory demyelination of the central nervous system. *J Neuroimmunol* 94, 1-14.
- da Cunha, A., Jefferson, J.A., Jackson, R.W., Vitkovic, L., 1993. Glial cell-specific mechanisms of TGF-beta 1 induction by IL-1 in cerebral cortex. *J Neuroimmunol* 42, 71-85.
- da Cunha, A., Jefferson, J.J., Tyor, W.R., Glass, J.D., Jannotta, F.S., Cottrell, J.R., Resau, J.H., 1997. Transforming growth factor-beta1 in adult human microglia and its stimulated production by interleukin-1. *J Interferon Cytokine Res* 17, 655-664.
- Dalmau, I., Vela, J.M., Gonzalez, B., Finsen, B., Castellano, B., 2003. Dynamics of microglia in the developing rat brain. *J Comp Neurol* 458, 144-157.
- Dalpke, A.H., Schafer, M.K., Frey, M., Zimmermann, S., Tebbe, J., Weihe, E., Heeg, K., 2002. Immunostimulatory CpG-DNA activates murine microglia. *J Immunol* 168, 4854-4863.
- Dang, N.H., Hagemester, F.B., Pro, B., McLaughlin, P., Romaguera, J.E., Jones, D., Samuels, B., Samaniego, F., Younes, A., Wang, M., Goy, A., Rodriguez, M.A., Walker, P.L., Arredondo, Y., Tong, A.T., Fayad, L., 2004. Phase II study of denileukin diftitox for relapsed/refractory B-Cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 22, 4095-4102.
- Dangond, F., Windhagen, A., Groves, C.J., Hafler, D.A., 1997. Constitutive expression of costimulatory molecules by human microglia and its relevance to CNS autoimmunity. *J Neuroimmunol* 76, 132-138.
- Dasari, P., Nicholson, I.C., Hodge, G., Dandie, G.W., Zola, H., 2005. Expression of toll-like receptors on B lymphocytes. *Cell Immunol* 236, 140-145.
- Datta, S.K., Raz, E., 2005. Induction of antigen cross-presentation by Toll-like receptors. *Springer Semin Immunopathol* 26, 247-255.
- Datta, S.K., Redecke, V., Prilliman, K.R., Takabayashi, K., Corr, M., Tallant, T., DiDonato, J., Dziarski, R., Akira, S., Schoenberger, S.P., Raz, E., 2003. A subset of Toll-like receptor ligands induces cross-presentation by bone marrow-derived dendritic cells. *J Immunol* 170, 4102-4110.

- Davies, C.A., Loddick, S.A., Toulmond, S., Stroemer, R.P., Hunt, J., Rothwell, N.J., 1999. The progression and topographic distribution of interleukin-1beta expression after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 19, 87-98.
- Davoust, N., Vuailat, C., Cavillon, G., Domenget, C., Hatterer, E., Bernard, A., Dumontel, C., Jurdic, P., Malcus, C., Confavreux, C., Belin, M.F., Nataf, S., 2006. Bone marrow CD34+/B220+ progenitors target the inflamed brain and display in vitro differentiation potential toward microglia. *Faseb J* 20, 2081-2092.
- de Castro Ribeiro, M., Badaut, J., Price, M., Meins, M., Bogousslavsky, J., Monard, D., Hirt, L., 2006. Thrombin in ischemic neuronal death. *Exp Neurol* 198, 199-203.
- Delgado, M., 2002. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit CBP-NF-kappaB interaction in activated microglia. *Biochem Biophys Res Commun* 297, 1181-1185.
- Delgado, M., Ganea, D., 2003. Vasoactive intestinal peptide prevents activated microglia-induced neurodegeneration under inflammatory conditions: potential therapeutic role in brain trauma. *Faseb J* 17, 1922-1924.
- Delneste, Y., 2004. Scavenger receptors and heat-shock protein-mediated antigen cross-presentation. *Biochem Soc Trans* 32, 633-635.
- Deryugina, E.I., Bourdon, M.A., 1996. Tenascin mediates human glioma cell migration and modulates cell migration on fibronectin. *J Cell Sci* 109 (Pt 3), 643-652.
- Dick, A.D., Pell, M., Brew, B.J., Foulcher, E., Sedgwick, J.D., 1997. Direct ex vivo flow cytometric analysis of human microglial cell CD4 expression: examination of central nervous system biopsy specimens from HIV-seropositive patients and patients with other neurological disease. *Aids* 11, 1699-1708.
- Didenko, V.V., Ngo, H.N., Minchew, C., Baskin, D.S., 2002. Apoptosis of T lymphocytes invading glioblastomas multiforme: a possible tumor defense mechanism. *J Neurosurg* 96, 580-584.
- Diehl, M., Munz, C., Keilholz, W., Stevanovic, S., Holmes, N., Loke, Y.W., Rammensee, H.G., 1996. Nonclassical HLA-G molecules are classical peptide presenters. *Curr Biol* 6, 305-314.
- Dietrich, J., Han, R., Yang, Y., Mayer-Proschel, M., Noble, M., 2006. CNS progenitor cells and oligodendrocytes are targets of chemotherapeutic agents in vitro and in vivo. *J Biol* 5, 22.
- Dijkstra, I.M., de Haas, A.H., Brouwer, N., Boddeke, H.W., Biber, K., 2006. Challenge with innate and protein antigens induces CCR7 expression by microglia in vitro and in vivo. *Glia* 54, 861-872.
- Djerbi, M., Screpanti, V., Catrina, A.I., Bogen, B., Biberfeld, P., Grandien, A., 1999. The inhibitor of death receptor signaling, FLICE-inhibitory protein defines a new class of tumor progression factors. *J Exp Med* 190, 1025-1032.

- Dobbertin, A., Schmid, P., Gelman, M., Glowinski, J., Mallat, M., 1997. Neurons promote macrophage proliferation by producing transforming growth factor-beta2. *J Neurosci* 17, 5305-5315.
- Dobrenis, K., Chang, H.Y., Pina-Benabou, M.H., Woodroffe, A., Lee, S.C., Rozental, R., Spray, D.C., Scemes, E., 2005. Human and mouse microglia express connexin36, and functional gap junctions are formed between rodent microglia and neurons. *J Neurosci Res* 82, 306-315.
- Dong, Y., Benveniste, E.N., 2001. Immune function of astrocytes. *Glia* 36, 180-190.
- Douc-Rasy, S., Barrois, M., Echeynne, M., Kaghad, M., Blanc, E., Raguenez, G., Goldschneider, D., Terrier-Lacombe, M.J., Hartmann, O., Moll, U., Caput, D., Benard, J., 2002. DeltaN-p73alpha accumulates in human neuroblastic tumors. *Am J Pathol* 160, 631-639.
- Dubsky, P., Ueno, H., Piqueras, B., Connolly, J., Banchereau, J., Palucka, A.K., 2005. Human dendritic cell subsets for vaccination. *J Clin Immunol* 25, 551-572.
- Ebert, S., Gerber, J., Bader, S., Muhlhauser, F., Brechtel, K., Mitchell, T.J., Nau, R., 2005. Dose-dependent activation of microglial cells by Toll-like receptor agonists alone and in combination. *J Neuroimmunol* 159, 87-96.
- Ehlers, M.R., 2000. CR3: a general purpose adhesion-recognition receptor essential for innate immunity. *Microbes Infect* 2, 289-294.
- El Andaloussi, A., Han, Y., Lesniak, M.S., 2006a. Prolongation of survival following depletion of CD4+CD25+ regulatory T cells in mice with experimental brain tumors. *J Neurosurg* 105, 430-437.
- El Andaloussi, A., Sonabend, A.M., Han, Y., Lesniak, M.S., 2006b. Stimulation of TLR9 with CpG ODN enhances apoptosis of glioma and prolongs the survival of mice with experimental brain tumors. *Glia* 54, 526-535.
- El Khoury, J., Hickman, S.E., Thomas, C.A., Cao, L., Silverstein, S.C., Loike, J.D., 1996. Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta-amyloid fibrils. *Nature* 382, 716-719.
- El Khoury, J., Hickman, S.E., Thomas, C.A., Loike, J.D., Silverstein, S.C., 1998. Microglia, scavenger receptors, and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 19, S81-84.
- Elkabes, S., DiCicco-Bloom, E.M., Black, I.B., 1996. Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *J Neurosci* 16, 2508-2521.
- Enam, S.A., Rosenblum, M.L., Edvardsen, K., 1998. Role of extracellular matrix in tumor invasion: migration of glioma cells along fibronectin-positive mesenchymal cell processes. *Neurosurgery* 42, 599-607; discussion 607-598.
- Engelhardt, B., Ransohoff, R.M., 2005. The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends Immunol* 26, 485-495.

- Enose, Y., Destache, C.J., Mack, A.L., Anderson, J.R., Ullrich, F., Ciborowski, P.S., Gendelman, H.E., 2005. Proteomic fingerprints distinguish microglia, bone marrow, and spleen macrophage populations. *Glia* 51, 161-172.
- Esteve, P.O., Chicoine, E., Robledo, O., Aoudjit, F., Descoteaux, A., Potworowski, E.F., St-Pierre, Y., 2002. Protein kinase C-zeta regulates transcription of the matrix metalloproteinase-9 gene induced by IL-1 and TNF-alpha in glioma cells via NF-kappa B. *J Biol Chem* 277, 35150-35155.
- Esteve, P.O., Tremblay, P., Houde, M., St-Pierre, Y., Mandeville, R., 1998. In vitro expression of MMP-2 and MMP-9 in glioma cells following exposure to inflammatory mediators. *Biochim Biophys Acta* 1403, 85-96.
- Fabriek, B.O., Van Haastert, E.S., Galea, I., Polfliet, M.M., Dopp, E.D., Van Den Heuvel, M.M., Van Den Berg, T.K., De Groot, C.J., Van Der Valk, P., Dijkstra, C.D., 2005. CD163-positive perivascular macrophages in the human CNS express molecules for antigen recognition and presentation. *Glia* 51, 297-305.
- Falsig, J., Porzgen, P., Lund, S., Schrattenholz, A., Leist, M., 2006. The inflammatory transcriptome of reactive murine astrocytes and implications for their innate immune function. *J Neurochem* 96, 893-907.
- Farber, K., Pannasch, U., Kettenmann, H., 2005. Dopamine and noradrenaline control distinct functions in rodent microglial cells. *Mol Cell Neurosci* 29, 128-138.
- Faulkner, J.R., Herrmann, J.E., Woo, M.J., Tansey, K.E., Doan, N.B., Sofroniew, M.V., 2004. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J Neurosci* 24, 2143-2155.
- Fazilleau, N., Delarasse, C., Sweenie, C.H., Anderton, S.M., Fillatreau, S., Lemonnier, F.A., Pham-Dinh, D., Kanellopoulos, J.M., 2006. Persistence of autoreactive myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)-specific T cell repertoires in MOG-expressing mice. *Eur J Immunol* 36, 533-543.
- Fecci, P.E., Mitchell, D.A., Whitesides, J.F., Xie, W., Friedman, A.H., Archer, G.E., Herndon, J.E., 2nd, Bigner, D.D., Dranoff, G., Sampson, J.H., 2006. Increased regulatory T-cell fraction amidst a diminished CD4 compartment explains cellular immune defects in patients with malignant glioma. *Cancer Res* 66, 3294-3302.
- Fedoroff, S., Zhai, R., Novak, J.P., 1997. Microglia and astroglia have a common progenitor cell. *J Neurosci Res* 50, 477-486.
- Feng, H., Zeng, Y., Graner, M.W., Likhacheva, A., Katsanis, E., 2003. Exogenous stress proteins enhance the immunogenicity of apoptotic tumor cells and stimulate antitumor immunity. *Blood* 101, 245-252.
- Ferrer, I., Bernet, E., Soriano, E., del Rio, T., Fonseca, M., 1990. Naturally occurring cell death in the cerebral cortex of the rat and removal of dead cells by transitory phagocytes. *Neuroscience* 39, 451-458.
- Festoff, B.W., Smirnova, I.V., Ma, J., Citron, B.A., 1996. Thrombin, its receptor and protease nexin I, its potent serpin, in the nervous system. *Semin Thromb Hemost* 22, 267-271.

- Fischer, H.G., Bielinsky, A.K., 1999. Antigen presentation function of brain-derived dendriform cells depends on astrocyte help. *Int Immunol* 11, 1265-1274.
- Fischer, H.G., Bonifas, U., Reichmann, G., 2000. Phenotype and functions of brain dendritic cells emerging during chronic infection of mice with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 164, 4826-4834.
- Fischer, H.G., Nitzgen, B., Germann, T., Degitz, K., Daubener, W., Hadding, U., 1993. Differentiation driven by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor endows microglia with interferon-gamma-independent antigen presentation function. *J Neuroimmunol* 42, 87-95.
- Fischer, H.G., Reichmann, G., 2001. Brain dendritic cells and macrophages/microglia in central nervous system inflammation. *J Immunol* 166, 2717-2726.
- Floden, A.M., Combs, C.K., 2006. Beta-amyloid stimulates murine postnatal and adult microglia cultures in a unique manner. *J Neurosci* 26, 4644-4648.
- Flugel, A., Bradl, M., Kreutzberg, G.W., Graeber, M.B., 2001. Transformation of donor-derived bone marrow precursors into host microglia during autoimmune CNS inflammation and during the retrograde response to axotomy. *J Neurosci Res* 66, 74-82.
- Flugel, A., Schwaiger, F.W., Neumann, H., Medana, I., Willem, M., Wekerle, H., Kreutzberg, G.W., Graeber, M.B., 2000. Neuronal FasL induces cell death of encephalitogenic T lymphocytes. *Brain Pathol* 10, 353-364.
- Fontenot, J.D., Gavin, M.A., Rudensky, A.Y., 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4, 330-336.
- Fontenot, J.D., Rudensky, A.Y., 2005. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol* 6, 331-337.
- Ford, A.L., Goodsall, A.L., Hickey, W.F., Sedgwick, J.D., 1995. Normal adult ramified microglia separated from other central nervous system macrophages by flow cytometric sorting. Phenotypic differences defined and direct ex vivo antigen presentation to myelin basic protein-reactive CD4⁺ T cells compared. *J Immunol* 154, 4309-4321.
- Foss, F., 2006. Clinical experience with denileukin diftitox (ONTAK). *Semin Oncol* 33, S11-16.
- Fournier, E., Passirani, C., Colin, N., Sagodira, S., Menei, P., Benoit, J.P., Montero-Menei, C.N., 2006. The brain tissue response to biodegradable poly(methylidene malonate 2.1.2)-based microspheres in the rat. *Biomaterials* 27, 4963-4974.
- Fournier, E., Passirani, C., Montero-Menei, C., Colin, N., Breton, P., Sagodira, S., Menei, P., Benoit, J.P., 2003. Therapeutic effectiveness of novel 5-fluorouracil-loaded poly(methylidene malonate 2.1.2)-based microspheres on F98 glioma-bearing rats. *Cancer* 97, 2822-2829.

- Frankel, A.E., Surendranathan, A., Black, J.H., White, A., Ganjoo, K., Cripe, L.D., 2006. Phase II clinical studies of denileukin diftitox diphtheria toxin fusion protein in patients with previously treated chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 106, 2158-2164.
- Frankel, B., Longo, S.L., Ryken, T.C., 1999a. Co-expression of Fas and Fas ligand in human non-astrocytic glial tumors. *Acta Neuropathol (Berl)* 98, 363-366.
- Frankel, B., Longo, S.L., Ryken, T.C., 1999b. Human astrocytomas co-expressing Fas and Fas ligand also produce TGFbeta2 and Bcl-2. *J Neurooncol* 44, 205-212.
- Frei, K., Ambar, B., Adachi, N., Yonekawa, Y., Fontana, A., 1998. Ex vivo malignant glioma cells are sensitive to Fas (CD95/APO-1) ligand-mediated apoptosis. *J Neuroimmunol* 87, 105-113.
- Frigerio, S., Silei, V., Ciusani, E., Massa, G., Lauro, G.M., Salmaggi, A., 2000. Modulation of fas-ligand (Fas-L) on human microglial cells: an in vitro study. *J Neuroimmunol* 105, 109-114.
- Galea, I., Palin, K., Newman, T.A., Van Rooijen, N., Perry, V.H., Boche, D., 2005. Mannose receptor expression specifically reveals perivascular macrophages in normal, injured, and diseased mouse brain. *Glia* 49, 375-384.
- Garcion, E., Lamprecht, A., Heurtault, B., Paillard, A., Aubert-Pouessel, A., Denizot, B., Menei, P., Benoit, J.P., 2006. A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats. *Mol Cancer Ther* 5, 1710-1722.
- Garcion, E., Sindji, L., Nataf, S., Brachet, P., Darcy, F., Montero-Menei, C.N., 2003. Treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis in rat by 1,25-dihydroxyvitamin D3 leads to early effects within the central nervous system. *Acta Neuropathol (Berl)* 105, 438-448.
- Gebicke-Haerter, P.J., 2005. Microarrays and expression profiling in microglia research and in inflammatory brain disorders. *J Neurosci Res* 81, 327-341.
- Gehrmann, J., Matsumoto, Y., Kreutzberg, G.W., 1995. Microglia: intrinsic immuneffector cell of the brain. *Brain Res Brain Res Rev* 20, 269-287.
- Giulian, D., 1999. Microglia and the immune pathology of Alzheimer disease. *Am J Hum Genet* 65, 13-18.
- Giulian, D., Baker, T.J., 1986. Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain. *J Neurosci* 6, 2163-2178.
- Gomes, F.C., Sousa Vde, O., Romao, L., 2005. Emerging roles for TGF-beta1 in nervous system development. *Int J Dev Neurosci* 23, 413-424.
- Gomez, G.G., Kruse, C.A., 2006. Mechanisms of malignant glioma immune resistance and sources of immunosuppression. *Gene Ther Mol Biol* 10, 133-146.

- Gordon, S., 2002. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 111, 927-930.
- Graeber, M.B., Streit, W.J., Kreutzberg, G.W., 1989. Identity of ED2-positive perivascular cells in rat brain. *J Neurosci Res* 22, 103-106.
- Granucci, F., Petralia, F., Urbano, M., Citterio, S., Di Tota, F., Santambrogio, L., Ricciardi-Castagnoli, P., 2003. The scavenger receptor MARCO mediates cytoskeleton rearrangements in dendritic cells and microglia. *Blood* 102, 2940-2947.
- Gratas, C., Tohma, Y., Van Meir, E.G., Klein, M., Tenan, M., Ishii, N., Tachibana, O., Kleihues, P., Ohgaki, H., 1997. Fas ligand expression in glioblastoma cell lines and primary astrocytic brain tumors. *Brain Pathol* 7, 863-869.
- Gresser, O., Hein, A., Riese, S., Regnier-Vigouroux, A., 2000. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 alpha inhibit through different pathways interferon-gamma-induced antigen presentation, processing and MHC class II surface expression on astrocytes, but not on microglia. *Cell Tissue Res* 300, 373-382.
- Gresser, O., Weber, E., Hellwig, A., Riese, S., Regnier-Vigouroux, A., 2001. Immunocompetent astrocytes and microglia display major differences in the processing of the invariant chain and in the expression of active cathepsin L and cathepsin S. *Eur J Immunol* 31, 1813-1824.
- Grotzer, M.A., Eggert, A., Zuzak, T.J., Janss, A.J., Marwaha, S., Wiewrodt, B.R., Ikegaki, N., Brodeur, G.M., Phillips, P.C., 2000. Resistance to TRAIL-induced apoptosis in primitive neuroectodermal brain tumor cells correlates with a loss of caspase-8 expression. *Oncogene* 19, 4604-4610.
- Guermonprez, P., Amigorena, S., 2005. Pathways for antigen cross presentation. *Springer Semin Immunopathol* 26, 257-271.
- Guillemin, G.J., Brew, B.J., 2004. Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. *J Leukoc Biol* 75, 388-397.
- Hanisch, U.K., 2002. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 40, 140-155.
- Harada, N., Iijima, S., Kobayashi, K., Yoshida, T., Brown, W.R., Hibi, T., Oshima, A., Morikawa, M., 1997. Human IgG_{Fc} binding protein (FcγBP) in colonic epithelial cells exhibits mucin-like structure. *J Biol Chem* 272, 15232-15241.
- Hartung, H.P., Kieseier, B.C., 2000. The role of matrix metalloproteinases in autoimmune damage to the central and peripheral nervous system. *J Neuroimmunol* 107, 140-147.
- Hatano, M., Eguchi, J., Tatsumi, T., Kuwashima, N., Dusak, J.E., Kinch, M.S., Pollack, I.F., Hamilton, R.L., Storkus, W.J., Okada, H., 2005. EphA2 as a glioma-associated antigen: a novel target for glioma vaccines. *Neoplasia* 7, 717-722.
- Hatterer, E., Davoust, N., Didier-Bazes, M., Vuillat, C., Malcus, C., Belin, M.F., Nataf, S., 2006. How to drain without lymphatics? Dendritic cells migrate from the cerebrospinal fluid to the B-cell follicles of cervical lymph nodes. *Blood* 107, 806-812.

- Havenith, C.E., Askew, D., Walker, W.S., 1998. Mouse resident microglia: isolation and characterization of immunoregulatory properties with naive CD4⁺ and CD8⁺ T-cells. *Glia* 22, 348-359.
- Heath, W.R., Belz, G.T., Behrens, G.M., Smith, C.M., Forehan, S.P., Parish, I.A., Davey, G.M., Wilson, N.S., Carbone, F.R., Villadangos, J.A., 2004. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev* 199, 9-26.
- Heath, W.R., Carbone, F.R., 2001. Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 19, 47-64.
- Heckelsmiller, K., Beck, S., Rall, K., Sipos, B., Schlamp, A., Tuma, E., Rothenfusser, S., Endres, S., Hartmann, G., 2002. Combined dendritic cell- and CpG oligonucleotide-based immune therapy cures large murine tumors that resist chemotherapy. *Eur J Immunol* 32, 3235-3245.
- Heese, K., Hock, C., Otten, U., 1998. Inflammatory signals induce neurotrophin expression in human microglial cells. *J Neurochem* 70, 699-707.
- Heit, A., Huster, K.M., Schmitz, F., Schiemann, M., Busch, D.H., Wagner, H., 2004. CpG-DNA aided cross-priming by cross-presenting B cells. *J Immunol* 172, 1501-1507.
- Heppner, F.L., Greter, M., Marino, D., Falsig, J., Raivich, G., Hovelmeyer, N., Waisman, A., Rulicke, T., Prinz, M., Priller, J., Becher, B., Aguzzi, A., 2005. Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis. *Nat Med* 11, 146-152.
- Herold-Mende, C., Mueller, M.M., Bonsanto, M.M., Schmitt, H.P., Kunze, S., Steiner, H.H., 2002. Clinical impact and functional aspects of tenascin-C expression during glioma progression. *Int J Cancer* 98, 362-369.
- Hess, D.C., Abe, T., Hill, W.D., Studdard, A.M., Carothers, J., Masuya, M., Fleming, P.A., Drake, C.J., Ogawa, M., 2004. Hematopoietic origin of microglial and perivascular cells in brain. *Exp Neurol* 186, 134-144.
- Hickey, W.F., 2001. Basic principles of immunological surveillance of the normal central nervous system. *Glia* 36, 118-124.
- Hochrein, H., Shortman, K., Vremec, D., Scott, B., Hertzog, P., O'Keeffe, M., 2001. Differential production of IL-12, IFN-alpha, and IFN-gamma by mouse dendritic cell subsets. *J Immunol* 166, 5448-5455.
- Hooper, C., Taylor, D.L., Pocock, J.M., 2005. Pure albumin is a potent trigger of calcium signalling and proliferation in microglia but not macrophages or astrocytes. *J Neurochem* 92, 1363-1376.
- Hoshino, K., Kaisho, T., Iwabe, T., Takeuchi, O., Akira, S., 2002. Differential involvement of IFN-beta in Toll-like receptor-stimulated dendritic cell activation. *Int Immunol* 14, 1225-1231.

- Huang, S., Xie, K., Bucana, C.D., Ullrich, S.E., Bar-Eli, M., 1996. Interleukin 10 suppresses tumor growth and metastasis of human melanoma cells: potential inhibition of angiogenesis. *Clin Cancer Res* 2, 1969-1979.
- Huettner, C., Czub, S., Kerkau, S., Roggendorf, W., Tonn, J.C., 1997. Interleukin 10 is expressed in human gliomas in vivo and increases glioma cell proliferation and motility in vitro. *Anticancer Res* 17, 3217-3224.
- Husain, N., Chiocca, E.A., Rainov, N., Louis, D.N., Zervas, N.T., 1998. Co-expression of Fas and Fas ligand in malignant glial tumors and cell lines. *Acta Neuropathol (Berl)* 95, 287-290.
- Husemann, J., Loike, J.D., Anankov, R., Febbraio, M., Silverstein, S.C., 2002. Scavenger receptors in neurobiology and neuropathology: their role on microglia and other cells of the nervous system. *Glia* 40, 195-205.
- Hussain, S.F., Yang, D., Suki, D., Aldape, K., Grimm, E., Heimberger, A.B., 2006a. The role of human glioma-infiltrating microglia/macrophages in mediating antitumor immune responses. *Neuro-oncol* 8, 261-279.
- Hussain, S.F., Yang, D., Suki, D., Grimm, E., Heimberger, A.B., 2006b. Innate immune functions of microglia isolated from human glioma patients. *J Transl Med* 4, 15.
- Ichinose, M., Masuoka, J., Shiraishi, T., Mineta, T., Tabuchi, K., 2001. Fas ligand expression and depletion of T-cell infiltration in astrocytic tumors. *Brain Tumor Pathol* 18, 37-42.
- Imai, F., Marunouchi, T., Mizoguchi, Y., Ogasawara, M., Kanno, T., 1993. Phenotypic alteration of glioma cells during culture. *Noshuyo Byori* 10, 19-25.
- Inagaki, M., Yoshikawa, E., Matsuoka, Y., Sugawara, Y., Nakano, T., Akechi, T., Wada, N., Imoto, S., Murakami, K., Uchitomi, Y., 2007. Smaller regional volumes of brain gray and white matter demonstrated in breast cancer survivors exposed to adjuvant chemotherapy. *Cancer* 109, 146-156.
- Inoue, K., 2002. Microglial activation by purines and pyrimidines. *Glia* 40, 156-163.
- Ishikawa, E., Tsuboi, K., Saijo, K., Harada, H., Takano, S., Nose, T., Ohno, T., 2004. Autologous natural killer cell therapy for human recurrent malignant glioma. *Anticancer Res* 24, 1861-1871.
- Jack, C.S., Arbour, N., Manusow, J., Montgrain, V., Blain, M., McCrea, E., Shapiro, A., Antel, J.P., 2005. TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. *J Immunol* 175, 4320-4330.
- Jander, S., Pohl, J., D'Urso, D., Gillen, C., Stoll, G., 1998. Time course and cellular localization of interleukin-10 mRNA and protein expression in autoimmune inflammation of the rat central nervous system. *Am J Pathol* 152, 975-982.
- Janssens, S., Beyaert, R., 2002. A universal role for MyD88 in TLR/IL-1R-mediated signaling. *Trends Biochem Sci* 27, 474-482.

- Johansson, F.K., Brodd, J., Eklof, C., Ferletta, M., Hesselager, G., Tiger, C.F., Uhrbom, L., Westermark, B., 2004. Identification of candidate cancer-causing genes in mouse brain tumors by retroviral tagging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 11334-11337.
- Joly, E., Mucke, L., Oldstone, M.B., 1991. Viral persistence in neurons explained by lack of major histocompatibility class I expression. *Science* 253, 1283-1285.
- Jung, D.Y., Lee, H., Jung, B.Y., Ock, J., Lee, M.S., Lee, W.H., Suk, K., 2005. TLR4, but Not TLR2, Signals Autoregulatory Apoptosis of Cultured Microglia: A Critical Role of IFN- β as a Decision Maker. *J Immunol* 174, 6467-6476.
- Kanzawa, T., Sawada, M., Kato, K., Yamamoto, K., Mori, H., Tanaka, R., 2000. Differentiated regulation of allo-antigen presentation by different types of murine microglial cell lines. *J Neurosci Res* 62, 383-388.
- Karman, J., Ling, C., Sandor, M., Fabry, Z., 2004. Initiation of immune responses in brain is promoted by local dendritic cells. *J Immunol* 173, 2353-2361.
- Kato, H., Kogure, K., Liu, X.H., Araki, T., Itoyama, Y., 1996. Progressive expression of immunomolecules on activated microglia and invading leukocytes following focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Res* 734, 203-212.
- Kato, H., Takahashi, A., Itoyama, Y., 2003. Cell cycle protein expression in proliferating microglia and astrocytes following transient global cerebral ischemia in the rat. *Brain Res Bull* 60, 215-221.
- Kaur, C., Hao, A.J., Wu, C.H., Ling, E.A., 2001. Origin of microglia. *Microsc Res Tech* 54, 2-9.
- Kawai, T., Akira, S., 2006. TLR signaling. *Cell Death Differ* 13, 816-825.
- Kennedy, D.W., Abkowitz, J.L., 1997. Kinetics of central nervous system microglial and macrophage engraftment: analysis using a transgenic bone marrow transplantation model. *Blood* 90, 986-993.
- Kielian, T., 2006. Toll-like receptors in central nervous system glial inflammation and homeostasis. *J Neurosci Res* 83, 711-730.
- Kikuchi, T., Akasaki, Y., Irie, M., Homma, S., Abe, T., Ohno, T., 2001. Results of a phase I clinical trial of vaccination of glioma patients with fusions of dendritic and glioma cells. *Cancer Immunol Immunother* 50, 337-344.
- Kim, W.K., Hwang, S.Y., Oh, E.S., Piao, H.Z., Kim, K.W., Han, I.O., 2004. TGF- β 1 represses activation and resultant death of microglia via inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Immunol* 172, 7015-7023.
- Kitamura, Y., Takata, K., Inden, M., Tsuchiya, D., Yanagisawa, D., Nakata, J., Taniguchi, T., 2004. Intracerebroventricular injection of microglia protects against focal brain ischemia. *J Pharmacol Sci* 94, 203-206.
- Knutson, K.L., Dang, Y., Lu, H., Lukas, J., Almand, B., Gad, E., Azeke, E., Disis, M.L., 2006. IL-2 immunotoxin therapy modulates tumor-associated regulatory T cells and

- leads to lasting immune-mediated rejection of breast cancers in neu-transgenic mice. *J Immunol* 177, 84-91.
- Kobayashi, K., Yagasaki, M., Harada, N., Chichibu, K., Hibi, T., Yoshida, T., Brown, W.R., Morikawa, M., 2001. Detection of Fc γ binding protein antigen in human sera and its relation with autoimmune diseases. *Immunol Lett* 79, 229-235.
- Kort, J.J., Kawamura, K., Fugger, L., Weissert, R., Forsthuber, T.G., 2006. Efficient presentation of myelin oligodendrocyte glycoprotein peptides but not protein by astrocytes from HLA-DR2 and HLA-DR4 transgenic mice. *J Neuroimmunol* 173, 23-34.
- Krakowski, M.L., Owens, T., 1997. The central nervous system environment controls effector CD4⁺ T cell cytokine profile in experimental allergic encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 27, 2840-2847.
- Kranzer, K., Bauer, M., Lipford, G.B., Heeg, K., Wagner, H., Lang, R., 2000. CpG-oligodeoxynucleotides enhance T-cell receptor-triggered interferon-gamma production and up-regulation of CD69 via induction of antigen-presenting cell-derived interferon type I and interleukin-12. *Immunology* 99, 170-178.
- Kruse, C.A., Cepeda, L., Owens, B., Johnson, S.D., Stears, J., Lillehei, K.O., 1997. Treatment of recurrent glioma with intracavitary alloreactive cytotoxic T lymphocytes and interleukin-2. *Cancer Immunol Immunother* 45, 77-87.
- Kuchtey, J., Chefalo, P.J., Gray, R.C., Ramachandra, L., Harding, C.V., 2005. Enhancement of dendritic cell antigen cross-presentation by CpG DNA involves type I IFN and stabilization of class I MHC mRNA. *J Immunol* 175, 2244-2251.
- Kuhlmann, T., Wendling, U., Nolte, C., Zipp, F., Maruschak, B., Stadelmann, C., Siebert, H., Bruck, W., 2002. Differential regulation of myelin phagocytosis by macrophages/microglia, involvement of target myelin, Fc receptors and activation by intravenous immunoglobulins. *J Neurosci Res* 67, 185-190.
- Kunikata, N., Sano, K., Honda, M., Ishii, K., Matsunaga, J., Okuyama, R., Takahashi, K., Watanabe, H., Tamura, G., Tagami, H., Terui, T., 2004. Peritumoral CpG oligodeoxynucleotide treatment inhibits tumor growth and metastasis of B16F10 melanoma cells. *J Invest Dermatol* 123, 395-402.
- Kuno, R., Wang, J., Kawanokuchi, J., Takeuchi, H., Mizuno, T., Suzumura, A., 2005. Autocrine activation of microglia by tumor necrosis factor- α . *J Neuroimmunol* 162, 89-96.
- Kusmartsev, S., Nefedova, Y., Yoder, D., Gabrilovich, D.I., 2004. Antigen-specific inhibition of CD8⁺ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species. *J Immunol* 172, 989-999.
- Kuwana, M., 2002. Induction of anergic and regulatory T cells by plasmacytoid dendritic cells and other dendritic cell subsets. *Hum Immunol* 63, 1156-1163.

- Ladeby, R., Wirenfeldt, M., Garcia-Ovejero, D., Fenger, C., Dissing-Olesen, L., Dalmau, I., Finsen, B., 2005. Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. *Brain Res Brain Res Rev* 48, 196-206.
- Lapenta, C., Santini, S.M., Spada, M., Donati, S., Urbani, F., Accapezzato, D., Franceschini, D., Andreotti, M., Barnaba, V., Belardelli, F., 2006. IFN-alpha-conditioned dendritic cells are highly efficient in inducing cross-priming CD8(+) T cells against exogenous viral antigens. *Eur J Immunol* 36, 2046-2060.
- Larmonier, N., Marron, M., Zeng, Y., Cantrell, J., Romanoski, A., Sepassi, M., Thompson, S., Chen, X., Andreansky, S., Katsanis, E., 2007. Tumor-derived CD4(+)CD25(+) regulatory T cell suppression of dendritic cell function involves TGF-beta and IL-10. *Cancer Immunol Immunother* 56, 48-59.
- Lassmann, H., Schmied, M., Vass, K., Hickey, W.F., 1993. Bone marrow derived elements and resident microglia in brain inflammation. *Glia* 7, 19-24.
- Lawson, L.J., Perry, V.H., Dri, P., Gordon, S., 1990. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 39, 151-170.
- Lee, C.G., Jenkins, N.A., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., O'Brien, W.E., 1995. Cloning and analysis of gene regulation of a novel LPS-inducible cDNA. *Immunogenetics* 41, 263-270.
- Lefebvre d'Hellencourt, C., Montero-Menei, C.N., Bernard, R., Couez, D., 2003. Vitamin D3 inhibits proinflammatory cytokines and nitric oxide production by the EOC13 microglial cell line. *J Neurosci Res* 71, 575-582.
- Lehrmann, E., Kiefer, R., Christensen, T., Toyka, K.V., Zimmer, J., Diemer, N.H., Hartung, H.P., Finsen, B., 1998. Microglia and macrophages are major sources of locally produced transforming growth factor-beta1 after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Glia* 24, 437-448.
- Lemire, J., 2000. 1,25-Dihydroxyvitamin D3--a hormone with immunomodulatory properties. *Z Rheumatol* 59 Suppl 1, 24-27.
- Leone, C., Le Pavec, G., Meme, W., Porcheray, F., Samah, B., Dormont, D., Gras, G., 2006. Characterization of human monocyte-derived microglia-like cells. *Glia* 54, 183-192.
- Leppert, D., Lindberg, R.L., Kappos, L., Leib, S.L., 2001. Matrix metalloproteinases: multifunctional effectors of inflammation in multiple sclerosis and bacterial meningitis. *Brain Res Brain Res Rev* 36, 249-257.
- Li, H., Gang, Z., Yuling, H., Luokun, X., Jie, X., Hao, L., Li, W., Chunsong, H., Junyan, L., Mingshen, J., Youxin, J., Feili, G., Boquan, J., Jinqian, T., 2006. Different neurotropic pathogens elicit neurotoxic CCR9- or neurosupportive CXCR3-expressing microglia. *J Immunol* 177, 3644-3656.
- Li, J., Baud, O., Vartanian, T., Volpe, J.J., Rosenberg, P.A., 2005a. Peroxynitrite generated by inducible nitric oxide synthase and NADPH oxidase mediates microglial toxicity to oligodendrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9936-9941.

- Li, J., Gran, B., Zhang, G.X., Rostami, A., Kamoun, M., 2005b. IL-27 subunits and its receptor (WSX-1) mRNAs are markedly up-regulated in inflammatory cells in the CNS during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurol Sci* 232, 3-9.
- Li, J., Gran, B., Zhang, G.X., Ventura, E.S., Siglienti, I., Rostami, A., Kamoun, M., 2003. Differential expression and regulation of IL-23 and IL-12 subunits and receptors in adult mouse microglia. *J Neurol Sci* 215, 95-103.
- Li, Y., Chu, N., Hu, A., Gran, B., Rostami, A., Zhang, G.X., 2007. Increased IL-23p19 expression in multiple sclerosis lesions and its induction in microglia. *Brain* 130, 490-501.
- Ling, C., Sandor, M., Fabry, Z., 2003. In situ processing and distribution of intracerebrally injected OVA in the CNS. *J Neuroimmunol* 141, 90-98.
- Lipton, S.A., Choi, Y.B., Pan, Z.H., Lei, S.Z., Chen, H.S., Sucher, N.J., Loscalzo, J., Singel, D.J., Stamler, J.S., 1993. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364, 626-632.
- Liu, F.T., Rabinovich, G.A., 2005. Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer* 5, 29-41.
- Liu, G., Akasaki, Y., Khong, H.T., Wheeler, C.J., Das, A., Black, K.L., Yu, J.S., 2005. Cytotoxic T cell targeting of TRP-2 sensitizes human malignant glioma to chemotherapy. *Oncogene* 24, 5226-5234.
- Liu, G., Khong, H.T., Wheeler, C.J., Yu, J.S., Black, K.L., Ying, H., 2003. Molecular and functional analysis of tyrosinase-related protein (TRP)-2 as a cytotoxic T lymphocyte target in patients with malignant glioma. *J Immunother* 26, 301-312.
- Liu, G., Ying, H., Zeng, G., Wheeler, C.J., Black, K.L., Yu, J.S., 2004. HER-2, gp100, and MAGE-1 are expressed in human glioblastoma and recognized by cytotoxic T cells. *Cancer Res* 64, 4980-4986.
- Lonsdorf, A.S., Kuekrek, H., Stern, B.V., Boehm, B.O., Lehmann, P.V., Tary-Lehmann, M., 2003. Intratumor CpG-oligodeoxynucleotide injection induces protective antitumor T cell immunity. *J Immunol* 171, 3941-3946.
- Luthi, A., Van der Putten, H., Botteri, F.M., Mansuy, I.M., Meins, M., Frey, U., Sansig, G., Portet, C., Schmutz, M., Schroder, M., Nitsch, C., Laurent, J.P., Monard, D., 1997. Endogenous serine protease inhibitor modulates epileptic activity and hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci* 17, 4688-4699.
- Ma, Y., Li, J., Chiu, I., Wang, Y., Sloane, J.A., Lu, J., Kosaras, B., Sidman, R.L., Volpe, J.J., Vartanian, T., 2006. Toll-like receptor 8 functions as a negative regulator of neurite outgrowth and inducer of neuronal apoptosis. *J Cell Biol* 175, 209-215.
- Mack, C.L., Vanderlugt-Castaneda, C.L., Neville, K.L., Miller, S.D., 2003. Microglia are activated to become competent antigen presenting and effector cells in the inflammatory environment of the Theiler's virus model of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 144, 68-79.

- Maggi, E., Cosmi, L., Liotta, F., Romagnani, P., Romagnani, S., Annunziato, F., 2005. Thymic regulatory T cells. *Autoimmun Rev* 4, 579-586.
- Magnus, T., Chan, A., Grauer, O., Toyka, K.V., Gold, R., 2001. Microglial phagocytosis of apoptotic inflammatory T cells leads to down-regulation of microglial immune activation. *J Immunol* 167, 5004-5010.
- Magnus, T., Chan, A., Linker, R.A., Toyka, K.V., Gold, R., 2002a. Astrocytes are less efficient in the removal of apoptotic lymphocytes than microglia cells: implications for the role of glial cells in the inflamed central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 61, 760-766.
- Magnus, T., Chan, A., Savill, J., Toyka, K.V., Gold, R., 2002b. Phagocytotic removal of apoptotic, inflammatory lymphocytes in the central nervous system by microglia and its functional implications. *J Neuroimmunol* 130, 1-9.
- Mahe, D., Fisson, S., Montoni, A., Morel, A., Couez, D., 2001. Identification and IFN γ -regulation of differentially expressed mRNAs in murine microglial and CNS-associated macrophage subpopulations. *Mol Cell Neurosci* 18, 363-380.
- Mahesparan, R., Read, T.A., Lund-Johansen, M., Skaftnesmo, K.O., Bjerkvig, R., Engebraaten, O., 2003. Expression of extracellular matrix components in a highly infiltrative in vivo glioma model. *Acta Neuropathol (Berl)* 105, 49-57.
- Malaguarnera, L., 2004. Implications of apoptosis regulators in tumorigenesis. *Cancer Metastasis Rev* 23, 367-387.
- Mariani, C.L., Kouri, J.G., Streit, W.J., 2006. Rejection of RG-2 gliomas is mediated by microglia and T lymphocytes. *J Neurooncol* 79, 243-253.
- Marie, J.C., Letterio, J.J., Gavin, M., Rudensky, A.Y., 2005. TGF- β 1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Exp Med* 201, 1061-1067.
- Marin-Teva, J.L., Dusart, I., Colin, C., Gervais, A., van Rooijen, N., Mallat, M., 2004. Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron* 41, 535-547.
- Mason, K.A., Ariga, H., Neal, R., Valdecanas, D., Hunter, N., Krieg, A.M., Whisnant, J.K., Milas, L., 2005. Targeting toll-like receptor 9 with CpG oligodeoxynucleotides enhances tumor response to fractionated radiotherapy. *Clin Cancer Res* 11, 361-369.
- Massa, P.T., 1993. Specific suppression of major histocompatibility complex class I and class II genes in astrocytes by brain-enriched gangliosides. *J Exp Med* 178, 1357-1363.
- Matyszak, M.K., Denis-Donini, S., Citterio, S., Longhi, R., Granucci, F., Ricciardi-Castagnoli, P., 1999. Microglia induce myelin basic protein-specific T cell anergy or T cell activation, according to their state of activation. *Eur J Immunol* 29, 3063-3076.
- Matyszak, M.K., Perry, V.H., 1996. The potential role of dendritic cells in immune-mediated inflammatory diseases in the central nervous system. *Neuroscience* 74, 599-608.

- McBride, J.M., Jung, T., de Vries, J.E., Aversa, G., 2002. IL-10 alters DC function via modulation of cell surface molecules resulting in impaired T-cell responses. *Cell Immunol* 215, 162-172.
- McGeachy, M.J., Stephens, L.A., Anderson, S.M., 2005. Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system. *J Immunol* 175, 3025-3032.
- McKimmie, C.S., Fazakerley, J.K., 2005. In response to pathogens, glial cells dynamically and differentially regulate Toll-like receptor gene expression. *J Neuroimmunol* 169, 116-125.
- Medzhitov, R., Janeway, C., Jr., 2000. The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol* 8, 452-456.
- Meins, M., Piosik, P., Schaeren-Wiemers, N., Franzoni, S., Troncoso, E., Kiss, J.Z., Brosamle, C., Schwab, M.E., Molnar, Z., Monard, D., 2001. Progressive neuronal and motor dysfunction in mice overexpressing the serine protease inhibitor protease nexin-1 in postmitotic neurons. *J Neurosci* 21, 8830-8841.
- Mellman, I., Steinman, R.M., 2001. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106, 255-258.
- Mempel, T.R., Pittet, M.J., Khazaie, K., Weninger, W., Weissleder, R., von Boehmer, H., von Andrian, U.H., 2006. Regulatory T cells reversibly suppress cytotoxic T cell function independent of effector differentiation. *Immunity* 25, 129-141.
- Meng, Y., Carpentier, A.F., Chen, L., Boisserie, G., Simon, J.M., Mazon, J.J., Delattre, J.Y., 2005. Successful combination of local CpG-ODN and radiotherapy in malignant glioma. *Int J Cancer* 116, 992-997.
- Minas, K., Liversidge, J., 2006. Is the CD200/CD200 receptor interaction more than just a myeloid cell inhibitory signal? *Crit Rev Immunol* 26, 213-230.
- Mitsui, H., Watanabe, T., Saeki, H., Mori, K., Fujita, H., Tada, Y., Asahina, A., Nakamura, K., Tamaki, K., 2004. Differential expression and function of Toll-like receptors in Langerhans cells: comparison with splenic dendritic cells. *J Invest Dermatol* 122, 95-102.
- Mittelbronn, M., Dietz, K., Schluesener, H.J., Meyermann, R., 2001. Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude. *Acta Neuropathol (Berl)* 101, 249-255.
- Miwa, T., Furukawa, S., Nakajima, K., Furukawa, Y., Kohsaka, S., 1997. Lipopolysaccharide enhances synthesis of brain-derived neurotrophic factor in cultured rat microglia. *J Neurosci Res* 50, 1023-1029.
- Mocellin, S., Mandruzzato, S., Bronte, V., Lise, M., Nitti, D., 2004. Part I: Vaccines for solid tumours. *Lancet Oncol* 5, 681-689.
- Montero-Menei, C.N., Sindji, L., Garcion, E., Mege, M., Couez, D., Gamelin, E., Darcy, F., 1996. Early events of the inflammatory reaction induced in rat brain by

- lipopolysaccharide intracerebral injection: relative contribution of peripheral monocytes and activated microglia. *Brain Res* 724, 55-66.
- Montoya, C.J., Jie, H.B., Al-Harhi, L., Mulder, C., Patino, P.J., Rugeles, M.T., Krieg, A.M., Landay, A.L., Wilson, S.B., 2006. Activation of plasmacytoid dendritic cells with TLR9 agonists initiates invariant NKT cell-mediated cross-talk with myeloid dendritic cells. *J Immunol* 177, 1028-1039.
- Moore, S.C., McCormack, J.M., Armendariz, E., Gatewood, J., Walker, W.S., 1992. Phenotypes and alloantigen-presenting activity of individual clones of microglia derived from the mouse brain. *J Neuroimmunol* 41, 203-214.
- Moran, L.B., Duke, D.C., Turkheimer, F.E., Banati, R.B., Graeber, M.B., 2004. Towards a transcriptome definition of microglial cells. *Neurogenetics* 5, 95-108.
- Morimoto-Tomita, M., Uchimura, K., Werb, Z., Hemmerich, S., Rosen, S.D., 2002. Cloning and characterization of two extracellular heparin-degrading endosulfatases in mice and humans. *J Biol Chem* 277, 49175-49185.
- Mosley, K., Cuzner, M.L., 1996. Receptor-mediated phagocytosis of myelin by macrophages and microglia: effect of opsonization and receptor blocking agents. *Neurochem Res* 21, 481-487.
- Mukhopadhyay, S., Gordon, S., 2004. The role of scavenger receptors in pathogen recognition and innate immunity. *Immunobiology* 209, 39-49.
- Munz, C., Stevanovic, S., Rammensee, H.G., 1999. Peptide presentation and NK inhibition by HLA-G. *J Reprod Immunol* 43, 139-155.
- Muzio, M., Bosisio, D., Polentarutti, N., D'Amico, G., Stoppacciaro, A., Mancinelli, R., van't Veer, C., Penton-Rol, G., Ruco, L.P., Allavena, P., Mantovani, A., 2000. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* 164, 5998-6004.
- Myer, D.J., Gurkoff, G.G., Lee, S.M., Hovda, D.A., Sofroniew, M.V., 2006. Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury. *Brain* 129, 2761-2772.
- Nagai, H., Horikawa, T., Hara, I., Fukunaga, A., Oniki, S., Oka, M., Nishigori, C., Ichihashi, M., 2004. In vivo elimination of CD25+ regulatory T cells leads to tumor rejection of B16F10 melanoma, when combined with interleukin-12 gene transfer. *Exp Dermatol* 13, 613-620.
- Nakajima, K., Honda, S., Tohyama, Y., Imai, Y., Kohsaka, S., Kurihara, T., 2001. Neurotrophin secretion from cultured microglia. *J Neurosci Res* 65, 322-331.
- Nataf, S., Strazielle, N., Hatterer, E., Mouchiroud, G., Belin, M.F., Gherzi-Egea, J.F., 2006. Rat choroid plexuses contain myeloid progenitors capable of differentiation toward macrophage or dendritic cell phenotypes. *Glia* 54, 160-171.
- Nathoo, N., Barnett, G.H., Golubic, M., 2004. The eicosanoid cascade: possible role in gliomas and meningiomas. *J Clin Pathol* 57, 6-13.

- Naveilhan, P., Neveu, I., Wion, D., Brachet, P., 1996. 1,25-Dihydroxyvitamin D3, an inducer of glial cell line-derived neurotrophic factor. *Neuroreport* 7, 2171-2175.
- Neumann, H., Boucraut, J., Hahnel, C., Misgeld, T., Wekerle, H., 1996. Neuronal control of MHC class II inducibility in rat astrocytes and microglia. *Eur J Neurosci* 8, 2582-2590.
- Neumann, H., Misgeld, T., Matsumuro, K., Wekerle, H., 1998. Neurotrophins inhibit major histocompatibility class II inducibility of microglia: involvement of the p75 neurotrophin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5779-5784.
- Neveu, I., Naveilhan, P., Baudet, C., Brachet, P., Metsis, M., 1994a. 1,25-dihydroxyvitamin D3 regulates NT-3, NT-4 but not BDNF mRNA in astrocytes. *Neuroreport* 6, 124-126.
- Neveu, I., Naveilhan, P., Jehan, F., Baudet, C., Wion, D., De Luca, H.F., Brachet, P., 1994b. 1,25-dihydroxyvitamin D3 regulates the synthesis of nerve growth factor in primary cultures of glial cells. *Brain Res Mol Brain Res* 24, 70-76.
- Neveu, I., Naveilhan, P., Mena, C., Wion, D., Brachet, P., Garabedian, M., 1994c. Synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D3 by rat brain macrophages in vitro. *J Neurosci Res* 38, 214-220.
- Newman, T.A., Galea, I., van Rooijen, N., Perry, V.H., 2005. Blood-derived dendritic cells in an acute brain injury. *J Neuroimmunol* 166, 167-172.
- Nicholas, R.S., Stevens, S., Wing, M.G., Compston, D.A., 2002. Microglia-derived IGF-2 prevents TNFalpha induced death of mature oligodendrocytes in vitro. *J Neuroimmunol* 124, 36-44.
- Nicolson, K.S., O'Neill, E.J., Sundstedt, A., Streeter, H.B., Minaee, S., Wraith, D.C., 2006. Antigen-induced IL-10+ regulatory T cells are independent of CD25+ regulatory cells for their growth, differentiation, and function. *J Immunol* 176, 5329-5337.
- Nikceovich, K.M., Gordon, K.B., Tan, L., Hurst, S.D., Kroepfl, J.F., Gardinier, M., Barrett, T.A., Miller, S.D., 1997. IFN-gamma-activated primary murine astrocytes express B7 costimulatory molecules and prime naive antigen-specific T cells. *J Immunol* 158, 614-621.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., Helmchen, F., 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308, 1314-1318.
- Noda, M., Nakanishi, H., Nabekura, J., Akaike, N., 2000. AMPA-kainate subtypes of glutamate receptor in rat cerebral microglia. *J Neurosci* 20, 251-258.
- Nomura, T., Sakaguchi, S., 2005. Naturally arising CD25+CD4+ regulatory T cells in tumor immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* 293, 287-302.
- Obeid, M., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Fimia, G.M., Apetoh, L., Perfettini, J.L., Castedo, M., Mignot, G., Panaretakis, T., Casares, N., Metivier, D., Larochette, N., van Endert, P., Ciccocanti, F., Piacentini, M., Zitvogel, L., Kroemer, G., 2007. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* 13, 54-61.

- Oda, K., Kitano, H., 2006. A comprehensive map of the toll-like receptor signaling network. *Mol Syst Biol* 2, 2006 0015.
- O'Donovan, N., Fischer, A., Abdo, E.M., Simon, F., Peter, H.J., Gerber, H., Buergi, U., Marti, U., 2002. Differential expression of IgG Fc binding protein (FcγBP) in human normal thyroid tissue, thyroid adenomas and thyroid carcinomas. *J Endocrinol* 174, 517-524.
- Olson, J.K., Girvin, A.M., Miller, S.D., 2001. Direct activation of innate and antigen-presenting functions of microglia following infection with Theiler's virus. *J Virol* 75, 9780-9789.
- Olson, J.K., Miller, S.D., 2004. Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol* 173, 3916-3924.
- Onizuka, S., Tawara, I., Shimizu, J., Sakaguchi, S., Fujita, T., Nakayama, E., 1999. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res* 59, 3128-3133.
- Orend, G., Chiquet-Ehrismann, R., 2006. Tenascin-C induced signaling in cancer. *Cancer Lett* 244, 143-163.
- Orentas, R.J., Kohler, M.E., Johnson, B.D., 2006. Suppression of anti-cancer immunity by regulatory T cells: back to the future. *Semin Cancer Biol* 16, 137-149.
- Paglinawan, R., Malipiero, U., Schlapbach, R., Frei, K., Reith, W., Fontana, A., 2003. TGFβ directs gene expression of activated microglia to an anti-inflammatory phenotype strongly focusing on chemokine genes and cell migratory genes. *Glia* 44, 219-231.
- Papavasiliou, A.K., Mehler, M.F., Dobrenis, K., Marmur, R., Mabie, P.C., Kessler, J.A., 1996. Microglial lineage species are expressed in mammalian epidermal growth factor-generated embryonic neurospheres. *J Neurosci Res* 46, 49-57.
- Pasare, C., Medzhitov, R., 2004. Toll-like receptors and acquired immunity. *Semin Immunol* 16, 23-26.
- Paterson, J.A., Privat, A., Ling, E.A., Leblond, C.P., 1973. Investigation of glial cells in semithin sections. 3. Transformation of subependymal cells into glial cells, as shown by radioautography after 3 H-thymidine injection into the lateral ventricle of the brain of young rats. *J Comp Neurol* 149, 83-102.
- Pazmany, T., Mechtler, L., Tomasi, T.B., Kosa, J.P., Turoczi, A., Urbanyi, Z., 1999. Differential regulation of major histocompatibility complex class II expression and nitric oxide release by beta-amyloid in rat astrocyte and microglia. *Brain Res* 835, 213-223.
- Peiser, L., Mukhopadhyay, S., Gordon, S., 2002. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 14, 123-128.
- Pellegatta, S., Poliani, P.L., Corno, D., Grisoli, M., Cusimano, M., Ubiali, F., Baggi, F., Bruzzone, M.G., Finocchiaro, G., 2006. Dendritic cells pulsed with glioma lysates

- induce immunity against syngeneic intracranial gliomas and increase survival of tumor-bearing mice. *Neurol Res* 28, 527-531.
- Pender, M.P., Rist, M.J., 2001. Apoptosis of inflammatory cells in immune control of the nervous system: role of glia. *Glia* 36, 137-144.
- Peng, G., Guo, Z., Kiniwa, Y., Voo, K.S., Peng, W., Fu, T., Wang, D.Y., Li, Y., Wang, H.Y., Wang, R.F., 2005. Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4⁺ regulatory T cell function. *Science* 309, 1380-1384.
- Peng, S.L., 2005. Signaling in B cells via Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 17, 230-236.
- Pennell, N.A., Streit, W.J., 1997. Colonization of neural allografts by host microglial cells: relationship to graft neovascularization. *Cell Transplant* 6, 221-230.
- Platt, N., da Silva, R.P., Gordon, S., 1999. Class A scavenger receptors and the phagocytosis of apoptotic cells. *Immunol Lett* 65, 15-19.
- Platt, N., Suzuki, H., Kurihara, Y., Kodama, T., Gordon, S., 1996. Role for the class A macrophage scavenger receptor in the phagocytosis of apoptotic thymocytes in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12456-12460.
- Platten, M., Kretz, A., Naumann, U., Aulwurm, S., Egashira, K., Isenmann, S., Weller, M., 2003. Monocyte chemoattractant protein-1 increases microglial infiltration and aggressiveness of gliomas. *Ann Neurol* 54, 388-392.
- Platten, M., Wick, W., Weller, M., 2001. Malignant glioma biology: role for TGF-beta in growth, motility, angiogenesis, and immune escape. *Microsc Res Tech* 52, 401-410.
- Polazzi, E., Contestabile, A., 2002. Reciprocal interactions between microglia and neurons: from survival to neuropathology. *Rev Neurosci* 13, 221-242.
- Polfliet, M.M., van de Veerdonk, F., Dopp, E.A., van Kesteren-Hendriks, E.M., van Rooijen, N., Dijkstra, C.D., van den Berg, T.K., 2002. The role of perivascular and meningeal macrophages in experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 122, 1-8.
- Polfliet, M.M., Zwijnenburg, P.J., van Furth, A.M., van der Poll, T., Dopp, E.A., Renardel de Lavalette, C., van Kesteren-Hendriks, E.M., van Rooijen, N., Dijkstra, C.D., van den Berg, T.K., 2001. Meningeal and perivascular macrophages of the central nervous system play a protective role during bacterial meningitis. *J Immunol* 167, 4644-4650.
- Ponomarev, E.D., Novikova, M., Maresz, K., Shriver, L.P., Dittel, B.N., 2005a. Development of a culture system that supports adult microglial cell proliferation and maintenance in the resting state. *J Immunol Methods* 300, 32-46.
- Ponomarev, E.D., Shriver, L.P., Dittel, B.N., 2006. CD40 expression by microglial cells is required for their completion of a two-step activation process during central nervous system autoimmune inflammation. *J Immunol* 176, 1402-1410.

- Ponomarev, E.D., Shriver, L.P., Maresz, K., Dittel, B.N., 2005b. Microglial cell activation and proliferation precedes the onset of CNS autoimmunity. *J Neurosci Res* 81, 374-389.
- Prat, A., Biernacki, K., Wosik, K., Antel, J.P., 2001. Glial cell influence on the human blood-brain barrier. *Glia* 36, 145-155.
- Pratt, B.M., McPherson, J.M., 1997. TGF-beta in the central nervous system: potential roles in ischemic injury and neurodegenerative diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 8, 267-292.
- Prehaud, C., Megret, F., Lafage, M., Lafon, M., 2005. Virus infection switches TLR-3-positive human neurons to become strong producers of beta interferon. *J Virol* 79, 12893-12904.
- Priller, J., Flugel, A., Wehner, T., Boentert, M., Haas, C.A., Prinz, M., Fernandez-Klett, F., Prass, K., Bechmann, I., de Boer, B.A., Frotscher, M., Kreutzberg, G.W., Persons, D.A., Dirnagl, U., 2001. Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. *Nat Med* 7, 1356-1361.
- Proescholdt, M.A., Merrill, M.J., Ikejiri, B., Walbridge, S., Akbasak, A., Jacobson, S., Oldfield, E.H., 2001. Site-specific immune response to implanted gliomas. *J Neurosurg* 95, 1012-1019.
- Prufer, K., Veenstra, T.D., Jirikowski, G.F., Kumar, R., 1999. Distribution of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor immunoreactivity in the rat brain and spinal cord. *J Chem Neuroanat* 16, 135-145.
- Qing, Z., Sewell, D., Sandor, M., Fabry, Z., 2000. Antigen-specific T cell trafficking into the central nervous system. *J Neuroimmunol* 105, 169-178.
- Quattrocchi, K.B., Miller, C.H., Cush, S., Bernard, S.A., Dull, S.T., Smith, M., Gudeman, S., Varia, M.A., 1999. Pilot study of local autologous tumor infiltrating lymphocytes for the treatment of recurrent malignant gliomas. *J Neurooncol* 45, 141-157.
- Rabchevsky, A.G., Streit, W.J., 1997. Grafting of cultured microglial cells into the lesioned spinal cord of adult rats enhances neurite outgrowth. *J Neurosci Res* 47, 34-48.
- Ramsauer, M., Krause, D., Dermietzel, R., 2002. Angiogenesis of the blood-brain barrier in vitro and the function of cerebral pericytes. *Faseb J* 16, 1274-1276.
- Ransohoff, R.M., Kivisakk, P., Kidd, G., 2003. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol* 3, 569-581.
- Rao, K., Lund, R.D., 1993. Optic nerve degeneration induces the expression of MHC antigens in the rat visual system. *J Comp Neurol* 336, 613-627.
- Rappert, A., Bechmann, I., Pivneva, T., Mahlo, J., Biber, K., Nolte, C., Kovac, A.D., Gerard, C., Boddeke, H.W., Nitsch, R., Kettenmann, H., 2004. CXCR3-dependent microglial recruitment is essential for dendrite loss after brain lesion. *J Neurosci* 24, 8500-8509.

- Rappert, A., Biber, K., Nolte, C., Lipp, M., Schubel, A., Lu, B., Gerard, N.P., Gerard, C., Boddeke, H.W., Kettenmann, H., 2002. Secondary lymphoid tissue chemokine (CCL21) activates CXCR3 to trigger a Cl⁻ current and chemotaxis in murine microglia. *J Immunol* 168, 3221-3226.
- Re, F., Belyanskaya, S.L., Riese, R.J., Cipriani, B., Fischer, F.R., Granucci, F., Ricciardi-Castagnoli, P., Brosnan, C., Stern, L.J., Strominger, J.L., Santambrogio, L., 2002. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces an expression program in neonatal microglia that primes them for antigen presentation. *J Immunol* 169, 2264-2273.
- Rebenko-Moll, N.M., Liu, L., Cardona, A., Ransohoff, R.M., 2006. Chemokines, mononuclear cells and the nervous system: heaven (or hell) is in the details. *Curr Opin Immunol* 18, 683-689.
- Reddick, W.E., Shan, Z.Y., Glass, J.O., Helton, S., Xiong, X., Wu, S., Bonner, M.J., Howard, S.C., Christensen, R., Khan, R.B., Pui, C.H., Mulhern, R.K., 2006. Smaller white-matter volumes are associated with larger deficits in attention and learning among long-term survivors of acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 106, 941-949.
- Reichert, F., Rotshenker, S., 2003. Complement-receptor-3 and scavenger-receptor-AI/II mediated myelin phagocytosis in microglia and macrophages. *Neurobiol Dis* 12, 65-72.
- Reichmann, G., Schroeter, M., Jander, S., Fischer, H.G., 2002. Dendritic cells and dendritic-like microglia in focal cortical ischemia of the mouse brain. *J Neuroimmunol* 129, 125-132.
- Reinke, E., Fabry, Z., 2006. Breaking or making immunological privilege in the central nervous system: the regulation of immunity by neuropeptides. *Immunol Lett* 104, 102-109.
- Riffkin, C.D., Gray, A.Z., Hawkins, C.J., Chow, C.W., Ashley, D.M., 2001. Ex vivo pediatric brain tumors express Fas (CD95) and FasL (CD95L) and are resistant to apoptosis induction. *Neuro-oncol* 3, 229-240.
- Riol-Blanco, L., Sanchez-Sanchez, N., Torres, A., Tejedor, A., Narumiya, S., Corbi, A.L., Sanchez-Mateos, P., Rodriguez-Fernandez, J.L., 2005. The chemokine receptor CCR7 activates in dendritic cells two signaling modules that independently regulate chemotaxis and migratory speed. *J Immunol* 174, 4070-4080.
- Rock, K.L., Shen, L., 2005. Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunol Rev* 207, 166-183.
- Rock, R.B., Gekker, G., Hu, S., Sheng, W.S., Cheeran, M., Lokensgard, J.R., Peterson, P.K., 2004. Role of microglia in central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev* 17, 942-964, table of contents.
- Rodriguez, P.C., Ochoa, A.C., 2006. T cell dysfunction in cancer: role of myeloid cells and tumor cells regulating amino acid availability and oxidative stress. *Semin Cancer Biol* 16, 66-72.

- Roth, W., Isenmann, S., Nakamura, M., Platten, M., Wick, W., Kleihues, P., Bahr, M., Ohgaki, H., Ashkenazi, A., Weller, M., 2001. Soluble decoy receptor 3 is expressed by malignant gliomas and suppresses CD95 ligand-induced apoptosis and chemotaxis. *Cancer Res* 61, 2759-2765.
- Rothenfusser, S., Hornung, V., Krug, A., Towarowski, A., Krieg, A.M., Endres, S., Hartmann, G., 2001. Distinct CpG oligonucleotide sequences activate human gamma delta T cells via interferon-alpha/-beta. *Eur J Immunol* 31, 3525-3534.
- Rotshenker, S., 2003. Microglia and macrophage activation and the regulation of complement-receptor-3 (CR3/MAC-1)-mediated myelin phagocytosis in injury and disease. *J Mol Neurosci* 21, 65-72.
- Rubin, L.L., Barbu, K., Bard, F., Cannon, C., Hall, D.E., Horner, H., Janatpour, M., Liaw, C., Manning, K., Morales, J., et al., 1991. Differentiation of brain endothelial cells in cell culture. *Ann N Y Acad Sci* 633, 420-425.
- Ruiz, C., Huang, W., Hegi, M.E., Lange, K., Hamou, M.F., Fluri, E., Oakeley, E.J., Chiquet-Ehrismann, R., Orend, G., 2004. Growth promoting signaling by tenascin-C [corrected]. *Cancer Res* 64, 7377-7385.
- Ryuto, M., Ono, M., Izumi, H., Yoshida, S., Weich, H.A., Kohno, K., Kuwano, M., 1996. Induction of vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor alpha in human glioma cells. Possible roles of SP-1. *J Biol Chem* 271, 28220-28228.
- Sabroe, I., Dower, S.K., Whyte, M.K., 2005. The role of Toll-like receptors in the regulation of neutrophil migration, activation, and apoptosis. *Clin Infect Dis* 41 Suppl 7, S421-426.
- Sakaguchi, S., 2005. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 6, 345-352.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., Toda, M., 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155, 1151-1164.
- Sanchez-Sanchez, N., Riol-Blanco, L., Rodriguez-Fernandez, J.L., 2006. The multiple personalities of the chemokine receptor CCR7 in dendritic cells. *J Immunol* 176, 5153-5159.
- Sandler, A.D., Chihara, H., Kobayashi, G., Zhu, X., Miller, M.A., Scott, D.L., Krieg, A.M., 2003. CpG oligonucleotides enhance the tumor antigen-specific immune response of a granulocyte macrophage colony-stimulating factor-based vaccine strategy in neuroblastoma. *Cancer Res* 63, 394-399.
- Santambrogio, L., Belyanskaya, S.L., Fischer, F.R., Cipriani, B., Brosnan, C.F., Ricciardi-Castagnoli, P., Stern, L.J., Strominger, J.L., Riese, R., 2001. Developmental plasticity of CNS microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6295-6300.

- Sasaki, A., Horikoshi, Y., Yokoo, H., Nakazato, Y., Yamaguchi, H., 2003. Antiserum against human glucose transporter 5 is highly specific for microglia among cells of the mononuclear phagocyte system. *Neurosci Lett* 338, 17-20.
- Sasaki, M., Nakahira, K., Kawano, Y., Katakura, H., Yoshimine, T., Shimizu, K., Kim, S.U., Ikenaka, K., 2001. MAGE-E1, a new member of the melanoma-associated antigen gene family and its expression in human glioma. *Cancer Res* 61, 4809-4814.
- Sauter, B., Albert, M.L., Francisco, L., Larsson, M., Somersan, S., Bhardwaj, N., 2000. Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med* 191, 423-434.
- Schartner, J.M., Hagar, A.R., Van Handel, M., Zhang, L., Nadkarni, N., Badie, B., 2005. Impaired capacity for upregulation of MHC class II in tumor-associated microglia. *Glia* 51, 279-285.
- Schilling, M., Besselmann, M., Leonhard, C., Mueller, M., Ringelstein, E.B., Kiefer, R., 2003. Microglial activation precedes and predominates over macrophage infiltration in transient focal cerebral ischemia: a study in green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Exp Neurol* 183, 25-33.
- Schilling, M., Besselmann, M., Muller, M., Strecker, J.K., Ringelstein, E.B., Kiefer, R., 2005. Predominant phagocytic activity of resident microglia over hematogenous macrophages following transient focal cerebral ischemia: An investigation using green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Exp Neurol* 196, 290-297.
- Schmidt, G., Richter, K., 2000. Expression pattern of XIRG, a marker for non-neural ectoderm. *Dev Genes Evol* 210, 575-578.
- Schmidtmayer, J., Jacobsen, C., Miksch, G., Sievers, J., 1994. Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells on monolayers of astrocytes: membrane currents. *Glia* 12, 259-267.
- Schmitz, M., Wehner, R., Stevanovic, S., Kiessling, A., Rieger, M.A., Temme, A., Bachmann, M., Rieber, E.P., Weigle, B., 2007. Identification of a naturally processed T cell epitope derived from the glioma-associated protein SOX11. *Cancer Lett* 245, 331-336.
- Schnorrer, P., Behrens, G.M., Wilson, N.S., Pooley, J.L., Smith, C.M., El-Sukkari, D., Davey, G., Kupresanin, F., Li, M., Maraskovsky, E., Belz, G.T., Carbone, F.R., Shortman, K., Heath, W.R., Villadangos, J.A., 2006. The dominant role of CD8+ dendritic cells in cross-presentation is not dictated by antigen capture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 10729-10734.
- Schroder, K., Sweet, M.J., Hume, D.A., 2006. Signal integration between IFN γ and TLR signalling pathways in macrophages. *Immunobiology* 211, 511-524.
- Schwartz, M., Kipnis, J., 2005. Therapeutic T Cell-Based Vaccination for Neurodegenerative Disorders: The Role of CD4+CD25+ Regulatory T Cells. *Ann N Y Acad Sci* 1051, 701-708.

- 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, P., Borrello, I., Bronte, V., 2006. Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression. *Semin Cancer Biol* 16, 53-65.
- Serot, J.M., Bene, M.C., Foliguet, B., Faure, G.C., 2000. Monocyte-derived IL-10-secreting dendritic cells in choroid plexus epithelium. *J Neuroimmunol* 105, 115-119.
- Serot, J.M., Foliguet, B., Bene, M.C., Faure, G.C., 1997. Ultrastructural and immunohistological evidence for dendritic-like cells within human choroid plexus epithelium. *Neuroreport* 8, 1995-1998.
- Servet-Delprat, C., Arnaud, S., Jurdic, P., Nataf, S., Grasset, M.F., Soulas, C., Domenget, C., Destaing, O., Rivollier, A., Perret, M., Dumontel, C., Hanau, D., Gilmore, G.L., Belin, M.F., Roubourdin-Combe, C., Mouchiroud, G., 2002. Flt3+ macrophage precursors commit sequentially to osteoclasts, dendritic cells and microglia. *BMC Immunol* 3, 15.
- Sharma, S., Yang, S.C., Zhu, L., Reckamp, K., Gardner, B., Baratelli, F., Huang, M., Batra, R.K., Dubinett, S.M., 2005. Tumor cyclooxygenase-2/prostaglandin E2-dependent promotion of FOXP3 expression and CD4+ CD25+ T regulatory cell activities in lung cancer. *Cancer Res* 65, 5211-5220.
- Shen, L., Rock, K.L., 2006. Priming of T cells by exogenous antigen cross-presented on MHC class I molecules. *Curr Opin Immunol* 18, 85-91.
- Shi, S., Blumenthal, A., Hickey, C.M., Gandotra, S., Levy, D., Ehrt, S., 2005. Expression of Many Immunologically Important Genes in Mycobacterium tuberculosis-Infected Macrophages Is Independent of Both TLR2 and TLR4 but Dependent on IFN- α Receptor and STAT1. *J Immunol* 175, 3318-3328.
- Shi, S., Nathan, C., Schnappinger, D., Drenkow, J., Fuortes, M., Block, E., Ding, A., Gingeras, T.R., Schoolnik, G., Akira, S., Takeda, K., Ehrt, S., 2003. MyD88 primes macrophages for full-scale activation by interferon-gamma yet mediates few responses to Mycobacterium tuberculosis. *J Exp Med* 198, 987-997.
- Shrikant, P., Lee, S.J., Kalvakolanu, I., Ransohoff, R.M., Benveniste, E.N., 1996. Stimulus-specific inhibition of intracellular adhesion molecule-1 gene expression by TGF-beta. *J Immunol* 157, 892-900.
- Sievers, J., Parwaresch, R., Wottge, H.U., 1994. Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells on monolayers of astrocytes: morphology. *Glia* 12, 245-258.
- Sigal, A., Rotter, V., 2000. Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Res* 60, 6788-6793.
- Silva, G.C., Nagib, P.R., Chiari, E., van Rooijen, N., Machado, C.R., Camargos, E.R., 2004. Peripheral macrophage depletion reduces central nervous system parasitism and damage in Trypanosoma cruzi-infected suckling rats. *J Neuroimmunol* 149, 50-58.

- Simard, A.R., Rivest, S., 2004. Bone marrow stem cells have the ability to populate the entire central nervous system into fully differentiated parenchymal microglia. *FASEB J* 18, 998-1000.
- Sivori, S., Carlomagno, S., Moretta, L., Moretta, A., 2006. Comparison of different CpG oligodeoxynucleotide classes for their capability to stimulate human NK cells. *Eur J Immunol* 36, 961-967.
- Smirnova, I.V., Ma, J.Y., Citron, B.A., Ratzlaff, K.T., Gregory, E.J., Akaaboune, M., Festoff, B.W., 1996. Neural thrombin and protease nexin I kinetics after murine peripheral nerve injury. *J Neurochem* 67, 2188-2199.
- Smith, M.E., 2001. Phagocytic properties of microglia in vitro: implications for a role in multiple sclerosis and EAE. *Microsc Res Tech* 54, 81-94.
- Sobek, V., Birkner, N., Falk, I., Wurch, A., Kirschning, C.J., Wagner, H., Wallich, R., Lamers, M.C., Simon, M.M., 2004. Direct Toll-like receptor 2 mediated co-stimulation of T cells in the mouse system as a basis for chronic inflammatory joint disease. *Arthritis Res Ther* 6, R433-446.
- Sonobe, Y., Yawata, I., Kawanokuchi, J., Takeuchi, H., Mizuno, T., Suzumura, A., 2005. Production of IL-27 and other IL-12 family cytokines by microglia and their subpopulations. *Brain Res* 1040, 202-207.
- Soos, J.M., Ashley, T.A., Morrow, J., Patarroyo, J.C., Szente, B.E., Zamvil, S.S., 1999. Differential expression of B7 co-stimulatory molecules by astrocytes correlates with T cell activation and cytokine production. *Int Immunol* 11, 1169-1179.
- Steuer, H., Jaworski, A., Elger, B., Kaussmann, M., Keldenich, J., Schneider, H., Stoll, D., Schlosshauer, B., 2005. Functional characterization and comparison of the outer blood-retina barrier and the blood-brain barrier. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, 1047-1053.
- Stoll, G., Jander, S., Schroeter, M., 1998. Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Prog Neurobiol* 56, 149-171.
- Streit, W.J., 2002. Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* 40, 133-139.
- Streit, W.J., 2006. Microglial senescence: does the brain's immune system have an expiration date? *Trends Neurosci* 29, 506-510.
- Streit, W.J., Condeelis, J.R., Fendrick, S.E., Flanary, B.E., Mariani, C.L., 2005. Role of microglia in the central nervous system's immune response. *Neurol Res* 27, 685-691.
- Streit, W.J., Sammons, N.W., Kuhns, A.J., Sparks, D.L., 2004. Dystrophic microglia in the aging human brain. *Glia* 45, 208-212.
- Strik, H.M., Stoll, M., Meyermann, R., 2004. Immune cell infiltration of intrinsic and metastatic intracranial tumours. *Anticancer Res* 24, 37-42.

- Suter, T., Biollaz, G., Gatto, D., Bernasconi, L., Herren, T., Reith, W., Fontana, A., 2003. The brain as an immune privileged site: dendritic cells of the central nervous system inhibit T cell activation. *Eur J Immunol* 33, 2998-3006.
- Sutmuller, R.P., den Brok, M.H., Kramer, M., Bennink, E.J., Toonen, L.W., Kullberg, B.J., Joosten, L.A., Akira, S., Netea, M.G., Adema, G.J., 2006. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J Clin Invest* 116, 485-494.
- Sutmuller, R.P., van Duivenvoorde, L.M., van Elsas, A., Schumacher, T.N., Wildenberg, M.E., Allison, J.P., Toes, R.E., Offringa, R., Melief, C.J., 2001. Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med* 194, 823-832.
- Suzumura, A., Sawada, M., Yamamoto, H., Marunouchi, T., 1993. Transforming growth factor-beta suppresses activation and proliferation of microglia in vitro. *J Immunol* 151, 2150-2158.
- Switaj, T., Jalili, A., Jakubowska, A.B., Drela, N., Stoksik, M., Nowis, D., Basak, G., Golab, J., Wysocki, P.J., Mackiewicz, A., Sasor, A., Socha, K., Jakobisiak, M., Lasek, W., 2004. CpG immunostimulatory oligodeoxynucleotide 1826 enhances antitumor effect of interleukin 12 gene-modified tumor vaccine in a melanoma model in mice. *Clin Cancer Res* 10, 4165-4175.
- Takahashi, K., Yamamura, F., Naito, M., 1989. Differentiation, maturation, and proliferation of macrophages in the mouse yolk sac: a light-microscopic, enzyme-cytochemical, immunohistochemical, and ultrastructural study. *J Leukoc Biol* 45, 87-96.
- Tamai, I., Tsuji, A., 2000. Transporter-mediated permeation of drugs across the blood-brain barrier. *J Pharm Sci* 89, 1371-1388.
- Tan, L., Gordon, K.B., Mueller, J.P., Matis, L.A., Miller, S.D., 1998. Presentation of proteolipid protein epitopes and B7-1-dependent activation of encephalitogenic T cells by IFN-gamma-activated SJL/J astrocytes. *J Immunol* 160, 4271-4279.
- Tanaka, H., Tanaka, J., Kjaergaard, J., Shu, S., 2002. Depletion of CD4+ CD25+ regulatory cells augments the generation of specific immune T cells in tumor-draining lymph nodes. *J Immunother* 25, 207-217.
- Taniguchi, Y., Ono, K., Yoshida, S., Tanaka, R., 2000. Antigen-presenting capability of glial cells under glioma-harboring conditions and the effect of glioma-derived factors on antigen presentation. *J Neuroimmunol* 111, 177-185.
- Terabe, M., Khanna, C., Bose, S., Melchionda, F., Mendoza, A., Mackall, C.L., Helman, L.J., Berzofsky, J.A., 2006. CD1d-restricted natural killer T cells can down-regulate tumor immunosurveillance independent of interleukin-4 receptor-signal transducer and activator of transcription 6 or transforming growth factor-beta. *Cancer Res* 66, 3869-3875.
- Terabe, M., Matsui, S., Noben-Trauth, N., Chen, H., Watson, C., Donaldson, D.D., Carbone, D.P., Paul, W.E., Berzofsky, J.A., 2000. NKT cell-mediated repression of tumor

- immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nat Immunol* 1, 515-520.
- Terabe, M., Swann, J., Ambrosino, E., Sinha, P., Takaku, S., Hayakawa, Y., Godfrey, D.I., Ostrand-Rosenberg, S., Smyth, M.J., Berzofsky, J.A., 2005. A nonclassical non-Valpha14Jalpha18 CD1d-restricted (type II) NKT cell is sufficient for down-regulation of tumor immunosurveillance. *J Exp Med* 202, 1627-1633.
- Thomas, D.A., Massague, J., 2005. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* 8, 369-380.
- Thomas, W.E., 1999. Brain macrophages: on the role of pericytes and perivascular cells. *Brain Res Brain Res Rev* 31, 42-57.
- Ting, J.P., Nixon, D.F., Weiner, L.P., Frelinger, J.A., 1983. Brain Ia antigens have a bone marrow origin. *Immunogenetics* 17, 295-301.
- Trajkovic, V., Vuckovic, O., Stosic-Grujicic, S., Miljkovic, D., Popadic, D., Markovic, M., Bumbasirevic, V., Backovic, A., Cvetkovic, I., Harhaji, L., Ramic, Z., Mostarica Stojkovic, M., 2004. Astrocyte-induced regulatory T cells mitigate CNS autoimmunity. *Glia* 47, 168-179.
- Trebst, C., Sorensen, T.L., Kivisakk, P., Cathcart, M.K., Hesselgesser, J., Horuk, R., Sellebjerg, F., Lassmann, H., Ransohoff, R.M., 2001. CCR1+/CCR5+ mononuclear phagocytes accumulate in the central nervous system of patients with multiple sclerosis. *Am J Pathol* 159, 1701-1710.
- Tsuboi, K., Saijo, K., Ishikawa, E., Tsurushima, H., Takano, S., Morishita, Y., Ohno, T., 2003. Effects of local injection of ex vivo expanded autologous tumor-specific T lymphocytes in cases with recurrent malignant gliomas. *Clin Cancer Res* 9, 3294-3302.
- Tsujimoto, H., Ono, S., Matsumoto, A., Kawabata, T., Kinoshita, M., Majima, T., Hiraki, S., Seki, S., Moldawer, L.L., Mochizuki, H., 2006. A critical role of CpG motifs in a murine peritonitis model by their binding to highly expressed toll-like receptor-9 on liver NKT cells. *J Hepatol* 45, 836-843.
- Tvinnereim, A.R., Hamilton, S.E., Harty, J.T., 2004. Neutrophil involvement in cross-priming CD8+ T cell responses to bacterial antigens. *J Immunol* 173, 1994-2002.
- Uchimura, K., Morimoto-Tomita, M., Bistrup, A., Li, J., Lyon, M., Gallagher, J., Werb, Z., Rosen, S.D., 2006. HSulf-2, an extracellular endoglucosamine-6-sulfatase, selectively mobilizes heparin-bound growth factors and chemokines: effects on VEGF, FGF-1, and SDF-1. *BMC Biochem* 7, 2.
- Unsicker, K., Flanders, K.C., Cissel, D.S., Lafyatis, R., Sporn, M.B., 1991. Transforming growth factor beta isoforms in the adult rat central and peripheral nervous system. *Neuroscience* 44, 613-625.
- Uyttenhove, C., Pilotte, L., Theate, I., Stroobant, V., Colau, D., Parmentier, N., Boon, T., Van den Eynde, B.J., 2003. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med* 9, 1269-1274.

- Vallieres, L., Sawchenko, P.E., 2003. Bone marrow-derived cells that populate the adult mouse brain preserve their hematopoietic identity. *J Neurosci* 23, 5197-5207.
- van den Berg, T.K., Dopp, E.A., Dijkstra, C.D., 2001. Rat macrophages: membrane glycoproteins in differentiation and function. *Immunol Rev* 184, 45-57.
- van Hall, T., Wolpert, E.Z., van Veelen, P., Laban, S., van der Veer, M., Roseboom, M., Bres, S., Grufman, P., de Ru, A., Meiring, H., de Jong, A., Franken, K., Teixeira, A., Valentijn, R., Drijfhout, J.W., Koning, F., Camps, M., Ossendorp, F., Karre, K., Ljunggren, H.G., Melief, C.J., Offringa, R., 2006. Selective cytotoxic T-lymphocyte targeting of tumor immune escape variants. *Nat Med* 12, 417-424.
- van Mierlo, G.J., Boonman, Z.F., Dumortier, H.M., den Boer, A.T., Fransen, M.F., Nouta, J., van der Voort, E.I., Offringa, R., Toes, R.E., Melief, C.J., 2004. Activation of dendritic cells that cross-present tumor-derived antigen licenses CD8+ CTL to cause tumor eradication. *J Immunol* 173, 6753-6759.
- Ventimiglia, J.B., Wikstrand, C.J., Ostrowski, L.E., Bourdon, M.A., Lightner, V.A., Bigner, D.D., 1992. Tenascin expression in human glioma cell lines and normal tissues. *J Neuroimmunol* 36, 41-55.
- Vilhardt, F., 2005. Microglia: phagocyte and glia cell. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 17-21.
- Visintin, A., Mazzoni, A., Spitzer, J.H., Wyllie, D.H., Dower, S.K., Segal, D.M., 2001. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol* 166, 249-255.
- Vollmer, J., Weeratna, R., Payette, P., Jurk, M., Schetter, C., Laucht, M., Wader, T., Tluk, S., Liu, M., Davis, H.L., Krieg, A.M., 2004. Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *Eur J Immunol* 34, 251-262.
- von Bergwelt-Baildon, M.S., Popov, A., Saric, T., Chemnitz, J., Classen, S., Stoffel, M.S., Fiore, F., Roth, U., Beyer, M., Debey, S., Wickenhauser, C., Hanisch, F.G., Schultze, J.L., 2006. CD25 and indoleamine 2,3-dioxygenase are up-regulated by prostaglandin E2 and expressed by tumor-associated dendritic cells in vivo: additional mechanisms of T-cell inhibition. *Blood* 108, 228-237.
- von Boehmer, H., 2005. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol* 6, 338-344.
- Voronov, E., Shouval, D.S., Krelin, Y., Cagnano, E., Benharroch, D., Iwakura, Y., Dinarello, C.A., Apte, R.N., 2003. IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2645-2650.
- Wadachi, R., Hargreaves, K.M., 2006. Trigeminal nociceptors express TLR-4 and CD14: a mechanism for pain due to infection. *J Dent Res* 85, 49-53.
- Wagner, S., Czub, S., Greif, M., Vince, G.H., Suss, N., Kerkau, S., Rieckmann, P., Roggendorf, W., Roosen, K., Tonn, J.C., 1999. Microglial/macrophage expression of interleukin 10 in human glioblastomas. *Int J Cancer* 82, 12-16.

- Wagner, S., Stegen, C., Bouterfa, H., Huettner, C., Kerkau, S., Roggendorf, W., Roosen, K., Tonn, J.C., 1998. Expression of matrix metalloproteinases in human glioma cell lines in the presence of IL-10. *J Neurooncol* 40, 113-122.
- Walker, P.R., Calzascia, T., de Tribolet, N., Dietrich, P.Y., 2003. T-cell immune responses in the brain and their relevance for cerebral malignancies. *Brain Res Brain Res Rev* 42, 97-122.
- Walker, P.R., Calzascia, T., Dietrich, P.Y., 2002. All in the head: obstacles for immune rejection of brain tumours. *Immunology* 107, 28-38.
- Walker, P.R., Calzascia, T., Schnuriger, V., Scamuffa, N., Saas, P., de Tribolet, N., Dietrich, P.Y., 2000. The brain parenchyma is permissive for full antitumor CTL effector function, even in the absence of CD4 T cells. *J Immunol* 165, 3128-3135.
- Walker, W.S., Gatewood, J., Olivas, E., Askew, D., Havenith, C.E., 1995. Mouse microglial cell lines differing in constitutive and interferon-gamma-inducible antigen-presenting activities for naive and memory CD4+ and CD8+ T cells. *J Neuroimmunol* 63, 163-174.
- Wang, R.F., 2006a. Functional control of regulatory T cells and cancer immunotherapy. *Semin Cancer Biol* 16, 106-114.
- Wang, R.F., 2006b. Immune suppression by tumor-specific CD4+ regulatory T-cells in cancer. *Semin Cancer Biol* 16, 73-79.
- Wei, R., Jonakait, G.M., 1999. Neurotrophins and the anti-inflammatory agents interleukin-4 (IL-4), IL-10, IL-11 and transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) down-regulate T cell costimulatory molecules B7 and CD40 on cultured rat microglia. *J Neuroimmunol* 95, 8-18.
- Weigel, B.J., Rodeberg, D.A., Krieg, A.M., Blazar, B.R., 2003. CpG oligodeoxynucleotides potentiate the antitumor effects of chemotherapy or tumor resection in an orthotopic murine model of rhabdomyosarcoma. *Clin Cancer Res* 9, 3105-3114.
- Weiner, G.J., 2000. The immunobiology and clinical potential of immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides. *J Leukoc Biol* 68, 455-463.
- Wekerle, H., 2006. Breaking ignorance: the case of the brain. *Curr Top Microbiol Immunol* 305, 25-50.
- Wekerle, H., Bradl, M., Linington, C., Kaab, G., Kojima, K., 1996. The shaping of the brain-specific T lymphocyte repertoire in the thymus. *Immunol Rev* 149, 231-243.
- Wiendl, H., Mitsdoerffer, M., Hofmeister, V., Wischhusen, J., Bornemann, A., Meyermann, R., Weiss, E.H., Melms, A., Weller, M., 2002. A functional role of HLA-G expression in human gliomas: an alternative strategy of immune escape. *J Immunol* 168, 4772-4780.
- Wiendl, H., Mitsdoerffer, M., Weller, M., 2003. Hide-and-peek in the brain: a role for HLA-G mediating immune privilege for glioma cells. *Semin Cancer Biol* 13, 343-351.

- Williams, L., Bradley, L., Smith, A., Foxwell, B., 2004. Signal transducer and activator of transcription 3 is the dominant mediator of the anti-inflammatory effects of IL-10 in human macrophages. *J Immunol* 172, 567-576.
- Wilmotte, R., Burkhardt, K., Kindler, V., Belkouch, M.C., Dussex, G., Tribolet, N., Walker, P.R., Dietrich, P.Y., 2005. B7-homolog 1 expression by human glioma: a new mechanism of immune evasion. *Neuroreport* 16, 1081-1085.
- Wintterle, S., Schreiner, B., Mitsdoerffer, M., Schneider, D., Chen, L., Meyermann, R., Weller, M., Wiendl, H., 2003. Expression of the B7-related molecule B7-H1 by glioma cells: a potential mechanism of immune paralysis. *Cancer Res* 63, 7462-7467.
- Wischhusen, J., Friese, M.A., Mittelbronn, M., Meyermann, R., Weller, M., 2005. HLA-E protects glioma cells from NKG2D-mediated immune responses in vitro: implications for immune escape in vivo. *J Neuropathol Exp Neurol* 64, 523-528.
- Wolswijk, G., 1995. Strongly GD3+ cells in the developing and adult rat cerebellum belong to the microglial lineage rather than to the oligodendrocyte lineage. *Glia* 13, 13-26.
- Woo, E.Y., Yeh, H., Chu, C.S., Schlienger, K., Carroll, R.G., Riley, J.L., Kaiser, L.R., June, C.H., 2002. Cutting edge: Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. *J Immunol* 168, 4272-4276.
- Wu, A.H., Xiao, J., Anker, L., Hall, W.A., Gregerson, D.S., Cavenee, W.K., Chen, W., Low, W.C., 2006. Identification of EGFRvIII-derived CTL epitopes restricted by HLA A0201 for dendritic cell based immunotherapy of gliomas. *J Neurooncol* 76, 23-30.
- Xiao, B.G., Xu, L.Y., Yang, J.S., 2002. TGF-beta 1 synergizes with GM-CSF to promote the generation of glial cell-derived dendriform cells in vitro. *Brain Behav Immun* 16, 685-697.
- Yamanaka, R., Homma, J., Yajima, N., Tsuchiya, N., Sano, M., Kobayashi, T., Yoshida, S., Abe, T., Narita, M., Takahashi, M., Tanaka, R., 2005. Clinical evaluation of dendritic cell vaccination for patients with recurrent glioma: results of a clinical phase I/II trial. *Clin Cancer Res* 11, 4160-4167.
- Yamaoka, K., Mishima, K., Nagashima, Y., Asai, A., Sanai, Y., Kirino, T., 2000. Expression of galectin-1 mRNA correlates with the malignant potential of human gliomas and expression of antisense galectin-1 inhibits the growth of 9 glioma cells. *J Neurosci Res* 59, 722-730.
- Yang, B.C., Lin, H.K., Hor, W.S., Hwang, J.Y., Lin, Y.P., Liu, M.Y., Wang, Y.J., 2003. Mediation of enhanced transcription of the IL-10 gene in T cells, upon contact with human glioma cells, by Fas signaling through a protein kinase A-independent pathway. *J Immunol* 171, 3947-3954.
- Yin, C., Knudson, C.M., Korsmeyer, S.J., Van Dyke, T., 1997. Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo. *Nature* 385, 637-640.
- Yokoyama, A., Yang, L., Itoh, S., Mori, K., Tanaka, J., 2004. Microglia, a potential source of neurons, astrocytes, and oligodendrocytes. *Glia* 45, 96-104.

- Yoshida, J., Wakabayashi, T., Okamoto, S., Kimura, S., Washizu, K., Kiyosawa, K., Mokuno, K., 1994. Tenascin in cerebrospinal fluid is a useful biomarker for the diagnosis of brain tumour. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 57, 1212-1215.
- Yu, J.S., Liu, G., Ying, H., Yong, W.H., Black, K.L., Wheeler, C.J., 2004. Vaccination with tumor lysate-pulsed dendritic cells elicits antigen-specific, cytotoxic T-cells in patients with malignant glioma. *Cancer Res* 64, 4973-4979.
- Yu, N., Zhang, X., Magistretti, P.J., Bloom, F.E., 1998. IL-1-alpha and TNF-alpha differentially regulate CD4 and Mac-1 expression in mouse microglia. *Neuroimmunomodulation* 5, 42-52.
- Yu, P., Gregg, R.K., Bell, J.J., Ellis, J.S., Divekar, R., Lee, H.H., Jain, R., Waldner, H., Hardaway, J.C., Collins, M., Kuchroo, V.K., Zaghouni, H., 2005. Specific T regulatory cells display broad suppressive functions against experimental allergic encephalomyelitis upon activation with cognate antigen. *J Immunol* 174, 6772-6780.
- Yun, H.Y., Dawson, V.L., Dawson, T.M., 1997. Nitric oxide in health and disease of the nervous system. *Mol Psychiatry* 2, 300-310.
- Zagzag, D., Salnikow, K., Chiriboga, L., Yee, H., Lan, L., Ali, M.A., Garcia, R., Demaria, S., Newcomb, E.W., 2005. Downregulation of major histocompatibility complex antigens in invading glioma cells: stealth invasion of the brain. *Lab Invest* 85, 328-341.
- Zagzag, D., Shiff, B., Jallo, G.I., Greco, M.A., Blanco, C., Cohen, H., Hukin, J., Allen, J.C., Friedlander, D.R., 2002. Tenascin-C promotes microvascular cell migration and phosphorylation of focal adhesion kinase. *Cancer Res* 62, 2660-2668.
- Zha, Y., Blank, C., Gajewski, T.F., 2004. Negative regulation of T-cell function by PD-1. *Crit Rev Immunol* 24, 229-237.
- Zhang, L., Yi, H., Xia, X.P., Zhao, Y., 2006. Transforming growth factor-beta: an important role in CD4+CD25+ regulatory T cells and immune tolerance. *Autoimmunity* 39, 269-276.
- Zhu, Y., Roth-Eichhorn, S., Braun, N., Culmsee, C., Rami, A., Kriegelstein, J., 2000. The expression of transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) in hippocampal neurons: a temporary upregulated protein level after transient forebrain ischemia in the rat. *Brain Res* 866, 286-298.
- Zur Lage, S., Goethe, R., Darji, A., Valentin-Weigand, P., Weiss, S., 2003. Activation of macrophages and interference with CD4+ T-cell stimulation by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subspecies *avium*. *Immunology* 108, 62-69.

REFERENCE A PARAITRE :

Silverman, DH., Dy, CJ., Castellon, SA., Lai, J., Pio, BS., Abraham, L., Waddell, K., Petersen, L., Phelps, ME., Ganz, PA., 2006. Altered frontocortical, cerebellar, and basal ganglia activity in adjuvant-treated breast cancer survivors 5-10 years after chemotherapy. *Breast Cancer Res. Treat.*

AUTRES :

Del Rio Hortega, P, 1932. Microglia. In: Penfield W (ed) *Cytology and cellular pathology of the nervous system*, vol 2. Hoeber, New York, pp 481–534.

Medawar, PB., 1948. Immunity to homologous grafted skin. III. The fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to anterior chamber of the eye. *Br. J. Exp. Pathol.* 29 : 58-69.

RESUME :

Les cellules microgliales, principales cellules immunocompétentes résidentes du système nerveux central (SNC), d'origine myéloïde, présentent un potentiel intéressant dans la lutte contre le cancer par leur localisation privilégiée dans les tumeurs cérébrales. A la moindre perturbation de leur microenvironnement, elles s'activent graduellement, ré-expriment toutes les molécules nécessaires à la présentation de l'antigène, perdent leurs prolongements cytoplasmiques jusqu'à devenir amiboïdes et sont donc à terme totalement indiscernables des macrophages périphériques. Dans le cadre d'une immunothérapie anti-tumorale, il est important pour mieux comprendre les réponses immunitaires de pouvoir distinguer les divers protagonistes. Au sein des produits d'une banque soustractive microgliale réalisée auparavant au laboratoire, trois ARNm se sont révélés discriminants entre cellules microgliales et macrophages primaires et ce, même en condition pro- ou anti-inflammatoire. Les cellules microgliales peuvent également dans certaines conditions se différencier en cellules type dendritique. Or ces dernières sont très prometteuses en immunothérapie active, notamment par leur capacité à effectuer la présentation croisée. En utilisant la microglie néonatale ou adulte primaire, nous avons mis en évidence que la microglie *in vitro* et *ex vivo* était aussi capable de présentation croisée et que celle-ci, bien que de faible intensité, peut être modulée positivement par le GM-CSF et le CpG. Deux modèles de tumeurs intracérébrales plus ou moins immunogènes implantées par stéréotaxie chez la souris ont alors été développés afin d'évaluer des protocoles utilisant ces résultats. Ainsi un traitement combinant déplétion des lymphocytes T régulateurs et injection de CpG permet de guérir la plupart des animaux ayant la tumeur la moins agressive mais ne montre en revanche pas de réel bénéfice pour la tumeur très agressive en intracérébral alors qu'en périphérie les résultats sont systématiquement meilleurs. Enfin, l'immune responsive gene 1, issu de la banque soustractive, a été caractérisé et s'avère être un nouveau marqueur potentiel d'activation des cellules immunitaires innées stimulées par les interférons ou les ligands des récepteurs Toll, aussi bien chez la souris que chez l'homme, et pourrait donc être intéressant pour suivre l'évolution de la réponse du système immunitaire après une thérapie.

Mots-clés : système nerveux central, microglie, discrimination, présentation croisée, immunothérapie anti-tumorale, immune responsive gene 1.

ABSTRACT :

Microglial cells are the major immunocompetent cells of the central nervous system. Of myeloid origin, they harbour an interesting potential in anti-cancer therapies through their preferential location in cerebral tumors. Following any modification of their microenvironment, they gradually become activated, re-express all antigen presentation molecules, become amoeboid and are finally indistinguishable from peripheral macrophages. In the context of an anti-tumor immunotherapy, it is essential, to better understand immune responses, to discriminate between all the protagonists. Using products from a microglial subtractive bank previously obtained in the laboratory, we found that three messengers allowed to discriminate between primary microglia and macrophages even in pro or anti-inflammatory condition. Microglial cells can also differentiate in macrophage type cell but it has also been shown that they could follow a dendritic differentiation pathway. These cells are very promising in active anti-tumor immunotherapy especially through their ability to cross-present antigens. Using neonatal and adult primary microglia, we demonstrated that microglia was also able *in vitro* and *ex vivo* to cross-present antigens and that their poor constitutive cross-presentation capacity could be potentiated by substances such as CpG-ODN and GM-CSF. To take advantage of all these results, we developed by stereotaxic implantation in mouse brain two tumor models with different immunogenicity. A therapy combining regulatory T cell depletion and CpG-ODN injection thus allowed to cure most of the animals bearing the less aggressive tumor but wasn't sufficient against the very aggressive model, although better results were consistently obtained against same tumors implanted peripherally. To finish, we also characterized mouse and human immune responsive gene 1, that proved to be a new activation marker of innate immune cells stimulated by interferons or Toll like receptor agonists, and as such could be very useful at least to follow evolution of the immune response after application of a therapy.

Key words : central nervous system, microglia, discrimination, cross-presentation, anti-tumor immunotherapy, immune responsive gene 1.