

Fonctions nucléaires du récepteur de CSF-1 dans les monocytes humains

Laura Bencheikh

► To cite this version:

Laura Bencheikh. Fonctions nucléaires du récepteur de CSF-1 dans les monocytes humains. Biologie moléculaire. Université Paris Saclay (COmUE), 2017. Français. NNT: 2017SACLS426 . tel-01661576

HAL Id: tel-01661576 https://theses.hal.science/tel-01661576

Submitted on 12 Dec 2017 $\,$

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.



NNT: 2017SACLS426





THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY PREPAREE A "UNIVERSITE PARIS SUD"

ECOLE DOCTORALE N° 582 Cancérologie : biologie - médecine - santé

Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Par

Mme Laura BENCHEIKH

Fonctions nucléaires du récepteur de CSF-1 dans les monocytes humains

Thèse présentée et soutenue à « Gustave Roussy », le « 22 novembre 2017 » :

Composition du Jury :

Mme Nathalie CHAPUT-GRAS Mr Patrick AUBERGER Mr Patrice DUBREUIL Mr Jean-Luc PERFETTINI Mr Michael SIEWECKE Mr Eric SOLARY Mme Nathalie DROIN Professeur, Université Paris-Saclay Directeur de recherche, Université Nice Sophia Antipolis Directeur de recherche, Université Aix Marseille Directeur de recherche, Université Paris-Saclay Directeur de recherche, Université Aix Marseille PUPH1, Université Paris-Saclay Chargée de recherche, Université Paris-Saclay Présidente Rapporteur Rapporteur Examinateur Directeur de thèse Co-directrice de thèse

Remerciements

Je tiens à remercier tout particulièrement mes deux directeurs de thèse, Eric et Nathalie sans qui ce travail n'aurait pu voir le jour et qui m'ont épaulée durant toute la durée de cette thèse.

Je remercie également Khadija qui a effectué toutes les analyses bio-informatiques indispensables à l'interprétation de toutes ces expériences, Julie qui m'a encadrée pour réaliser toutes les constructions de vecteurs et les productions virales, Michaël de l'institut Imagine qui m'a aidée à réaliser et analyser les expériences d'imagerie en flux et Frédéric, de la plateforme d'imagerie et cytométrie qui a mis au point l'imagerie sur cellules vivantes. Un remerciement spécial pour Margot qui a isolé les monocytes des patients et qui m'a accompagnée pour toutes les taches dites "annexes" mais indispensables au bon fonctionnement du laboratoire, et à Marc qui m'a fourni ses protocoles d'isolation des protéines nucléaires et d'imagerie en flux.

Un grand merci à Gérard Pierron et Sylvie qui ont effectué toute la partie concernant la microscopie électronique et qui m'ont aidée à en interpréter les résultats.

Je remercie la plateforme de génomique, en particulier Audrey qui a préparé tous les échantillons de ChIP pour le séquençage et la plateforme d'imagerie et cytométrie, notamment Sophie, qui m'a formée à l'utilisation de l'imagerie confocale.

Je remercie la fondation ARC qui a financé ma dernière année de thèse et sans qui je n'aurais pu achever ce travail.

Enfin, j'aimerais remercier tous les membres de mon équipe, Dorothée, Stéphanie, Océane, Chloé, Nolwenn, Franck, Séverine, Jeffie, Christophe, Matthieu, Allan, Jean-Luc, Catherine, Lucie, Marie-Astrid, les deux Camille, Elisabeth, Raphaël, Roberta, Aurélie et aussi Fabrizia qui m'ont tous directement ou indirectement aidée à mener à bien ce travail, par leur conseils et leur soutien ainsi que tous les membres de l'unité 1009 puis 1170 qui m'ont accueillie au sein de l'unité et qui ont toujours accepté de me procurer leur aide et leurs conseils. Un dernier remerciement pour Paule et Rahma, nos deux secrétaires, qui ont effectué un travail remarquable pour mener à bien toutes les commandes du laboratoire.

Liste des abbréviations, sigles et acronymes

5-hmC: 5-hydroxyméthylcytosine Ac : anticorps ADAM : a disintegrin and metalloproteinase AF : alexa fluor AGM : aorto-gonado-mésonéphrotique AML-1 : acute myeloid leukemia 1 APH-1 : anterior pharynx-defective 1 ARF : ADP rybosylation factor ARNm : acide ribonucléique messager ASXL1 : additional sex combs-like 1 ATM : ataxia-telangiectasia mutated ATP : adénosine tri-phosphate B2M : béta 2 microglobuline BCL : B cell lymphoma BFU-E : burst forming unit erythroblast BSA : bovine serum albumin C/EBP : CCAAT/enhancer-binding protein C3AR1 : complement component 3a receptor 1 CBL : casitas B lineage lymphoma **CBP** : CREB binding protein CD : cluster de différenciation cDC : cellule dendritique conventionnelle cdc42 : cell division cycle 42 CDP : common dendritic cell progenitor C-FMS : McDonough feline sarcoma ChIP: chromatin-immunoprecipitation CMH-II : complexe majeur d'histocompatibilité de type II CMKLR1 : chemokine-like receptor 1 CMML : chronic myelomonocytic leukemia CMP : common myeloid progenitor COPI : coatomer protein I CRM1 : chromosome region maintenance 1 CSF : colony-stimulating factor CSF-1R : colony-stimulating factor 1 receptor CSH : cellule souche hématopoïétique CTLA4 : cytotoxic T lymphocyte-associated 4 DC : dendritic cell DLL1 : Notch ligand delta-like 1 DNA-PK : DNA protein kinase DNMT : DNA methyl transferase DOCK2 : dedicator of cytokinesis DTT : dithiothréitol EDTA : éthylène diamine tétra-acétique EGF-R : epidermal growth factor receptor EGR : early growth response

EGTA : ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid EMP : erythrocyte-megacaryocyte progenitor EMSA : electrophoretic mobility shift assay Eph : ephrine receptor ER : estrogen receptor ERAD : ER-associated degradation ERBB : erythroblastic leukemia ERK : extracellular regulated kinase Ets : erythroblastosis EZH : enhancer of zest homolog F2RL1 : coagulation factor II receptor-like 1 FADD : Fas-associated death domain FBS : fetal bovine serum FGF-R : fibroblast growth factor receptor FGR : Gardner-Rasheed feline sarcoma FIRE : FMS intronic regulatory element FLIP : FLICE-inhibitory protein FLK2 : fetal liver kinase-2 FLT3 : fms-like tyrosine kinase III receptor FMIP : fms interacting protein FOS : FBI murine osteosarcoma FOXO : forkhead box GABA : gamma-aminobutyric acid GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase GASP : γ-secretase activating protein GFP : green fluorescent protein GGA : golgi-associated gamma adaptin GIST : gastro-intestinal tumor GM-CSF : granulocyte-macrophage colonystimulating factor GMP : granulocyte-macrophage progenitor GO : gene ontology GR : glucocorticoid receptor GRB2 : growth factor receptor-bound protein 2 GTP : guanosine tri-phosphate HAT : histone acétyl-transférase HDAC : histone désacétylase HDLS : Hereditary diffuse leukoencephalopathy with axonal spheroids HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique HIF : hypoxia inducible factor HLA : human leucocyte antigen HMT : histone méthyl-transférase HPRT : hypoxanthine guanine phosphorybosyltransferase

HRP : horse radish peroxidase HSP : heat shock protein ICD : intracellular domain ID1 : inhibitor of DNA binding IDH : isocitrate déshydrogenase IFN : interféron Ig : immunoglobuline IGF-1R : insuline-like growth factor 1 receptor IKKE : I-kappa-B kinase epsilon IL : interleukine **INFS** : integrative nuclear FGF-R1 signaling iNOS : inducible nitric oxyde synthase InsR : insuline receptor **INTERNET** : integral trafficking from the endoplasmic reticulum to the nuclear envelope transport IRAK-1: interleukin 1 receptor-associated kinase 1 IRF : interferon regulatory factor IRS-1 : insuline receptor substrate 1 JAK2 : janus kinase 2 JUN : ju-nana KID : kinase insert domain KLF : krüppel-like factor KO : knock out LAM : leucémie aigüe myéloïde LFA1 : lymphocyte function-associated antigen 1 LIF : leukemia inhibitory factor LMMC : leucémie myélomonocytaire chronique LPS: lipopolysaccharide M6P-R : récepteur au mannose-6-phosphate MAD2 : mitotic arrest-deficient 2 MAF : musculoaponeurotic fibrosarcoma MAPK : mitogen-activated protein kinase MCL-1: myeloid cell leukemia 1 M-CSFR : marophage colony-stimulating factor receptor MDP : monocyte and dendritic cell progenitor MEK : MAPK/ERK kinase MIP1 α : macrophage inflammatory protein 1 alpha miRNA: micro-RNA MMP : matrix metalloproteinase MMR : mismatch repair MONA : multicentric osteolysis, nodulosis and arthropathy MPP : multipotent progenitor MRC2 : mannose receptor C-type 2 MRIN : membrane receptor in the nucleus MSR1 : macrophage scavenger receptor 1

MUC1 : mucin 1 MYB : myeloblastosis MYC : myelocytomatosis NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate NES : nuclear export signal NF1 : neurofibromatosis type I NF-κB : nuclear factor kappa B NHEJ: non-homologous end joining NK : natural killer NLS : nuclear localization signal Ns : non significatif NO : monoxyde d'azote NOD : nucleotide-binding oligomerization domain NP-40 : nonyl phenoxypolyethoxylethanol NPM1 : nucleophosmin 1 Nup : nuclear pore Nur77 : nuclear receptor 77 Op : osteopetrotic PAMP : pathogen-associated molecular pattern Pax : paired box PBMC : peripheral blood mononuclear cell PBS : phosphate buffer saline PCNA : proliferating cell nuclear antigen pDC : cellule dendritique plasmacytoïde PDGF-R : platelet-derived growth factor receptor PDL : programmed cell death ligand PEN-2 : presenilin enhancer 2 PFA : paraformaldéhyde PHF6 : PHD finger protein Phox : phagocyte oxidase PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase PKC : protéine kinase C PMSF : fluorure de phénylméthylsulfonyle PPAR : peroxisome proliferator-activated receptor PRC2 : polycomb repressive complex 2 PTK7 : protein tyrosine kinase 7 PTP-ζ : receptor-type protein-tyrosine phosphatase zeta PTPN11 : protein-tyrosine phosphatase nonreceptor-type 11 qPCR : quantitative polymerase chain reaction Rab : Ras-associated protein RAC1 : ras-related C3 botulinum toxin substrate RANKL : receptor activator of NF-kB ligand RAS : rat sarcoma RBM6 : RNA-binding motif protein 6

RCPG : récepteur couplé aux protéines G RE : réticulum endoplasmique RHO : ras homolog RIP1 : serine/threonine kinase receptorinteracting protein 1 ROR1 : receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1 **ROS** : reactive oxygen species RPL32 : ribosomal protein L32 RSK : ribosomal protein S6 kinase **RT** : room temperature RTK : récepteur à activité tyrosine kinase RYK : receptor-like tyrosine kinase SCF : stem cell factor SDF-1 : stroma cell-derived factor SDS : dodécylsulfate de sodium SEM : standard error of the mean SETBP1 : Set-binding protein 1 SF3B1 : splicing factor 3B subunit 1 SFK : SRC family kinase SHIP2 : SH2 containing inositol phosphatase SIRP α : signal regulatory protein alpha slan : 6-sulfo LacNAc SMAD : SMA- and MAD-related protein SMD : syndrome myélodysplasique SNARE : soluble N-éthylmaleimide-sensitivefactor attachment protein receptor SOCS : suppressor of cytokine signaling SOS1 : son of sevenless 1 Sp1 : specificity protein 1 SRC : sarcoma SRE : serum response element SRF : serum response factor SRSF2 : splicing factor serine/arginine-rich 2 STAT : signal transducer and activator of transcription

SUMO : small ubiquitin modifier TAM : tumor associated macrophage TET2 : ten eleven translocation 2 TGF- β : transforming growth factor beta TIMP : tissue inhibitor of MMP TIP47 : MPR tail-interacting protein 47 TKI : tyrosine kinase inhibitor TLR : toll-like receptor TNF- α : tumor necrosis factor alpha TPA: 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acétate TPO : thrombopoïétine TRAF : TNF receptor-associated factor TRAP : tartrate-resistant acid phosphatase Treg : lymphocyte T régulateur TREM2 : trigerring receptor expressed on myeloid cells 2 TRKA : tyrosine kinase receptor A TSS : transcription starting site TTS : transcription termination site TYK2 : tyrosine kinase 2 U2AF1 : U2 small nuclear RNA auxiliary factor uPA : urokinase plasminogen activator VDR : vitamin D receptor VEGF-R : vascular endothelial growth factor receptor VIH : virus de l'immunodéfiscience humaine VIP : vaso-active intestinal peptide WASP : Wiskott-Aldrich syndrome protein WHO : world health organization XIAP : X-linked inhibitor of apoptosis Yes : Yamaguchi sarcoma YY1 : yin yang 1 ZRSR2 : zinc finger-, ccch domain-, and rnabinding motif-containing serine/arginine-rich protein 2

Sommaire

1 Introdu	ction	7
1.1 Les	récepteurs à activité tyrosine kinase nucléaires	7
1.1.1	Mécanismes de clivage des RTKs pour leur adressage au noyau	9
1.1.2	Mécanismes de transport nucléaire des RTKs sous forme entière	9
1.1.3	Fonctions des RTKs nucléaires	12
1.1.4	RTKs nucléaires et cancer	13
1.1.5	Localisation nucléaire de la famille des récepteurs du PDGF	14
1.1.6	Localisation nucléaire des récepteurs couplés aux protéines G	16
1.2 Le 1	écepteur du colony-stimulating factor 1 (CSF-1R)	17
1.2.1	La protéine CSF-1R	17
1.2.2	Expression tissulaire de CSF-1R	18
1.2.3	Structure et régulation du gène CFMS	19
1.2.4	Fonctions de CSF-1R	20
1.2.5	Ligands de CSF-1R	22
1.2.6	Signalisation de CSF-1R	24
1.2.7	Recyclage et dégradation de CSF-1R	27
1.2.8	Rôle de CSF-1R en conditions pathologiques	28
1.3 Les	monocytes et les macrophages	30
1.3.1	L'hématopoïèse	30
1.3.2	La monocytopoïèse	32
1.3.3	Les monocytes	33
1.3.4	Les sous-populations monocytaires	34
1.3.5	La leucémie myélomonocytaire chronique	39
1.3.6	Différenciation des monocytes	.41
1.3.7	La polarisation des macrophages	.44
1.3.8	Différenciation et polarisation des macrophages in vitro	.44
1.3.9	Origine des macrophages tissulaires et contribution des monocytes.	.50
1.3.10	Polarisation pathologique des macrophages	. 51
2 Résultat	ts	. 60
2.1 Art	icle : Dynamic gene regulation by nuclear CSF-1R in human monocy	ytes
and macropha	iges	. 60
2.2 Sup	plementary materials and methods	98
2.2.1	Antibodies and reagents	. 98
2.2.2	Cell lines	. 98
2.2.3	Monocyte subset isolation	. 98
2.2.4	CD34 ⁺ cells isolation	.98
2.2.5	Live cell imaging	98
2.2.6	Total Protein extraction	
2.2.7	siRNA sequences	
2.2.8	CSF-1R construct and mutagenesis	
2.3 Unp	oublished results	100
2.3.1	Live cell imaging of CSF-1 shows its nuclear translocation	100
2.3.2	No effect of CSF-1R chemical inhibitors on CSF-1R gene regulation	100
2.3.3	Localisation of CSF-1R peaks on chromatin of monocytes and CSI	-1-
differentiate	ed macrophages	101
2.3.4	Effect of CSF-2 on CSF-1R nuclear localization in human macropha	iges
	104	

2.3.5	Regulation of CSF-1R nuclear localization	115		
2.3.6	CSF-1R is in the nucleus of all human monocyte subsets an	d myeloid		
progenitors	s 117			
3 Discuss	ion et perspectives			
3.1 Le	transport nucléaire de CSF-1R			
3.1.1	Séquences NLS et transport nucléaire de CSF-1R			
3.1.2	Séquences NES/NLS et localisation nucléaire de CSF-1R			
3.1.3	Sous quelle forme CSF-1R est-il présent au niveau nucléaire ?.			
3.1.4	Quelle voie de transport nucléaire peut emprunter CSF-1R?			
3.1.5	L'IL-34 et le transport nucléaire de CSF-1R	125		
3.1.6	Comment CSF-2 participe t'il au transport nucléaire de CSF-11	R?125		
3.2 For	nctions nucléaires de CSF-1R	126		
3.2.1	CSF-1R sur la chromatine			
3.2.2	CSF-1R et les marques d'histone	126		
3.2.3	CSF-1R et facteurs de transcription	127		
3.2.4	CSF-1 modifie les patterns de gènes sur lesquels CSF-1R inter-	agit130		
3.2.5	Gènes cibles de CSF-1R	130		
3.2.6	Rôle des autres cytokines	132		
3.2.7	CSF-1R nucléaire et différenciation des ostéoclastes ?	132		
3.3 Rôle de CSF-1R nucléaire dans les autres cellules hématopoïétiques133				
3.3.1	CSF-1R nucléaire peut-il être impliqué dans la différenci	ation des		
progéniteu	rs myéloïdes ?	133		
3.3.2	CSF-1R nucléaire peut-il être impliqué dans la génération	des sous-		
population	s monocytaires ?	133		
3.4 Rô	le de CSF-1R nucléaire en conditions pathologiques	134		
3.4.1	LMMC	134		
3.4.2	Macrophages infiltrant les tumeurs	135		
3.5 с-К	IT peut-il être localisé dans le noyau ?	136		
4 Bibliographie				

1 Introduction

Les monocytes sont des cellules myéloïdes circulantes qui jouent un rôle important dans la réponse immunitaire, en particulier dans la réponse innée, et la défense contre les pathogènes. Après quelques heures à quelques jours, ils quittent la circulation et s'infiltrent dans les tissus dans lesquels ils se différencient, principalement en macrophages et en cellules dendritiques, en fonction de la nature des cytokines présentes dans le tissu infiltré. L'une des plus importantes cytokines est CSF-1 (colonystimulating factor 1) qui se lie à son récepteur, CSF-1R, à la surface des monocytes. Ex vivo, ce signal induit la différenciation des monocytes en macrophages. CSF-1R a aussi été détecté dans le noyau de plusieurs types cellulaires, dont une lignée de cancer du sein et des macrophages murins. Lorsque j'ai commencé mon travail de thèse, cependant, cette localisation nucléaire n'avait jamais été explorée dans les monocytes et les macrophages humains. Les fonctions de CSF-1R dans le noyau étaient supposées peu importantes au regard de ses fonctions à la membrane. Le travail qui m'a été confié était de déterminer si CSF-1R était présent dans le noyau des monocytes et macrophages humains, ce qui fut fait, puis d'explorer la signification biologique de cette localisation, ce que je vous présenterai dans ce document. La thèse que je défends à l'issue de ce travail est que CSF-1R est impliqué dans la différenciation des monocytes et des macrophages, non seulement en tant que molécule initiatrice d'une signalisation intracellulaire protéiforme, mais aussi en tant que co-régulateur transcriptionnel.

1.1 Les récepteurs à activité tyrosine kinase nucléaires

Les tyrosines kinases sont des enzymes catalysant l'ajout d'un phosphate sur un résidu tyrosine à partir d'ATP. Ces protéines sont impliquées dans la transduction de signaux intracellulaires qui régulent la migration, la survie et la prolifération des cellules.

Les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) constituent la majorité des protéines à activité tyrosine kinase avec cinquante-huit membres identifiés, classés en vingt sous-familles. Ils possèdent généralement un domaine extracellulaire de liaison du ligand, une portion transmembranaire, un domaine régulateur juxtamembranaire, un domaine portant l'activité kinase et une région C-terminale. Ils sont impliqués dans la reconnaissance et la liaison de cytokines, d'hormones ou de facteurs de croissance avec une grande affinité.

L'interaction ligand-récepteur à la membrane plasmique aboutit à la formation d'homo ou d'hétéro-oligomères, ce qui induit l'activité kinase. S'en suit l'autophosphorylation de la partie cytoplasmique du récepteur, conduisant au recrutement des protéines adaptatrices et de la signalisation. Ces interacteurs sont à leur tour phosphorylés en cascade, activant différentes voies de signalisation qui régulent notamment l'expression des gènes. Les RTKs sont exprimés dans tous les tissus et contrôlent de nombreux processus cellulaires¹.

Ces récepteurs transmembranaires sont synthétisés au niveau du réticulum endoplasmique et adressés à la membrane cellulaire via la voie de sécrétion des protéines. Après avoir lié leur ligand et déclenché la signalisation, ils sont endocytés puis orientés vers le compartiment endosomal pour être dégradés au niveau des lysosomes ou recyclés à la membrane.

Il existe cependant d'autres mécanismes de régulation des RTKs, et notamment de leur localisation. Une localisation nucléaire de certains de ces récepteurs a notamment été décrite. On parle alors de MRIN (membrane receptor in the nucleus). Une telle localisation était connue pour les récepteurs de la famille Notch qui, après activation par leurs ligands, subissent un clivage de leur portion intracellulaire, générant un fragment ICD (intracellular domain). Ce fragment est transporté jusqu'au noyau où il régule l'expression des gènes². Des RTKs ont ensuite été identifiés dans le noyau. Ils peuvent être clivés, évoquant une régulation similaire aux récepteurs de la famille Notch, ou sous forme entière. Aujourd'hui, dans la plupart des familles de RTKs, au moins un membre a été identifié dans le noyau cellulaire, sous forme de fragment ou encore de protéine entière ou holorécepteur³ (tableau 1).

Tableau 1				
Localisation nucléaire des RTKs				
RTK	Forme			
EGF-R	Holorécepteur/Fragment (épissage alternatif)			
ERBB2	Holorécepteur/Fragment C-terminal (initiation de la traduction)			
ERBB3	Holorécepteur/Fragment ICD (épissage alternatif)			
ERBB4	Fragment ICD (clivage)			
IGF-1R	Holorécepteur			
InsR	-			
PDGF-Rα	Holorécepteur			
CSF-1R	Holorécepteur/ICD (clivage)			
VEGF-R1	Holorécepteur/ICD (clivage)			
VEGF-R2	Holorécepteur			
FGF-R1	Holorécepteur			
FGF-R2	Holorécepteur			
MET	Holorécepteur/ICD (clivage)			
RON	Holorécepteur			
TRKA	ICD			
EphB2	-			
EphA4	-			
MER	Holorécepteur			
ROR1	ICD			
PTK7	ICD (clivage)			
RYK	ICD (clivage)			

La localisation nucléaire d'un RTK peut être constitutive⁴ ou induite⁵. Elle est observée dans des cellules saines et dans des cellules tumorales⁶. Le développement de stratégies thérapeutiques ciblant ces récepteurs, en particulier dans le contexte du cancer, a stimulé l'étude des mécanismes impliqués dans leur translocation nucléaire ainsi que leurs fonctions, notamment dans les cellules cancéreuses.

1.1.1 Mécanismes de clivage des RTKs pour leur adressage au noyau

La plupart des RTKs sont acheminés vers le noyau sous forme de fragment de clivage. Ce clivage protéolytique survient majoritairement après leur activation par un ligand. Typiquement, leur portion extracellulaire est clivée par des protéases transmembranaires de type ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) comme ADAM17 et ADAM10 ou des MMPs (matrix metalloproteinase)^{3,7}. La partie intracellulaire du récepteur est ensuite clivée par la γ -sécrétase, un complexe de 5 protéines transmembranaires : GASP (γ -secretase activating protein)⁸, APH-1 (anterior pharynx-defective 1), PEN-2 (presenilin enhancer 2), la presenilin-1 qui porte l'activité protéolytique et la nicastrine qui reconnaît et lie les protéines transmembranaires dotées d'un ectodomaine réduit (50 résidus ou moins)⁹.

Les RTKs soumis à cette régulation doivent subir un clivage de leur domaine extracellulaire avant celui de leur domaine intracellulaire par la γ -sécrétase. Les fragments ICD générés sont ensuite acheminés vers le noyau via les pores nucléaires^{10,11} en interagissant avec les importines grâce à une séquence NLS (nuclear localization signal).

Il existe également d'autres mécanismes. L'épissage alternatif du pré-ARNm codant un récepteur peut générer un fragment soluble susceptible de migrer dans le noyau. C'est le cas de l'épissage alternatif du récepteur de l'EGF (epidermal growth factor) qui génère une protéine dépourvue de domaine extracellulaire et de domaine kinase, présente dans le noyau de certaines lignées tumorales¹². Un mécanisme similaire a été observé pour ERBB2 (erythroblastic leukemia)¹³ et FGF-R3 (fibroblast growth factor receptor)¹⁴.

1.1.2 Mécanismes de transport nucléaire des RTKs sous forme entière

Si la plupart des RTKs subissent un clivage protéolytique afin d'être acheminés vers le noyau, certains sont présents sous forme de protéine entière au niveau du nucléoplasme^{4,6}. Leur translocation s'effectue en général à partir de la membrane plasmique, après activation par le ligand et phosphorylation du récepteur¹⁵. Certains stimuli comme les rayonnements ionisants, les traitements chimiothérapeutiques¹⁶, les anticorps mono-clonaux¹⁷, certaines protéines virales¹⁸, et l'activation d'un autre récepteur ou d'une voie de signalisation induisent cette relocalisation nucléaire. Par exemple, l'activation du récepteur de la progestérone induit la translocation nucléaire de ERBB2¹⁹ et les protéines de la famille SRC (SFK) sont impliquées dans le transport nucléaire d'EGF-R dans certaines cellules de cancer du sein²⁰.

Deux grandes voies de transport sont impliquées dans la translocation des RTKs sous forme entière vers le noyau. La première, appelée INTERNET (integral trafficking from the endoplasmic reticulum to the nuclear envelope transport) est la plus répandue. Elle concerne les membres de la famille EGF-R par exemple^{21,22}. La seconde, appelée INFS (integrative nuclear FGF-R1 signaling), concerne la translocation nucléaire de FGF-R1²³ (figure 1).



Figure 1 : Voies de transport des RTKs nucléaires

Dans les deux cas, il s'agit d'un transport rétrograde de la membrane plasmique vers l'appareil de Golgi puis le réticulum endoplasmique (RE) d'où les protéines sont acheminées vers le noyau. Ce transport rétrograde avait déjà été décrit pour le récepteur au mannose-6-phosphate (M6P-R) et la shigatoxine.

M6P-R est impliqué dans le transport des protéines lysosomales et nécessite d'être constamment réacheminé du compartiment endosomal vers le trans-Golgi. Les récepteurs sont triés au niveau des endosomes tardifs grâce à TIP47 (MPR tail-interacting protein) et Rab9 (Ras-associated protein) qui orientent la fusion des vésicules au niveau des domaines Rab6 du trans-Golgi ²⁴.

La shigatoxine est une toxine bactérienne produite par *Shigella dysenteria* (responsable de la dysenterie). La protéine entre dans les cellules par endocytose, est acheminée vers le RE puis dans le cytosol où elle exerce ses effets toxiques en inhibant la synthèse protéique²⁵. Elle emprunte une voie de transport rétrograde qui lui est spécifique. Après endocytose, elle est dirigée du compartiment endosomal précoce vers le trans-Golgi grâce à la clathrine, à cdc42 (cell division cycle), et aux protéines du rétromère. L'attachement et la fusion avec l'appareil de Golgi nécessitent l'ancrage des complexes SNARE (soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor) sur les domaines Rab6 ²⁶.

Si le transport de la shigatoxine entre Golgi et RE peut être indépendant de COP-I (coatomer protein), lui permettant d'être acheminée vers le RE tout en étant dépourvue de séquence KDEL²⁷, le principal mécanisme de rétrotransport entre l'appareil de Golgi et le RE est dépendant de COP-I. Celui-ci nécessite la reconnaissance d'une séquence KDEL ou KKXX sur la protéine cible. Ce phénomène concerne les protéines qui doivent être maintenues dans le RE. Il implique des protéines de la famille ARF (ADP rybosylation factor) et des facteurs d'échange du GTP pour l'ancrage aux membranes²⁴. Les RTKs sont transportés vers le RE de façon COP-I dépendante²⁸.

Les RTKs empruntant la voie INTERNET sont d'abord endocytés, de façon clathrine-dépendante⁶ ou indépendante²⁹. Cette endocytose peut aussi impliquer la caveoline^{5,30}. ERBB3 est endocyté au niveau des macropinosomes³¹.

Les RTKs sont ensuite orientés vers l'endosome précoce puis vers les autres compartiments de l'endosome et le trans-Golgi grâce aux protéines Rab et GGA (Golgiassociated gamma adaptin). Ce transport implique des protéines du rétromère et la syntaxine 6³. Les RTKs transportés vers le RE de façon COP-I dépendante atteignent l'enveloppe nucléaire externe, en continuité avec la membrane du RE.

Ils interagissent alors avec l'importine $\beta^{19,21,29}$ et des composants des pores nucléaires comme Nup358³², ce qui permet de migrer vers l'enveloppe nucléaire interne. L'interaction des RTKs avec l'importine β nécessite une séquence NLS. Des séquences NLS tri-partites (3 clusters de résidus basiques situés dans le domaine juxtamembranaire) ont été identifiées chez les membres de la famille EGF-R³³. L'interaction des récepteurs dépourvus de séquence NLS avec l'importine β pourrait se faire par un interacteur possédant une telle séquence, comme IRS-1 (insuline receptor substrate) pour le récepteur de l'insuline³⁴.

Il existe un mécanisme de transport nucléaire indépendant de l'importine β . Par exemple, le transport nucléaire d'IGF-1R (insuline-like growth factor receptor) passe par sa SUMOylation³⁵. EGF-R peut aussi être SUMOylé mais cette modification post-traductionnelle régule son activité plutôt que sa localisation³⁶.

Après avoir atteint l'enveloppe nucléaire interne, SEC61B libére le récepteur dans le nucléoplasme^{22,37}. SEC61B est une protéine du complexe ERAD (ER-associated degradation). Elle est impliquée dans la rétrotranslocation des protéines transmembranaires mal conformées du RE vers le cytosol pour permettre leur dégradation³⁸. Au niveau de l'enveloppe nucléaire interne, elle exerce des fonctions similaires pour l'extraction des RTKs de la membrane²¹. A l'heure actuelle, nous ignorons sous quelle forme sont ces récepteurs entiers au niveau du nucléoplasme : leur portion transmembranaire hydrophobe étant conservée, les RTKs doivent être enchassés dans une microvésicule ou pris en charge par des protéines chaperonnes pour masquer cette région hydrophobe.

Dans la voie INFS, FGF-R1 est transporté de manière rétrograde de la membrane plasmique vers le RE puis dans le cytoplasme grâce à SEC61B. Le récepteur interagit avec l'importine β via son ligand FGF-2 (qui possède un NLS)³⁹, ce qui permet son transport vers le noyau en passant par les pores nucléaires²³. Une translocation nucléaire de FGF-R1 après sa traduction depuis l'appareil de Golgi sans passage par la membrane plasmique a aussi été décrite⁴⁰.

Enfin, un transport nucléaire impliquant les exosomes a été mis en évidence pour EGF-R, de façon indépendante du NLS⁴¹.

D'une manière générale, seul un faible pourcentage des récepteurs totaux est orienté vers le transport rétrograde, la majorité d'entre eux étant dégradée ou recyclée après le déclenchement de la signalisation³. Malgré cette faible quantité, la participation des RTKs nucléaires à la signalisation est importante⁴².

Enfin, les mécanismes d'export nucléaire dépendant de CRM1 (chromosome region maintenance) auraient aussi un impact sur la quantité de RTKs dans le noyau²⁹.

1.1.3 Fonctions des RTKs nucléaires

1.1.3.1 Régulation de la transcription

La présence de RTKs dans le noyau a généré de nombreuses questions. On connaît bien le rôle de ces récepteurs à la membrane plasmique : ils transmettent les signaux extérieurs au noyau par l'intermédiaire des voies de signalisation. On connaît beaucoup moins le rôle de ces récepteurs dans le noyau : à la manière des récepteurs nucléaires qui se lient à l'ADN pour réguler la transcription, ils semblent interagir avec la chromatine pour réguler l'expression des gènes.

Plusieurs études ont mis en évidence un recrutement des RTKs sur l'ADN, par des techniques d'EMSA (electrophoretic mobility shift assay)¹⁸ ou de ChIP-PCR/qPCR (chromatin immunoprecipitation)^{43,44}. Ces techniques ne démontrent pas une interaction directe avec l'ADN, la nature transmembranaire des RTKs obligeant à utiliser, pour les expériences d'EMSA, des extraits nucléaires dans lesquels d'autres protéines pouvant assurer cette interaction sont présentes. Les RTKs ne possèdent pas de séquences putatives de liaison à l'ADN et interagissent donc probablement de façon indirecte avec celle-ci : on suppose qu'ils sont recrutés par d'autres protéines pouvant lier l'ADN comme des facteurs de transcription⁴⁵ ou une ARN hélicase (dans le cas d'EGF-R)⁴⁶.

De nombreuses interactions entre RTKs et facteurs de transcription ont été mises en évidence^{18,44,45,47}. Les RTKs impliqués jouent le rôle de co-activateurs de ces facteurs de transcription pour augmenter l'expression des gènes cibles. Ils participent au recrutement d'autres co-activateurs comme p300/CBP (CREB binding protein)⁴⁷, favorisant le remodelage de la chromatine.

Dans le noyau, EGF-R peut être associé à d'autres protéines membranaires comme MUC1 (mucin)⁴⁸ ou à des protéines de la signalisation comme ERK1/2 (extracellular regulated kinase) et MEK1/2 (MAPK/ERK kinase)⁴⁹ pour réguler la transcription.

1.1.3.2 Impact de l'interaction des RTKs nucléaires avec les facteurs de transcription

L'interaction des RTKs avec les facteurs de transcription leur permet d'agir comme co-activateurs par différents mécanismes.

- ERBB4 joue le rôle de chaperon de HIF1-α (hypoxia inducible factor) et le protège de la dégradation pour augmenter l'expression de ses gènes cibles⁵⁰.
- ERBB4 favorise également la translocation nucléaire de STAT5A (signal transducer and activator of transcription) avec lequel il interagit au niveau du promoteur de la β-caséine pour en augmenter l'activité⁴³.
- La fonction kinase des RTKs peut être impliquée:
 - FGF-R1 phosphoryle RSK1 (ribosomal protein S6 kinase) qui, à son tour, active CBP et la transcription de ses gènes cibles⁴⁰.
 - $\circ~$ Les RTKs peuvent aussi phosphoryler les histones : ERBB2 phosphoryle l'histone macroH2A1.2 pour augmenter sa propre transcription 51 .
 - 1.1.3.3 Autres fonctions des RTKs nucléaires

La plupart des études menées sur les RTKs nucléaires se sont intéressées à leurs fonctions de régulation de la transcription, notamment des gènes de prolifération comme *CCND1* (codant pour la cycline D1) dans les cellules cancéreuses. Ces récepteurs interviennent aussi dans la réparation et la synthèse d'ADN et des protéines.

Ceci a été particulièrement étudié pour EGF-R qui, dans le noyau, agit sur différentes voies de réparation de l'ADN en fonction des dommages et du contexte cellulaire. Il peut :

- phosphoryler et stabiliser PCNA (proliferating cell nuclear antigen), ce qui favorise à la fois la prolifération⁵² et une instabilité génétique via l'inhibition du système de réparation MMR (mismatch repair)⁵³.
- en cas de dommages à l'ADN, activer l'ADN protéine kinase (DNA-PK) pour réparer des cassures double brin par la voie NHEJ (non-homologous end joining)^{16,30}. Il phosphoryle également ATM (ataxia telangiectasia mutated) pour augmenter la réparation de ces cassures, induisant une radiorésistance⁵⁴.
- phosphoryler l'histone H4 pour faciliter le recrutement de methyl-transférases qui favorisent la synthèse et la réparation de l'ADN⁵⁵.

Quant à ERBB2, il interagit avec l'ARN polymérase I dans le nucléole pour augmenter la synthèse des ARN ribosomaux et la traduction des protéines⁵⁶.

1.1.4 RTKs nucléaires et cancer

A partir de la membrane des cellules, les RTKs, lorsqu'ils sont activés, par exemple du fait d'une mutation somatique, favorisent très souvent la prolifération, l'invasion, et la survie des cellules cancéreuses. Ces RTKs font partie des oncogènes les plus fréquemment ciblés par les stratégies thérapeutiques développées ces quinze dernières années. Le rôle de la fraction nucléaire de ces récepteurs en cancérologie et l'impact de son inhibition thérapeutique sont moins bien connus. Les effets des RTKs nucléaires sur la régulation de l'expression des gènes et la réparation de l'ADN suggèrent que leur inhibition dans le noyau a un impact sur le devenir de ces cellules.

L'expression nucléaire des RTKs a été corrélée à un mauvais pronostic (ERBB4 et ERBB2 dans les tumeurs mammaires ERBB2 positives^{57,58} ou EGF-R dans le mélanome nodulaire⁵⁹) ou à un bon pronostic (ERBB4 dans le cancer du sein traité par tamoxifène)⁶⁰. Leur impact sur la prolifération, l'invasivité et la résistance aux traitements via la régulation de gènes et la phosphorylation de protéines nucléaires est de mieux en mieux connu (tableau 2).

Tableau 2					
Fonctions des RTKs nucléaires dans les cancers					
RTK impliqué	Type de cancer	Fonctions			
EGF-R	Sein	Résistance au gefitinib			
EGF-R	Sein	Réparation ADN/résistance à la radiothérapie			
EGF-R	Sein	Production NO			
EGF-R	Sein	Prolifération			
EGF-R	Carcinomes (sein/épidermoïde)	Prolifération (synthèse ADN/réparation)			
EGF-R	Carcinomes (sein/épidermoïde)	Instabilité chromosomique			
EGF-R	Colorectal	Instabilité génétique			
EGF-R	Colorectal/Sein	Résistance au cetuximab			
EGF-R	Poumon	Prolifération/invasion			
EGF-R	Glioblastome/Fibrosarcome	Régulation des gènes de réponse au stress, diminution de l'apoptose			
ERBB2	Sein	Résistance au taxol			
ERBB2	Sein	Prolifération			
ERBB2/3	Sein	Prolifération/résistance au traztuzumab			
ERBB2	Carcinomes (sein/épidermoïde)	Synthèse protéique			
ERBB4	Sein	Résistance au trastuzumab			
FGF-R1	Pancréas	Invasion			
Met	Prostate	Résistance à l'hormonothérapie			

Le ciblage exclusif d'un RTK à la membrane pourrait favoriser sa localisation nucléaire et générer une résistance au traitement⁵⁷.

1.1.5 Localisation nucléaire de la famille des récepteurs du PDGF

La sous-famille du PDGF-R (platelet-derived growth factor) comporte 5 récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase : PDFG-R α , PDGF-R β , c-KIT, FLT3 (fms-like tyrosine kinase III receptor) et CSF-1R (colony-stimulating factor 1 receptor). Deux d'entre eux ont été détectés dans le noyau, PDGF-R α^{61} et CSF-1R. C'est d'abord une forme clivée de CSF1-R qui a été détectée dans le noyau des cellules. CSF-1R peut subir un clivage protéolytique de son domaine extracellulaire par ADAM17⁶², après stimulation par son ligand ou activation par un ester de phorbol (TPA, 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acétate)⁶³. Ce clivage génère un fragment d'environ 100kDa. La portion intracellulaire du récepteur est alors clivée par la γ -sécrétase, générant un deuxième fragment de 50kDa⁶⁴. Ce clivage intracellulaire a aussi été décrit après exposition des cellules à des agonistes des TLRs (toll-like receptor) via la voie ERK⁶⁵ et à diverses cytokines dont le CSF-2 (colony-stimulating factor 2 ou GM-CSF pour granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), l'interleukine 2 (IL-2)⁶⁵ et l'IL-4^{66,67}. Cette forme nucléaire correspondait au fragment ICD de CSF-1R, cependant il est relativement instable et rapidement ubiquitinylé afin d'être dégradé⁶³. Ces clivages semblent donc réguler l'expression de CSF-1R à la surface des cellules plutôt que sa localisation nucléaire⁶⁸.

CSF-1R a ensuite été détecté sous forme entière au niveau de l'enveloppe nucléaire de macrophages murins dérivés de la moelle⁶⁹ et dans le nucléoplasme de lignées de cancers humains (sein, col de l'utérus et ovaire) et de tumeurs primaires du sein⁷⁰. La translocation nucléaire de CSF-1R a été attribuée à son interaction à la membrane avec son ligand, CSF-1, qui est co-transféré avec lui dans le noyau, comme cela a été décrit pour FGF-2¹⁵ et EGF⁷¹. Les mécanismes de transport nucléaire de CSF-1R restent en fait mal connus. On peut supposer que le récepteur emprunte une des deux voies précédemment décrites pour les autres RTKs. Chez la souris, la translocation nucléaire de CSF-1R dépend de la Pi3k (phosphatidylinositol 3-kinase) et de Rab5a, deux protéines impliquées dans le transport endosomal.

CSF-1R ne possède pas de séquence NLS mais plusieurs de ses interacteurs pourraient médier son interaction avec l'importine β .

- CSF-1, qui possède un NLS putatif dans sa région C-terminale (résidus 521-524).
 Cependant, ce NLS est absent des isoformes sécrétées de la protéine⁷².
- FMIP (fms interacting protein), qui possède aussi un NLS, est phosphorylée par la protéine kinase C (PKC), ce qui facilite sa translocation du noyau vers le cytosol. Elle est aussi phosphorylée par CSF-1R à la membrane⁷³. Les propriétés de déplacement de cette protéine entre le cytosol et le noyau selon son état de phosphorylation sous le contrôle de CSF-1R en font un candidat intéressant comme chaperon pour transporter CSF-1R vers le noyau.

A l'instar des autres RTKs localisés dans le noyau, CSF-1R participe à la régulation de l'expression des gènes et à la phosphorylation de protéines nucléaires.

- Dans une lignée de cancer du sein, CSF-1R a été immunoprécipité sur le promoteur des gènes *CCND1*, *MYC* (myelocytomatosis), *JUN* et *CSF1*, les trois premiers ayant déjà été identifiés comme des gènes cibles d'autres RTKs nucléaires. CSF-1R semble capable d'augmenter la transcription de ces gènes⁷⁰.
- Dans les macrophages murins, CSF-1R phosphorylerait p27 et Akt dans le noyau. Cette phosphorylation dépend de l'isoforme p110δ de la Pi3k qui est aussi impliquée dans la localisation nucléaire de CSF-1R⁶⁹.

1.1.6 Localisation nucléaire des récepteurs couplés aux protéines G

D'autres récepteurs membranaires ont été identifiés dans le noyau, notamment des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Ces récepteurs possèdent 7 domaines transmembranaires et sont impliqués dans la réponse à de nombreux types de ligands (molécules olfactives, neurotransmetteurs, chimiokines...) via leur couplage avec des protéines G.

- CXCR4, dont le ligand est SDF-1 (stroma cell-derived factor), est impliqué dans la migration et le homing des cellules hématopoïétiques⁷⁴. Plusieurs études ont montré une localisation nucléaire de CXCR4 dans des cellules mésenchymateuses⁷⁵ et dans des cellules cancéreuses⁷⁶.
- F2RL1 (coagulation factor II receptor-like 1) est un RCPG impliqué dans la survie et les fonctions des neurones. Après stimulation, le récepteur est transloqué vers le noyau des cellules ganglionnaires de la rétine grâce à l'importine β et à la nexine 11. Il favorise alors le recrutement du facteur de transcription Sp1 (specificity protein) sur le gène VEGFA (vascular endothelial growth factor) pour promouvoir la vascularisation de la rétine⁷⁷.

<u>En résumé</u> :

- Une partie des récepteurs à activité tyrosine kinase est dans le noyau des cellules, sous forme clivée ou sous forme entière.

- La fraction nucléaire est toujours quantitativement beaucoup plus faible que la fraction membranaire.

- Les mécanismes de localisation de ces protéines au niveau du noyau sont hétérogènes et mal connus.

- Les RTKs nucléaires ont deux effets identifiés : la régulation de l'expression de gènes et la phosphorylation de protéines du noyau.

- CSF1-R fait partie des RTKs identifiés dans le noyau de certaines cellules mais ses fonctions restent mal connues, en particulier dans les monocytes et macrophages humains.

1.2 Le récepteur du colony-stimulating factor 1 (CSF-1R)

1.2.1 La protéine CSF-1R

CSF-1R (autrement appelé C-FMS (McDonough feline sarcoma), CD115 ou M-CSFR pour marophage colony-stimulating factor receptor) est un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase de classe III, appartenant à la sous-famille du PDGF-R. Il est constituté de 972 résidus pour une masse molaire théorique de 108kDa. Il comporte 5 domaines de la super-famille des immunoglobulines en extracellulaire, une courte portion transmembranaire, un domaine juxtamembranaire, un domaine kinase interrompu par un domaine d'insertion (KID) et un domaine C-terminal.

- La partie extracellulaire interagit avec les ligands, par exemple les domaines immunoglobuline 1 à 3 interagissent avec le ligand de CSF-1R, CSF-1^{78,79}. Cette région intervient aussi dans la dimérisation du récepteur via ses domaines immunoglobuline 4 et 5 (figure 2).
- Le domaine juxtamembranaire a un rôle auto-inhibiteur qui prévient l'activation du récepteur en l'absence de ligand⁸⁰.
- La partie intracellulaire comprend le domaine kinase avec un site de liaison à l'ATP en position 616 et un domaine C-terminal impliqué dans la régulation négative du signal après activation.

CSF-1R est un proto-oncogène, orthologue de l'oncogène rétroviral v-FMS, responsable de sarcomes chez les félins. La forme virale comporte deux mutations ponctuelles dans la région de dimérisation du récepteur et la délétion d'une partie de son domaine C-terminal. Ces mutations conduisent à l'activation constitutive de la protéine⁸¹, lui conférant une activité oncogénique⁸².

CSF-1R est une glycoprotéine intrinsèque de type I, sa région extracellulaire est fortement glycosylée. La protéine en cours de synthèse est adressée au RE via un peptide signal afin d'être enchassée dans la membrane où elle subit une N-glycosylation co-traductionnelle permettant l'ajout de groupements riches en mannose⁸³. Ce précurseur, abondant dans les cellules, a une taille de 130kDa. Des N-glycosylations supplémentaires ont lieu dans le trans-Golgi et dans les vésicules d'exocytose lors de son acheminement à la membrane plasmique, générant une forme mature de 150 à 170kDa selon les espèces⁸⁴. La synthèse et le transport de CSF-1R à la membrane nécessitent environ 30 minutes. La protéine a une demie-vie de 3 à 4h à la surface de la cellule en l'absence de ligand⁸⁵. A la membrane, CSF-1R est sous une forme prédimérisée, inactive. Le dimère est stabilisé par l'interaction avec un ligand^{86,87}.



Figure 2 : Structure de la protéine CSF-1R (Ig : domaine immunoglobuline, Gly : N-glycosylation, Juxt : domaine juxtamembranaire, KID : kinase insert domain, Cter : domaine C-terminal, a.a : position des acides aminés)

1.2.2 Expression tissulaire de CSF-1R

CSF-1R est exprimé constitutivement par de nombreux types cellulaires, à la fois d'origine hématopoïétique comme les monocytes/macrophages et non hématopoïétique comme les cellules épithéliales mammaires et les trophoblastes. Son expression peut aussi être induite en condition inflammatoire (tableau 3).

Tableau 3					
Expression tissulaire de la protéine CSF-1R					
Type cellulaire	Induction				
Progéniteurs hématopoïétiques multipotents	Basal				
Lignée monocyte/macrophage	Basal				
Ostéoclastes	Basal				
Cellules épithéliales de la glande mammaire	Différenciation lactogène				
Cellules de Paneth	Basal				
Cellules épithéliales du côlon	Basal				
Cellules épithéliales rénales	Basal				
Neurones	Basal				
Ovocyte/Trophoblaste	Basal				
Astrocytes/Neurones	Lésion				
Cellules musculaires lisses	Athérome				

1.2.3 Structure et régulation du gène CFMS

1.2.3.1 Structure du gène CFMS

CSF-1R est codé par le gène *CFMS* s'étendant sur 60kb en 5q33.3 chez l'homme, en 3' du gène *PDGFRB* avec lequel il partage une origine commune^{88,89}. Ce gène est composé de 22 exons et 21 introns, le premier exon étant non codant. Il possède deux promoteurs dépourvus de TATA box.

- Le premier, situé 20kb en amont de l'exon 1, est fonctionnel dans les trophoblastes et les cellules épithéliales mammaires durant la grossesse et la lactation. Son activité est régulée par les hormones stéroïdiennes.
- Le second, situé dans le premier intron (550pb en amont de l'exon 2), est fonctionnel dans les cellules hématopoïétiques et initie la transcription directement au niveau du deuxième exon.

Les deux promoteurs produisent des ARNm de tailles différentes mais comportant les mêmes régions codantes. L'expression du gène est aussi régulée par une région FIRE (FMS intronic regulatory element) de 330 pb située dans le deuxième intron. Cette région permet le recrutement de facteurs de transcription pour induire l'expression de CSF-1R mais fonctionne aussi comme un promoteur antisens générant un ARN non codant participant à la régulation du gène chez la souris⁹⁰.

Il existe une autre isoforme de CSF-1R produite par épissage alternatif, composée de 306 résidus, dépourvue des parties transmembranaire et intracellulaire, avec une séquence alternative entre les acides aminés 297 et 306⁹¹.

1.2.3.2 Régulation de l'expression de *CFMS* par les facteurs de transcription

Les facteurs de transcription qui régulent l'expression de CSF-1R sont notamment PU.1, Ets2 (erythroblastosis), EGR2 (early growth response)⁹², AML-1 (acute myeloid leukemia)⁹³, AP-1, les proteines de la famille C/EBP (CCAAT/enhancer-binding protein) et Sp1. Lors de la différenciation myéloïde, le promoteur de CSF-1R est activé en deux étapes. Les protéines PU.1, AML-1 et C/EBP se lient au promoteur pour favoriser le remodelage de la chromatine afin de rendre le gène accessible à d'autres facteurs de transcription sur la région FIRE comme EGR2. Le recrutement des protéines sur la région FIRE permet l'induction d'une forte expression du gène dans les cellules les plus différenciées⁹². Le premier promoteur de CSF-1R contient également un élément de réponse aux glucocorticoïdes permettant le recrutement de leur récepteur sur le gène⁹⁴ (figure 3).



Figure 3 : Région régulatrice du gène *CFMS* (GR : récepteur aux glucocorticoïdes, ER-α : récepteur aux oestrogènes, VDR : récepteur de la vitamine D, Ex : exon, P : promoteur, ARNnc : ARN non codant, Pax : paired box)

1.2.4 Fonctions de CSF-1R

1.2.4.1 Fonctions de CSF-1R au cours du développement

La délétion du gène csf1r chez la souris⁹⁵ induit un phénotype qui reproduit, en plus sévère, le phénotype des souris op/op qui ne produisent pas de CSF-1^{96,97}. Le phénotype des souris $csf1r^{-/-}$ est plus sévère du fait de l'existence d'un deuxième ligand de CSF-1R, l'IL-34, qui compense en partie la perte de CSF-1 chez les souris op/op⁹⁸.

Le phénotype des souris *csf1r-/-* comporte :

- une ostéopétrose due à la réduction du nombre d'ostéoclastes, partiellement compensée au cours du temps par VEGFA⁹⁹.
- une baisse des monocytes circulants accompagnée d'une augmentation des granulocytes.
- un défaut de production de nombreux macrophages tissulaires dont les cellules microgliales (macrophages spécialisés du système nerveux central) et les cellules de Langherans (macrophages de l'épiderme). Les souris ont une durée de vie réduite du fait d'anomalies de la réponse immunitaire. Certaines populations de macrophages sont moins affectées, probablement du fait d'une compensation par d'autres cytokines comme l'IL-3 ou le CSF-2 qui peuvent aussi corriger la diminution du nombre d'ostéoclastes et l'ostéopétrose^{100,101}. L'utilisation d'un anticorps bloquant CSF-1R aboutit également à la déplétion d'une partie des monocytes et de certains macrophages tissulaires, en particulier ceux recrutés par les tissus en situation inflammatoire¹⁰².
- une augmentation des BFU-E (burst forming unit erythroblast) dans la rate du fait du rôle inhibiteur de CSF-1R sur l'érythropoïèse et de la réduction de l'hématopoïèse

médullaire liée aux malformations osseuses, favorisant l'hématopoïèse extramédullaire.

- une taille et un poids inférieurs à la normale, qui a suggéré une participation de CSF-1R à la régulation de la croissance corporelle. En fait, les macrophages produisent de l'IGF-1 après stimulation par CSF-1⁷², mais cette production n'est pas nécessaire à la croissance¹⁰³ dont les anomalies sont probablement la conséquence des lésions osseuses.
- une baisse des capacités de reproduction, en lien avec les anomalies de développement de la glande mammaire et la baisse de production d'ovocytes chez les femelles, la diminution du taux de testostérone ainsi que la baisse du nombre de spermatozoïdes chez les mâles. En effet, CSF-1 et CSF-1R interviennent dans le développement de l'hypothalamus¹⁰⁴. CSF-1R participe aussi aux fonctions placentaires et à l'implantation de l'oeuf fécondé¹⁰⁵.
- des anomalies du système nerveux central, CSF-1R étant impliqué dans la différenciation de certaines populations de neurones et d'oligodendrocytes¹⁰⁴.
- des anomalies de différenciation des entérocytes et des cellules endocrines du côlon accompagnées d'une réduction de la prolifération et du nombre de progéniteurs. Les cellules de Paneth sont en nombre réduit au contraire des cellules caliciformes qui sont en excès¹⁰⁶.

1.2.4.2 Fonctions exercées par CSF-1R chez l'adulte

CSF-1R participe à la régulation de la différenciation des cellules hématopoïétiques en les orientant vers le lignage myéloïde puis monocytaire. Dès la cellule souche hématopoïétique, CSF-1 a un rôle instructif en induisant l'expression de *PU.1*¹⁰⁷. Il favorise la différenciation des progéniteurs myéloïdes vers la lignée monocytaire^{108,109}, réprime la différenciation érythroïde¹¹⁰, inhibe la différenciation des cellules dendritiques plasmacytoïdes¹¹¹ et bloque la différenciation terminale des monocytes en cellules dendritiques¹¹². CSF-1R est cependant nécessaire à la génération de certaines populations de cellules dendritiques *in vivo*¹¹³ et provoque la différenciation des monocytes en macrophages via l'activation limitée des caspases¹¹⁴.

CSF-1R est responsable de la diminution de CSF-1 circulant via la liaison de son ligand, l'endocytose et la dégradation des complexes ligand-récepteur, en particulier au niveau des cellules de Küpffer (macrophages hépatiques). De ce fait, les souris csf1r' ont 20 fois plus de CSF-1 circulant et l'absence de monocyte chez l'homme conduit à une augmentation de CSF-1 dans le plasma¹¹⁵. Cette élimination de CSF-1 par son récepteur forme une boucle de rétroaction négative permettant de réguler la prolifération des cellules de la lignée monocytaire qui dépendent de cette cytokine¹¹⁶.

CSF-1R joue un rôle dans la réponse immunitaire innée en activant les monocytes et les macrophages et en augmentant leurs capacités migratoires en réponse aux chimiokines^{117,118}. Le récepteur augmente la survie des monocytes¹¹⁹ et des macrophages ainsi que leur prolifération chez la souris¹¹⁶. CSF-1R stimule également la prolifération et la phagocytose des cellules microgliales¹²⁰.

1.2.5 Ligands de CSF-1R

Deux ligands de CSF-1R ont été identifiés : CSF-1⁸⁴ et l'IL-34⁹⁸. Bien que ces deux ligands induisent une activation relativement similaire du récepteur, leurs fonctions et les tissus où ils sont exprimés sont différents, si bien que, le plus souvent, leurs fonctions ne sont pas redondantes.

1.2.5.1 Les gènes codant CSF-1 et IL-34

CSF-1 est une sialoglycoprotéine homodimérique codée par un gène de 21kb situé en 1p13.3 et comportant 10 exons. La dimérisation covalente de CSF-1 (par des ponts disulfure) est nécessaire à son activité⁹⁷. La protéine existe sous trois isoformes produites par épissage alternatif et protéolyse. Toutes les isoformes possèdent au départ un domaine EGF-like de 149 résidus portant l'activité biologique, une région transmembranaire de 24 résidus et un domaine cytoplasmique de 35 acides aminés⁷². La première isoforme est une glycoprotéine transmembranaire pouvant interagir avec son récepteur de manière juxtacrine. Elle peut également être clivée par la protéase ADAM17 dans sa région juxtamembranaire ou en N-terminal. Le premier clivage permet de générer un protéoglycan sécrété contenant une chaîne de chondroïtine sulfate tandis que le second génère une glycoprotéine. L'épissage alternatif de l'exon 6 contrôle la présence des sites de clivage et de branchement du chondroïtine sulfate. Le protéoglycan constitue la plus grande partie du CSF-1 sécrété¹²¹.

L'IL-34 est une glycoprotéine homodimérique, les deux monomères de 242 résidus étant associés de façon non covalente⁹⁸. Elle est codée par un gène situé en 16q22.1 et présente deux isoformes qui diffèrent par un seul acide aminé en position 81. Elle ne présente pas d'homologie de séquence avec CSF-1 mais leurs structures tertiaires sont similaires¹²². Cette cytokine possède un second récepteur, PTP- ζ (receptor-type protein-tyrosine phosphatase) qui est un protéoglycan à chondroïtine sulfate exprimé à la surface des progéniteurs neuronaux, des cellules gliales et des cellules de glioblastome. La signalisation induite par IL-34 via PTP- ζ pourrait inhiber la prolifération et la migration de cellules tumorales¹²³.

1.2.5.2 Interactions ligand/récepteur

La liaison de CSF-1 à son récepteur nécessite les trois premiers domaines immunglobuline de CSF-1R. La fixation de l'IL-34 s'effectue globalement de la même façon mais implique d'autres résidus et un angle de fermeture entre les domaines 2 et 3 différent. La fixation de l'IL-34 est plus forte et plus stable que celle de CSF-1¹²⁴. L'IL-34 semble capable d'interagir avec d'autres molécules dont Syndecan-1, ce qui module l'activation de CSF-1R¹²⁵. Une interaction entre IL-34 et CSF-1 est possible *in vitro*¹²⁶. Toutefois, les patterns d'expression spatio-temporelle mutuellement exclusifs de ces deux cytokines suggèrent qu'elles ont peu de chance d'interagir *in vivo*.

1.2.5.3 Signalisation induite par CSF-1 et IL-34

IL-34 et CSF-1 agissent globalement de façon similaire sur CSF-1R. L'administration d'IL-34 compense l'absence de CSF-1 chez les souris op/op¹²⁷. Comme CSF-1, IL-34 favorise la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques en monocytes⁹⁸, induit la différenciation des monocytes en macrophages¹²⁸ ou, en présence de RANKL (receptor

activator of NF-κB ligand), en ostéoclastes¹²⁹, et stimule la survie des progéniteurs médullaires et des monocytes/macrophages murins et humains¹³⁰. Lorsqu'elles activent leur récepteur, ces deux cytokines présentent de légères différences dans leurs cinétiques. IL-34 induit une phosphorylation de CSF-1R et des protéines de signalisation situées en aval plus rapide et plus courte que CSF-1¹³⁰. Lors de la différenciation des monocytes en macrophages, les deux cytokines génèrent des profils d'expression très similaires (à 75%) mais IL-34 a un effet plus faible que CSF-1 sur 25% des gènes. Par exemple, CSF-1 réprime plus fortement CCR2 que l'IL-34¹³¹. Les deux protéines n'ont pas le même effet sur la migration des cellules myéloïdes chez la souris et sur la production de certaines chimiokines par les macrophages humains comme l'éotaxine-2, facteur attractant des éosinophiles, et CCL2, ligand de CCR2 et attractant des monocytes¹³⁰.

1.2.5.4 Expression tissulaire de CSF-1 et de l'IL-34

CSF-1 est détectable dans le sang en condition physiologique¹³² et est synthétisé de façon constitutive par de nombreux types cellulaires comme les fibroblastes, les ostéoblastes, les cellules endothéliales, les myoblastes, les cellules stromales médullaires et déciduales, l'endomètre, les cellules épthéliales thymiques, les kératinocytes, les cellules mésothéliales et les astrocytes. D'autres cellules peuvent produire cette cytokine en réponse à un stimulus ou en cas d'infection¹³³ comme les monocytes, les macrophages (notamment en réponse au CSF-2)¹³⁴, les polynucléaires neutrophiles en cas d'inflammation¹³⁵, les lymphocytes B et T et les chondrocytes¹³⁶. La production de CSF-1 augmente pendant la grossesse¹³⁷.

L'IL-34 est produite au niveau de la rate (endothélium sinusoïde et pulpe rouge), des cellules endothéliales du système nerveux central¹³⁸, des neurones et des kératinocytes¹³⁹. Son expression est globalement plus élevée que celle de CSF-1 dans la peau, la plupart des régions cérébrales et les glandes salivaires¹²⁷. Au cours du développement on observe des différences d'expression spatio-temporelle entre ces deux cytokines. IL-34 est exprimé plus tôt et en plus grande quantité au niveau cérébral (dans les méninges et les couches II à V du cortex cérébral tandis que CSF-1 n'est exprimé que dans la couche VI)¹⁰⁴. En revanche, l'IL-34 n'est pas exprimée dans le sac vitellin où sont générés les premiers macrophages, à la différence de CSF-1¹³⁵.

Bien que CSF-1 et IL-34 exercent un effet redondant sur l'activation de CSF-1R, leurs différences d'expression spatio-temporelle expliquent les disparités importantes observées entre les deux modèles de souris déficientes. Le KO naturel de CSF-1, op/op, est globalement similaire à celui du KO CSF-1R avec un phénotype moins sévère (persistance de cellules microgliales, et de cellules de Langherans). Les souris KO pour l'IL-34 ont un phénotype peu marqué (pas d'anomalie osseuse par exemple) avec une absence de la microglie et des cellules de Langherans. Cela aboutit à des anomalies de leur réponse immunitaire¹³⁹.

En dépit du rôle prépondérant de l'IL-34 dans le système nerveux, CSF-1 est aussi impliqué dans le développement de l'hypothalamus, la maintenance des circuits GABAergiques et la croissance des neurites¹⁰⁴ et participe à la maintenance des cellules microgliales (qui sont diminuées chez les souris op/op). CSF-1 et IL-34 diminuent l'excitotoxicité au sein des neurones afin de limiter la neurodégénérescence¹⁴⁰. En revanche, la présence de l'IL-34 au niveau des cellules endothéliales du système nerveux

central lui permet de réguler l'expression des protéines constituant les jonctions serrées afin de restaurer la barrière hémato-encéphalique en cas d'inflammation¹³⁸. Au niveau de la peau, les deux cytokines exercent un rôle complémentaire. L'IL-34 est présente de façon constitutive et est nécessaire à la différenciation des cellules de Langherans au cours du développement et à leur auto-renouvellement chez l'adulte. CSF-1 est produit par les polynucléaires neutrophiles recrutés en cas d'inflammation et est impliqué dans la régénération des cellules de Langherans à partir des monocytes sanguins dans une telle situation¹³⁵.

1.2.6 Signalisation de CSF-1R

L'interaction entre CSF-1R et son ligand stabilise l'homodimérisation non covalente du récepteur, entraînant son activation et la phosphorylation de 8 résidus tyrosine. Chez l'homme, les tyrosines 546 et 561 sont situées dans le domaine juxtamembranaire, la tyrosine 699 dans la première partie du domaine kinase, les tyrosines 708 et 723 dans le KID, Y809 dans la deuxième partie du domaine kinase et Y923 et 969 dans le domaine Cterminal. Les résidus phosphorylés par la forme murine de CSF-1R sont similaires.

La tyrosine 561 est phosphorylée en premier, ce qui permet de lever l'inhibition exercée par le domaine juxtamembranaire⁸⁰. Après la phosphorylation des résidus tyrosine, certains résidus sérine sont également phosphorylés (par exemple les sérines 713 et 716) bien que leurs fonctions soient encore indéterminées¹⁴¹⁻¹⁴³. Suite à l'autophosphorylation du récepteur, son homodimérisation devient covalente par la formation de ponts disulfure⁸⁶, constituant un dimère de 380kDa. Des dimères de 450kDa sont également observés¹⁴¹ (formés d'un récepteur de 165kDa associé à un autre de 215 à 250kDa ayant probablement subit des modifications post-traductionnelles supplémentaires). La dimérisation non covalente stabilisée par le ligand est suffisante pour permettre l'activation et la phosphorylation de CSF-1R. En revanche, la dimérisation covalente favorise l'inactivation, la déphosphorylation et l'internalisation du récepteur⁸⁶.

1.2.6.1 Phosphorylation de CSF-1R et activation des voies de signalisation

La phosphorylation des résidus tyrosine de CSF-1R permet le recrutement de protéines adaptatrices et de la signalisation.

- Les tyrosines 546 et 561 recrutent et activent des protéines de la famille Src [Src, Fyn et Yes (Yamaguchi sarcoma)]¹⁴⁴ pour induire la prolifération⁸⁰ et la différenciation des progéniteurs médullaires en macrophages¹⁴⁵. Des expériences de mutagénèse ont montré que ces deux résidus étaient nécessaires à l'activité kinase de CSF-1R et que Y561 était impliquée dans la dégradation du récepteur¹⁴⁵.
- Les protéines de la famille Src sont également activées par la tyrosine 809¹⁴⁶ qui est impliquée dans la phosphorylation de CSF-1R et envoie un signal de prolifération et de différenciation macrophagique via l'activation des protéines ERK¹⁴⁵.
- La tyrosine 699 intéragit avec les protéines GRB2 (growth factor receptor-bound protein), MONA (multicentric osteolysis, nodulosis and arthropathy) et SOS1 (son of

sevenless) afin d'activer RAS (rat sarcoma) puis RAF1, MEK, ERK et p38, favorisant la prolifération des cellules¹⁴⁷⁻¹⁵⁰.

- La tyrosine 923 active également la voie Ras.
- Via les tyrosines 708 et 809 et l'activation de TYK2 (tyrosine kinase), CSF-1R active différentes protéines de la famille des STATs (STAT1, STAT3, STAT5A et STAT5B)¹⁵¹⁻¹⁵³. La phosphorylation de Y708 induit la différenciation des macrophages et l'acquisition de leur morphologie caractéristique (tout comme les tyrosines 723 et 969) et dans une moindre mesure joue un rôle dans la phosphorylation de CSF-1R¹⁴⁵.
- La voie PI3K est aussi activée via son interaction avec la tyrosine 723¹⁵⁴ ce qui permet d'activer RAC1 (ras-related C3 botulinum toxin substrate). Cette voie conduit au recrutement de p47phox (phagocyte oxidase) à la membrane, ce qui active et stabilise le complexe NADPH oxidase (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) responsable de la production de ROS (reactive oxygen species)¹⁵⁵. Les ROS activent à leur tour p38 et AKT pour augmenter la survie et la prolifération des cellules^{156,157}. ERK est également activé par des ROS. La voie PI3K est responsable de la réorganisation des réseaux d'actine via l'activation de cdc42 et de WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein) (qui nécessite également l'activation des protéines de la famille Src) conduisant à l'activation de RAC1, RAC2 et RHO (ras homolog)⁸⁹. La réorganisation du cytosquelette permet d'induire des modifications morphologiques et d'adhérence pour que les macrophages puissent répondre aux signaux chimiotactiques. La tyrosine 723 régule d'autre part l'activation de NF-κB (nuclear factor kappa B)¹⁵⁸.



Figure 4 : Signalisation de CSF-1R

CSF-1R est donc capable d'activer les voies STAT, MAPK (mitogen-activated protein kinase) et PI3K/AKT dans les cellules myéloïdes en réponse à CSF-1 (figure 4). Dans les monocytes humains, les voies PI3K et ERK sont activées de façon cyclique grâce à des phosphorylations/déphosphorylations successives de CSF-1R sur la tyrosine 723¹⁵⁹. Cette signalisation permet la formation du complexe RIP1/FADD/Caspase 8/FLIP (serine/threonine kinase receptor-interacting protein 1/Fas-associated death domain/FLICE-inhibitory protein) conduisant au clivage de RIP1 par la caspase 8, à l'arrêt de la signalisation de NF-κB et à l'activation des caspases 3 et 9¹¹⁴. L'activation limitée des caspases permet le clivage d'un nombre réduit de substrats, différents de ceux reconnus lors de l'apoptose, comme NPM1 (nucleophosmin), ce qui limite les capacités de migration, de phagocytose et de production de cytokines proinflammatoires de ces macrophages¹⁶⁰. Cette activation particulière des caspases, en dehors de tout processus apoptotique, survient lors de la différenciation d'autres types cellulaires comme les érythrocytes^{161,162}.

1.2.6.2 Régulation de l'expression des gènes en aval de CSF-1R

La signalisation de CSF-1R dans les monocytes aboutit à leur différenciation en macrophages. Le déclenchement des différentes voies de signalisation régule *in fine* l'expression de gènes impliqués dans la différenciation et les fonctions macrophagiques via l'activation de différents facteurs de transcription comme Ets2 qui est activé par ERK.

CSF-1R augmente l'expression de marqueurs macrophagiques de surface impliqués dans la reconnaissance des pathogènes et les fonctions de phagocytose [CD14, CD16, CD59, TREM2 (trigerring receptor expressed on myeloid cells), MRC2 (mannose receptor C-type), MSR1 (macrophage scavenger receptor), C3AR1 (complement component 3a receptor)]. Il augmente aussi l'expression de gènes liés à la présentation de l'antigène (CMH-II, complexe majeur d'histocompatibilité) ou au remodelage tissulaire (MMP-1, 9 et 12, uPA pour urokinase plasminogen activator)¹⁶³.

On observe aussi une augmentation de l'expression de gènes codant pour des cytokines et chimiokines (CSF-1, TNF- α (tumor necrosis factor), IL-1 β , IL-10, LIF (leukemia inhibitory factor), MIP1 α (macrophage inflammatory protein) et CCL2), les molécules du complément (C1q, C2), des facteurs anti-apoptotiques (BCL-XL, B cell lymphoma) et de prolifération (*CCND1*)¹⁶⁴.

CSF-1R augmente sa propre expression via l'induction de *PU.1* et modifie l'expression de nombreux gènes liés au métabolisme des lipides. Enfin, CSF-1R diminue l'expression de certains récepteurs de chimiokines comme CCR2 et CX3CR1^{131,163}.

1.2.7 Recyclage et dégradation de CSF-1R

Après liaison à son ligand et déclenchement de la signalisation, CSF-1R est rapidement polyubiquitinylé, inactivé et déphosphorylé puis internalisé via des vésicules recouvertes de clathrine^{18,165} ou des macropinosomes¹⁶⁶, et dégradé au niveau du compartiment lysosomal¹⁶⁷. La phosphorylation de la tyrosine 969 permet son interaction avec CBL (casitas B lineage lymphoma), une E3 ubiquitine ligase, qui est à son tour activée (grâce à CSF-1R et aux membres de la famille Src)^{168,169}. CBL induit la polyubiquitinylation de CSF-1R qui est déphosphorylé par la phosphatase SHP-1 (activée par la voie RAS et recrutée à la membrane par LYN) qui inactive également d'autres protéines de la signalisation (PI3K, AKT, STAT3, STAT5)¹⁷⁰⁻¹⁷². SHIP2 (SH2 containing inositol phosphatase) participe à l'inactivation des voies de signalisation AKT et NF-κB¹⁷³. CSF-1R peut ensuite être recyclé et resynthétisé, sa signalisation induisant l'augmentation de l'expression du gène *CFMS*¹⁶⁷.

Comme pour la plupart des RTKs, il est admis que la signalisation de CSF-1R s'effectue à la membrane plasmique, son internalisation étant consécutive à son inactivation et permettant sa dégradation.

Cependant, CSF-1R peut induire une activation de ERK et d'AKT au niveau du compartiment endosomal, après avoir été internalisé, et cette activation est nécessaire à l'induction de l'expression des gènes¹⁶⁴. En outre, la forme immature de CSF-1R de

130kDa peut être phosphorylée après stimulation bien qu'elle ne soit normalement pas présente à la surface cellulaire¹⁶⁵.

1.2.8 Rôle de CSF-1R en conditions pathologiques

1.2.8.1 Mutations de CSF-1R dans la leucoencéphalopathie héréditaire diffuse à sphéroïdes

Il n'existe qu'une pathologie associée à une mutation germinale inactivatrice du gène *CFMS* : la leucoencéphalopathie héréditaire diffuse à sphéroïdes (HDLS)¹⁷⁴, qui est une maladie génétique à transmission autosomique dominante. Ses manifestations cliniques sont variables (modifications comportementales, spasticité, épilepsie, déclin cognitif...) et rendent le diagnostic difficile. Cette pathologie se caractérise par la présence de sphéroïdes dans la matière blanche avec une accumulation de cellules microgliales et gliales aboutissant à une dégradation de la myéline et une dégénérescence des axones. Plusieurs mutations inactivatrices de CSF-1R ont été identifiées chez les malades et sont localisées dans le domaine portant l'activité kinase (mutations faux sens, délétions conservant le cadre de lecture, mutations de sites d'épissage)^{175,176}. Les récepteurs mutés sont normalement exprimés à la membrane et peuvent lier CSF-1 mais sont incapables d'induire une réponse proliférative. Leur coexistence avec des récepteurs non mutés (la mutation étant à l'état hétérozygote) suggère un effet dominant négatif de la forme mutée qui bloquerait la dimérisation et l'autophosphorylation de la protéine normale. Le blocage de la signalisation de CSF-1R aboutit alors à des anomalies de la prolifération et de la différenciation des cellules microgliales au cours de l'embryogénèse.

1.2.8.2 Mutations et anomalies d'expression de CSF-1 et CSF-1R dans les cancers

Plusieurs anomalies génétiques impliquant les gènes codant CSF-1R et CSF-1 ont été identifiées dans des affections malignes

- Une translocation t(3;5)(p21;q33) conduisant à la fusion du domaine C-terminal de CSF-1R avec le domaine N-terminal de RBM6 (RNA-binding motif protein) a été mise en évidence dans une lignée dérivée d'une leucémie aigüe mégacaryoblastique. La protéine de fusion est constitutivement activée et conduit à la suractivation de STAT5¹⁷⁷.
- CSF-1R est délété dans les syndromes myélodysplasiques (SMD) présentant une délétion du bras long du chromosome 5 (5q⁻).
- Des mutations ponctuelles de CSF-1R ont été décrites dans des leucémies aigües myéloïdes (LAM), des syndromes myélodysplasiques et des carcinomes hépatocellulaires⁸³. Ces mutations conduiraient à une activation de la protéine, toutefois leur rôle oncogénétique reste encore indéterminé et leur réalité est controversée.
- Les sarcomes à cellules géantes comportent des translocations impliquant CSF-1 et conduisant à sa surproduction. CSF-1 induit le recrutement de cellules myéloïdes exprimant CSF-1R, qui constituent une grande partie de la masse tumorale et qui

génèrent une importante inflammation accompagnée d'une dégradation de l'os. Ces tumeurs sont sensibles au traitement par un inhibiteur de CSF-1R¹⁷⁸.

Même en l'absence de mutation, CSF-1R et CSF-1 sont impliqués dans de nombreux cancers (cancer du sein, de l'ovaire, du col de l'utérus, gliome¹⁷⁹ et glioblastome¹⁸⁰) avec une corrélation entre l'expression de CSF-1 et l'invasivité ainsi que le pronostic des tumeurs¹⁸¹.

- La production de CSF-1 peut agir de façon autocrine sur la tumeur pour stimuler sa prolifération, par exemple, des cancers du sein surexpriment CSF-1R et produisent CSF-1.
- CSF-1 peut attirer des monocytes et des macrophages qui vont infiltrer la tumeur et favoriser son développement via leur activité immunosuppressive^{177,182,183}.

<u>En résumé</u> :

- CSF-1R est un récepteur membranaire à activité tyrosine kinase qui active les voies PI3K/AKT, MAPK, NF-κB et STAT lorsqu'il est activé par un de ses ligands.

- CSF-1R est impliqué dans la génération des macrophages tissulaires et l'organogénèse au cours du développement et dans la différenciation des monocytes et des macrophages chez l'adulte.

- Les deux ligands de CSF-1R, CSF-1 et IL-34 ont des fonctions complémentaires et non redondantes du fait de leurs patterns d'expression spatio-temporelle différents.

- Bien que les mutations affectant CSF-1 et CSF1-R soient rares, ces protéines sont impliquées dans de nombreuses pathologies, notamment malignes via leur surexpression.

1.3 Les monocytes et les macrophages

1.3.1 L'hématopoïèse

Comme toutes les cellules hématopoïétiques, les monocytes dérivent de cellules souches hématopoïétiques (CSH), reponsables de la production de toutes les cellules sanguines. L'hématopoïèse a longtemps été considérée comme un système hiérarchique avec une cellule souche capable d'autorenouvellement et de pluripotence donnant naissance à des progéniteurs myéloïdes ou lymphoïdes dont le potentiel de différenciation décroît au fur et à mesure de leur prolifération et de leur orientation vers les différents lignages (figure 5). Le progéniteur lymphoïde produit les lymphocytes B, T et NK (natural killer) et le progéniteur myéloïde les érythrocytes, les mégacaryocytes, les polynucléaires et les monocytes. En aval du progéniteur myéloïde se trouvent deux progéniteurs aux capacités de différenciation plus restreintes, le progéniteur érythromégacaryocytaire (EMP) et le progéniteur granulo-monocytaire (GMP) qui chacun se différencieront en précurseurs qui ne donneront naissance qu'à une seule lignée. L'orientation vers une lignée plutôt qu'une autre s'effectue grâce à une balance entre les différents facteurs de transcription qui vont contrôler la différenciation. Pour le GMP, la balance entre C/EBP α et PU.1 serait responsable de l'orientation vers le lignage $C/EBP\alpha$ pouvant inhiber granulocytaire ou monocytaire respectivement, la différenciation monocytaire induite par PU.1184. Le perfectionnement des modèles de greffes de cellules souches et le développement des analyses à l'échelle unicellulaire remettent en cause ce modèle hiérarchique désormais remplacé par des modèles plus complexes et pas encore stabilisés.



Figure 5 : Schéma simplifié de l'hématopoïèse hiérarchique (CSH : Cellule souche hématopoïétique, CMP : Progéniteur myéloïde commun, CLP : Progéniteur lymphoïde commun, MEP : Progéniteur érythro-mégacaryocytique , GMP : Progéniteur granulomonocytaire , Ly : Lymphocyte, MK : Mégacaryocyte) Par exemple, plusieurs populations de progéniteurs multipotents (MPP) ont été identifiées chez la souris. Le MPP2 produit essentiellement des érythrocytes et des mégacaryocytes et faiblement des granuleux et des monocytes, le MPP3 produit surtout des granuleux et des monocytes et peu d'érythrocytes et de mégacaryocytes et le MPP4 est principalement orienté vers la production de cellules lymphoïdes mais conserve un potentiel granulo-monocytaire¹⁸⁵ (figure 6).



Figure 6 : Potentiels de différenciation des progéniteurs multipotents¹⁸⁵

Ces différentes populations pourraient être générées indépendamment à partir de différents clones de cellules souches pré-orientées, avec une certaine plasticité : il existe des progéniteurs à priori restreints au compartiment myéloïde et qui sont capables de repopulation du compartiment des cellules souches hématopoïétiques à long terme après greffe¹⁸⁶. Un modèle plus dynamique propose que le compartiment des CSHs soit composé de plusieurs populations formant un continuum d'états réversibles¹⁸⁵.

Les CSH ne contribuent que très peu à l'hématopoïèse en condition physiologique. Ces cellules sont majoritairement quiescentes et la production de cellules hématopoïétiques repose sur les MPP et les progéniteurs des différentes lignées qui possèdent de grandes capacités de prolifération¹⁸⁷. Lorsqu'une régénération importante de cellules hématopoïétiques est nécessaire, les CSH s'orienteraient vers la différenciation plutôt que vers l'autorenouvellement pour la production de MPP2 et 3 et les MPP4 seraient aussi réorientés vers la production de cellules myéloïdes (via la modulation de facteurs de transcription)¹⁸⁵.

Les conclusions tirées des expériences de greffes, bien qu'informatives sur le potentiel de différenciation des populations de cellules souches et de progéniteurs ne sont pas représentatives de l'hématopoïèse physiologique et doivent donc être interprétées en tenant compte de ce biais.

1.3.2 La monocytopoïèse

La production des monocytes s'effectue sous le contrôle de différentes cytokines qui orientent la différenciation des progéniteurs vers ce lignage. Une des cytokines clés est CSF-1 qui, en combinaison avec l'IL-3 et le SCF (stem cell factor), favorise la prolifération et la différenciation myéloïde des progéniteurs multipotents. CSF-1 associé au CSF-2 oriente la différenciation de ces progéniteurs vers la production de monocytes et de cellules dendritiques¹⁸⁸.

De façon intéressante, CSF-1 agit également en amont, au niveau des cellules souches hématopoïétiques qu'il oriente directement vers le lignage myéloïde via l'induction de $PU.1^{107}$. PU.1 inhibe les facteurs de transcription favorisant la différenciation vers d'autres types cellulaires comme GATA-1 (impliqué dans la différenciation érythro-mégacaryocytaire) et active les facteurs de transcription myéloïdes comme IRF8 (interferon regulatory factor), EGR1 et KLF4 (krüppel-like factor). Ces protéines régulent notamment l'expression de CSF-1R à la surface des cellules. C/EBP- α oriente le progéniteur vers le stade GMP [perte du potentiel lymphoïde résiduel via l'inhibition d'autres facteurs de transcription comme PAX5 (paired box)] et augmente l'expression de PU.1. L'expression de PU.1 combinée à celle d'EGR1, EGR2, AP-1, IRF8, KLF4, MAFB (musculoaponeurotic fibrosarcoma) et c-MAF permet d'orienter la différenciation vers le lignage des monocytes/macrophages/cellules dendritiques au détriment du lignage granulocytaire^{189,190}.

Le progéniteur commun aux monocytes et aux cellules dendritiques donne naissance à deux progéniteurs distincts. Le progéniteur de cellules dendritiques produit les cellules dendritiques conventionnelles et les cellules dendritiques plasmacytoïdes tandis que le progéniteur monocytaire génère les monocytes et les macrophages (dont les ostéoclastes) en réponse au CSF-1, au CSF-2 et à l'IL-34¹⁹¹ (figure 7).



Figure 7 : Différenciation des monocytes et des cellules dendritiques (Pg : progéniteur, DC : cellule dendritique, cDC : cellule dendritique conventionnelle, pDC : cellule dendritique plasmacytoïde)

1.3.3 Les monocytes

Les monocytes représentent 3 à 10% des leucocytes sanguins. Ils se définissent par l'expression de marqueurs de surface comme CD14 (co-récepteur du LPS, lipopolysaccharide), CD115 (CSF-1R), CD11b (intégrine inhibitrice du signal des TLR), HLA-DR et CD16 (récepteur de faible affinité du fragment Fc des IgG) sur certaines populations.

Ces cellules ont une durée de vie courte dans le sang (environ un jour pour la souspopulation majoritaire)¹⁹² mais peuvent être recrutées au sein des tissus où elles se différencient en macrophages, ostéoclastes ou cellules dendritiques. Cette différenciation induit l'expression des protéines anti-apoptotiques MCL-1 (myeloid cell leukemia) et XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis)^{193,194} permettant d'allonger leur durée de vie dans les tissus. Lorsque ces cellules sont cultivées *in vitro* en l'absence de sérum ou de facteur de croissance, elles meurent spontanément par apoptose. Ce processus est bloqué via l'inhibition de la voie FAS¹⁹⁵, par des médiateurs de l'inflammation (TNF- α , IL-1 β) ou des produits bactériens (LPS)¹⁹⁶.

Les monocytes sont des cellules de la lignée myéloïde participant à la réponse immunitaire innée.

- Ils sont recrutés à partir de la circulation en cas d'inflammation ou d'infection par des chimiokines comme CCL2 et, après leur extravasation, migrent au sein des tissus où ils exercent une activité anti-microbienne et pro-inflammatoire¹⁹⁷.
- Ils produisent des radicaux libres de l'oxygène, du monoxyde d'azote (NO) et des enzymes lysosomales qui digèrent les pathogènes phagocytés¹⁹⁸.
- Ils sécrètent des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , l'IL-8 (permettant le recrutement de polynucléaires neutrophiles), l'IFN- γ (interféron) et le TNF- α ainsi que des facteurs de croissance favorisant la différenciation myéloïde comme CSF-1 et CSF-2¹⁹⁹.

Ils participent aussi à la mise en place de la réponse immune adaptative : leur production d'IL-12 et d'IL-23 favorise la polarisation Th1 et Th17²⁰⁰. De plus, via leur différenciation en cellules dendritiques, les monocytes jouent un rôle dans la présentation de l'antigène et la stimulation des lymphocytes T²⁰¹. Les monocytes euxmêmes peuvent acheminer des antigènes vers les zones T des ganglions sans se différencier en cellules dendritiques²⁰².

Les monocytes sont donc des cellules très plastiques impliquées principalement dans le développement de la réponse inflammatoire tissulaire via leur différenciation en macrophages et en cellules dendritiques. Ces cellules exercent aussi un rôle au sein de la circulation, notamment l'élimination par phagocytose des complexes hémoglobine/haptoglobine afin de réduire les dommages oxidatifs qu'ils génèrent²⁰³.

Bien que les monocytes soient globalement pro-inflammatoires, l'étude de leurs fonctions s'est complexifiée avec l'identification de plusieurs sous-populations exerçant des rôles distincts.

1.3.4 Les sous-populations monocytaires

1.3.4.1 Classification des monocytes humains

Les monocytes circulants sont définis par l'expression de marqueurs de surface comme CD14, CD115 et CD11b. Une population de monocytes CD14^{+/low}, CD16⁺ a été identifiée²⁰⁴. Puis, les monocytes CD16⁺ ont été subdivisés en deux sous-populations.

A l'heure actuelle, trois sous-populations de monocytes sont caractérisées selon le niveau d'expression de CD14 et CD16 (figure 8) : les monocytes classiques, CD14^{high}, CD16⁻ représentent 85% des monocytes circulants, les monocytes intermédiaires CD14^{high}, CD16^{high} en représentent 5% et les monocytes non classiques CD14^{low}, CD16^{high} 10%. Ces sous-populations se distinguent par l'expression différentielle d'autres marqueurs de surface (figure 9).


Figure 8 : Marquage cytométrique des sous-population monocytaires humaines (sur PBMC (peripheral blood mononuclear cell) isolées par Ficoll à partir de Buffy Coat)

Bien que les monocytes intermédiaires expriment généralement ces marqueurs à un niveau intermédiaire entre les monocytes classiques et les monocytes non classiques, certains leurs sont plus spécifiques comme HLA-DR, CCR5, CD11c, CD163 et TLR4²⁰⁵⁻²⁰⁷.



Figure 9 : Marqueurs de surface des sous-populations monocytaires humaines^{206,208,209}

L'utilisation du marqueur slan (6-sulfo LacNAc) a été proposée pour distinguer les monocytes non classiques des monocytes intermédiaires, difficile à différencier avec les seules expressions de CD14 et CD16. Toutefois les cellules slan⁺ ne correspondent qu'à une partie des monocytes non-classiques si bien que la classification antérieure est toujours la référence²¹⁰.

Une sous-population de monocytes intermédiaires exprimant Tie-2 (récepteur des angiopoïétines) a été identifiée, suggérant que la classification actuelle des monocytes en trois sous-populations ne reflète pas la complexité observée *in vivo*. De plus, des études de transcriptome menées sur des cellules individuelles ont identifié plusieurs clusters. Certains correspondent bien à une des sous-populations mais d'autres regroupent des monocytes de deux sous-populations différentes ou créent des sous-groupes au sein d'une population^{211,212}.

Ces études démontrent l'hétérogénéité des monocytes au sein des différentes populations définies à l'heure actuelle.

1.3.4.2 Origine des sous-populations de monocytes

L'origine des sous-populations monocytaires humaines a longtemps été débattue avec 2 hypothèses :

1 - les trois sous-populations sont produites indépendamment par un ou plusieurs progéniteurs différents au sein de la moelle osseuse.

2 - Ces sous-populations représentent différents stade de maturation des monocytes.

Une étude récente suggère la validité de la seconde hypothèse en marquant les monocytes avec du glucose associé à du deutérium *in vivo* et en injectant des monocytes humains dans des souris humanisées¹⁹². Les monocytes classiques sont produits dans la moelle osseuse où ils sont retenus un ou deux jours avant d'être libérés dans la circulation. Cette rétention permet d'augmenter rapidement le nombre de monocytes circulants en cas d'inflammation.

Une fois en circulation, les monocytes classiques ont une durée de vie d'environ un jour. Ils quittent rapidement le flux sanguin, meurent ou se différencient en monocytes intermédiaires qui peuvent rester plus longtemps en circulation (4 jours environ).

L'intégralité des monocytes intermédiaires se différencie en monocytes non classiques qui présentent une durée de vie encore supérieure dans le sang (une semaine).

Cette étude démontre donc que les monocytes classiques sont capables de se différencier dans le sang pour donner naissance aux deux autres sous-populations (qui ne sont pas présentes dans la moelle) qui représentent donc un continuum d'états de maturation des monocytes. **1.3.4.3** Classification et fonctions des sous-populations monocytaires chez la souris

Deux sous-populations de monocytes sont définies chez la souris, les monocytes inflammatoires Ly6C^{high}, CX3CR1^{low}, CD11c^{low 198} et les monocytes résidents ou patrouilleurs Ly6C^{low}, CX3CR1^{high}, CD11c^{high 213}. Ces deux populations ségrègent respectivement avec les monocytes classiques et les monocytes intermédiaires/non classiques dans les études comparatives des profils d'expression génique.

Les monocytes inflammatoires ont une grande activité de phagocytose et produisent des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α en réponse aux infections ou lorsqu'ils sont recrutés au sein des tissus endommagés via CCL2^{198,213,214}. Les monocytes résidents ont un phénotype moins inflammatoire et favorisent l'angiogénèse et la réparation tissulaire. Ils ont également un rôle de surveillance d'où leur qualificatif de patrouilleurs. Grâce à leur capacité à migrer le long des cellules endothéliales (via LFA-1, lymphocyte function-associated antigen), ces monocytes sont rapidement recrutés dans les tissus en cas d'infection où ils se différencient en macrophages pouvant générer une réponse inflammatoire. Ils participent également à la surveillance de l'intégrité des vaisseaux afin de détecter d'éventuelles lésions au sein de l'endothélium²¹⁵.

En cas d'infarctus, les monocytes inflammatoires sont recrutés en premier et vont favoriser la phagocytose des cellules mortes tandis que les monocytes résidents sont recrutés dans un second temps pour induire la réparation tissulaire²¹³.

Ces deux populations représentent différentes étapes de maturation des monocytes. Lors de la différenciation des monocytes inflammatoires en macrophages pulmonaires, ceux-ci doivent d'abord se différencier en monocytes résidents²¹⁶. Ce processus de différenciation est régulé par Nur77 (nuclear receptor) et Notch2. L'expression de Nur77 est nécessaire à la génération des monocytes patrouilleurs²¹⁷ et le ligand de Notch2 DLL1 (Notch ligand delta-like 1) exprimé par certaines cellules endothéliales de la moelle osseuse et de la rate régule cette conversion *in vitro* et *in vivo*²¹⁸.

1.3.4.4 Fonctions biologiques des sous-populations monocytaires humaines

Les sous-populations monocytaires humaines exercent des fonctions proches de celles identifiées chez leurs équivalents murins.

Les monocytes classiques sont plutôt pro-inflammatoires. Ils possèdent une grande capacité de phagocytose et produisent de l'IL-8, de l'IL-6, du CSF-2, du CCL2 et des ROS en réponse au LPS²⁰⁸. Ils peuvent également produire de l'IL-10. Les monocytes classiques expriment particulièrement les gènes impliqués dans la réponse à l'infection, à l'hypoxie et aux hormones, les gènes codant pour des médiateurs pro-inflammatoires et les gènes associés à l'angiogénèse, à la coagulation et à la réparation tissulaire. Ils présentent par ailleurs une expression élevée de gènes de résistance au stress oxidatif, de gènes anti-apoptotiques et de gènes favorisant la prolifération^{206,219}.

Les monocytes non classiques ont peu d'activité de phagocytose et ne produisent pas de ROS en réponse au LPS. En revanche, ils peuvent sécréter de l'IL-1 β , du TNF- α et

du CCL3 en réponse au LPS²⁰⁶ mais aussi aux complexes immuns et aux acides nucléiques. Ces cellules seraient donc également impliquées dans la réponse immunitaire anti-virale²²⁰. De manière analogue aux monocytes patrouilleurs murins, ces cellules peuvent migrer le long de l'endothélium²⁰⁶ et expriment beaucoup de gènes associés au remodelage du cytosquelette, à l'adhérence et à la migration transendothéliale²²¹. Comparés aux monocytes classiques, les monocytes non classiques expriment plus de gènes pro-apoptotiques et présentent plus d'activation des caspases 3 et 7. Ils sont ainsi plus sensibles à l'apoptose qu'elle soit spontanée ou induite par un stress oxydatif²¹⁹.

Les monocytes intermédiaires sont capables, après activation par du LPS, de produire des ROS²²¹, de l'IL-1 β , du TNF- α , de l'IL-6 et de l'IL-8²⁰⁶. Ils sont impliqués dans l'activation des lymphocytes T²²¹ et la sous-population exprimant Tie2 participe à l'angiogénèse²²². L'étude de leur profil d'expression génique suggère aussi leur implication dans les fonctions de présentation de l'antigène, l'inflammation et l'angiogénèse²²¹.

1.3.4.5 Implication en pathologie des différentes sous-populations monocytaires

Le nombre de monocytes circulants peut être affecté par différentes pathologies comme les infections ou les cancers qui peuvent être à l'origine de monocytose réactionnelle. Ces modifications n'affectent cependant pas toutes les sous-populations de la même manière. Les monocytes CD16⁺, particulièrement les monocytes intermédiaires, sont augmentés en cas d'infections, de cancers, de maladies auto-immunes ou de pathologies inflammatoires comme le sepsis²²³, la tuberculose²²⁴, l'hépatite B²²⁵, les infections par le VIH (virus de l'immunodéfiscience humaine)²²⁶, le cancer du sein²²⁷, le cancer colorectal²²⁸, la sarcoïdose²²⁹, la maladie de Crohn²³⁰, l'arthrite psoriasique²³¹, l'asthme sévère²³² ou l'arthrite rhumatoïde²³³.

Bien que le rôle exact de la monocytose soit inconnu dans la plupart des cas, on observe souvent une corrélation entre le nombre de monocytes intermédiaires et la sévérité de la pathologie. L'augmentation de ces monocytes pourrait simplement refléter un état inflammatoire général comme en cas de maladie cancéreuse. Ils peuvent aussi participer au développement de la pathologie. Dans l'arthrite rhumatoïde par exemple, ils favorisent le développement d'une réponses Th17 pathologique et dans l'arthrite psoriasique les monocytes intermédiaires constituent les précurseurs des ostéoclastes responsables de la pathologie²³¹. Le nombre de monocytes CD16⁺ diminue sous corticoïdes, qui induisent leur apoptose²³⁴.

Une étude a identifié une famille dépourvue de monocytes CD16⁺ circulants sans pouvoir cependant identifier la ou les mutations impliquées²³⁵. Le propositus présente un état auto-inflammatoire général accompagné d'infections récurrentes. Toutefois les autres membres de la famille ne semblent pas présenter de pathologie consécutive à cette absence de monocytes CD16⁺.

1.3.4.6 Rôle de CSF-1/CSF-1R dans la génération des sous-populations monocytaires

Dès l'identification des sous-populations monocytaires, il a été suggéré que CSF-1 pouvait participer à la production de toutes ces populations. CSF-1 permet de générer

les monocytes classiques à partir des progéniteurs médullaires et est présent dans la circulation de façon constitutive. On observe une augmentation progressive de l'expression de CSF-1R lors de la maturation des monocytes classiques vers les monocytes non classiques^{206,221}. Le traitement *in vitro* de monocytes classiques par du CSF-1 induit une expression du CD16²³⁶ et l'inhibition de l'activité du récepteur bloque ce processus²³⁷. La combinaison de CSF-1 et de CSF-2 induit en outre l'expression de slan *in vitro*²³⁸.

In vivo, l'utilisation d'un anticorps anti-CSF-1R chez la souris déplète les macrophages résidents et les monocytes patrouilleurs tandis que les monocytes inflammatoires sont augmentés¹⁰². Le KO du facteur de transcription C/EBPβ chez la souris entraîne une diminution du nombre et de la survie des monocytes patrouilleurs, probablement du fait de la baisse d'expression de *Csf1r* qui est régulée par C/EBPβ²³⁹. Chez l'homme, l'administration d'un anti-CSF-1R diminue également le nombre de monocytes CD14⁺, CD16^{+ 178}. Cela suggère un blocage du processus de maturation de ces monocytes lorsqu'on inhibe l'activation de CSF-1R.

La différenciation des monocytes classiques humains en monocytes CD16⁺ in vivo, dans la circulation murine, a été étudiée chez des souris exprimant IL-3, CSF-1, CSF-2, TPO (thrombopoïétine) et SIRP α (signal regulatory protein) humains. Ces données suggérent qu'une ou plusieurs de ces cytokines sont impliquées dans la survie et la différenciation des monocytes humains. L'injection de CSF-1 recombinant chez l'homme augmente le pourcentage de monocytes CD16⁺ ²⁴⁰, avec un effet synergique de l'IFN- γ^{241} . Les mutations inactivatrices touchant CSF-1R dans la leucoencéphalopathie héréditaire diffuse à sphéroïdes engendrent une diminution des monocytes non classiques et parfois des monocytes intermédiaires²¹⁰. Toutes ces études suggèrent une implication de CSF-1, seul ou en combinaison avec d'autres cytokines, dans la génération des monocytes intermédiaires et non classiques à partir des monocytes classiques. Il est toutefois difficile de démontrer son effet direct *in vitro*, CSF-1 induisant la différenciation des monocytes classiques en macrophages.

1.3.5 La leucémie myélomonocytaire chronique

La leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC) est un sydrome myélodysplasique/myéloprolifératif défini par une expansion des monocytes sanguins, souvent accompagnée d'une augmentation des cellules granuleuses et d'une dysplasie des cellules sanguines. Il s'agit d'une pathologie rare du sujet âgé (environ 4 cas par million d'habitants par an, avec un âge médian au diagnostic de 75 ans)²⁴². La survie médiane est de 24 à 30 mois.

Son diagnostic repose sur la présence d'une monocytose persistante (3 mois) supérieure à 1.10^9 /L. Les monocytes doivent représenter plus de 10% des leucocytes sanguins. Le taux de blastes dans la moelle doit rester inférieur à $20\%^{243}$. La maladie est divisée en trois catégories : LMMC-0 (blastes < 2% dans le sang et < 5% dans la moelle osseuse), LMMC-1 (blastes compris entre 2 et 4% dans le sang et 5-9% dans la moelle osseuse), LMMC-2 (blastes compris entre 5 et 19% dans le sang et 10-19% dans la moelle osseuse ou présence de corps d'Auer).

La dysplasie celullaire peut affecter les lignées granuleuse, érythroïde et

plaquettaire et aboutir à des cytopénies (essentiellement anémie et thrombopénie) responsables d'une partie des décès liés à la maladie. Environ 25 à 30% des patients évoluent vers une leucémie aigüe myéloïde (LAM) très résistante à la chimiothérapie²⁴⁴.

Des anomalies cytogénétiques sont identifiées dans 30% des LMMC. Elles sont hétérogènes : trisomie 8, -7/del7q, del20q, del12p, -Y, ainsi que de nombreuses disomies uniparentales²⁴⁵. Des mutations ponctuelles affectent des gènes de l'épigénétique chez plus de 90% des patients [TET2 (ten eleven translocation), ASXL1 (additional sex combslike 1), EZH2 (enhancer of zest homolog 2), IDH1 et 2 (isocitrate dehydrogenase), DNMT3A (DNA methyl transferase), ASXL2, SETBP1 (Set-binding protein)], des gènes de l'épissage chez 75% des patients [SRSF2 (splicing factor serine/arginine-rich), U2AF1 (U2 small nuclear RNA auxiliary factor), SF3B1 (splicing factor 3B subunit 1), ZRSR2 (zinc finger-, ccch domain-, and rna-binding motif-containing serine/arginine-rich protein)], des gènes de la signalisation chez 60% des patients [CBL, KRAS, NRAS, JAK2 (janus kinase), NF1 (neurofibromatosis type I), DOCK2 (dedicator of cytokinesis), FLT3, *PTPN11* (protein-tyrosine phosphatase nonreceptor-type)] et aussi des facteurs de transcription comme AML1 (10% des patients), TP53 ou PHF6 (PHD finger protein, 4% des patients)²⁴⁶. Aucune de ces anomalies n'est spécifique de la LMMC, la plupart étant retrouvées dans les SMD ou les LAM, mais la combinaison TET2, SRSF2 est assez caractéristique de cette maladie.

Le pronostic de la maladie dépend essentiellement de l'âge, de la leucocytose circulante, du taux de blastes dans la moelle, du taux d'hémoglobine et du chiffre des plaquettes. La présence de mutations d'*ASXL1*²⁴⁷, de *SETBP1*, d'*AML1* et de *NRAS*²⁴⁸ est de mauvais pronostic. Il existe peu de traitements curatifs en dehors de la greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques qui n'est proposée qu'aux patients les plus jeunes. Un traitement par agents déméthylants est possible pour les malades présentant un risque élevé d'aggravation de la maladie et non éligibiles pour une greffe^{249,250}. Ces traitements ont un effet symptomatique sans éliminer le clone malin²⁴⁶.

TET2 est une enzyme responsable de la conversion des 5-méthylcytosines en 5hydroxyméthylcytosines²⁵¹ (5-hmC). Les 5-hmC font partie des marques épigénétiques de l'ADN mais constituent également un intermédiaire permettant la déméthylation des cytosines²⁵². IDH1 et 2 sont des enzymes catabolisant la décarboxylation oxydative de l'isocitrate en 2-oxoglutarate qui sert de substrat à TET2. La mutation de ces enzymes conduit à une production anormale de 2-hydroxyglutarate qui exerce un effet inhibiteur sur TET2 générant le même phénotype qu'une mutation directe du gène²⁵³. Ces mutations favorisent ainsi l'augmentation de la méthylation de l'ADN²⁵⁴. Les mutations d'*ASXL1* et d'*EZH2* diminuent en revanche l'activité du complexe polycomb PRC2 (polycomb repressive complex) responsable de la répression des gènes via la méthylation de la lysine 27 de l'histone 3²⁴⁵. A ces anomalies épigénétiques s'ajoutent des anomalies de l'épissage qui peuvent perturber la maturation des ARNm et affecter l'expression des gènes.

Cette maladie possède à la fois une composante proliférative et une composante dysplasique. L'augmentation de la monocytopoïèse et de la granulopoïèse s'explique en partie par l'hypersensibilité des progéniteurs médullaires à la cytokine CSF-2 en cas de mutations touchant les voies de signalisation (activation de RAS ou inactivation de CBL), ce qui favorise l'expansion du compartiment des progéniteurs myéloïdes²⁵⁵. La mutation de TET2 induit d'autre part un biais de différenciation des progéniteurs vers le lignage

granulo-monocytaire au détriment des lignages érythroïde et mégacaryocytaire²⁴⁴ puis favorise l'expansion des monocytes tout en réduisant la différenciation granuleuse²⁵⁶. La composante dysplasique est moins bien connue et touche surtout les lignées érythroïde, mégacaryocytaire et granuleuse. Une partie des malades présente dans le sang des cellules granuleuses immatures immunosuppressives qui bloquent la différenciation des monocytes en macrophages via la sécrétion d' α -défensines²⁵⁷.

La monocytose observée dans la LMMC est par ailleurs restreinte aux monocytes classiques, au détriment des monocytes intermédiaires et non classiques²⁰⁹. Ces données suggèrent un blocage de la maturation des monocytes classiques accompagné d'une augmentation de leur production et éventuellement de leur durée de vie. De plus, on observe une augmentation des concentrations plasmatiques de certaines cytokines inflammatoires comme l'IL-8, le TNF- α , l'IL-12, l'IL-17 et CSF-1²⁵⁸. CCL2 et CCL5 sont en revanche diminués. L'augmentation de CSF-1 et de TNF- α plasmatiques pourrait participer à un allongement de la durée de vie des monocytes sanguins. Ces derniers posséderaient une expression légèrement plus élevée de CSF-1R à leur surface comparés aux monocytes classiques de sujets sains²⁰⁹. Les mécanismes moléculaires impliqués dans le blocage de leur maturation sont en revanche inconnus et pourraient aussi être liés à la présence des cellules granuleuses immatures et/ou aux mutations affectant l'épissage et la méthylation de l'ADN et des histones.

1.3.6 Différenciation des monocytes

Les monocytes font partie du système des phagocytes mononucléés. Il s'agit d'un groupe hétérogène de cellules myéloïdes possédant des capacités de phagocytose. Il est constitué des monocytes, des macrophages et des cellules dendritiques. Les monocytes sont des cellules pourvues d'une grande plasticité et capables de se différencier en différents types cellulaires selon le tissu au sein duquel ils sont recrutés et le microenvironnement cytokinique. Les cellules dendritiques et les macrophages peuvent être issus de la différenciation de monocytes sanguins de même que les ostéoclastes.

1.3.6.1 La différenciation des monocytes en cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont des cellules hématopoïétiques impliquées dans la présentation de l'antigène aux lymphocytes T et leur activation concomitante. Elles constituent les meilleures cellules présentatrices professionnelles de l'organisme et sont indispensables à la mise en place des réponses immunitaires adaptatives dépendantes de l'antigène. Elles sont produites dans la moelle osseuse à partir d'un progéniteur dérivé de la lignée myéloïde capable de produire des monocytes et des cellules dendritiques (MDP, monocyte and dendritic cell progenitor). Ce progéniteur s'engage ensuite vers la lignée monocytaire ou vers la cellule dendritique (CDP common DC progenitor). Le CDP peut donner naissance à un précurseur des cellules dendritiques (cDC) qui produira les deux types de cDC, cDC1 et cDC2, ou se différencier en cellule dendritique plasmacytoïde (pDC)²⁵⁹.

Les cDC1 participent au développement des réponses Th1, les cDC2 favorisent les réponses Th2 et Th17 et les pDC induisent des réponses anti-virales via la production d'interférons de type I. Une partie des cDC est générée à partir des monocytes¹¹¹. *In vitro*, l'ajout de CSF-2 et d'IL-4 permet leur différenciation en cellules dendritiques CMH-

II^{high}, CD1⁺, B7⁺, CD40⁺, CD14⁻ capables d'activer les lymphocytes T²⁶⁰. *In vivo*, les monocytes participent au renouvellement de certaines populations de cellules dendritiques tissulaires comme les DC intestinales²⁶¹. Ils peuvent aussi se différencier en cas d'infection et migrer vers les ganglions pour favoriser le déclenchement d'une réponse adaptative²⁰¹ et produire des cytokines pour stimuler la réponse immunitaire innée²⁶².

1.3.6.2 La différenciation des monocytes en ostéoclastes

Les souris *csf1-/-* ou *csf1r-/-*présentent de graves malformations osseuses dues à l'absence d'ostéoclastes démontrant le rôle prépondérant de cette cytokine pour la formation de ces cellules. Les ostéoclastes sont des cellules géantes multinucléées responsables de la résorbtion de l'os. Elles se forment à partir d'un précurseur généré par la lignée monocytaire. Leur exposition à la combinaison CSF-1 + RANKL induit leur prolifération et l'expression de gènes caractéristiques des ostoclastes (*TRAP* tartrate-resistant acid phosphatase et cathepsine K qui codent pour des enzymes de résorbtion de l'os). Ces précurseurs vont fusionner pour former un polykaryon et se différencier en ostéoclaste fonctionnel. CSF-1 joue également un rôle dans la survie, la migration et l'acquisition de la morphologie des ostéoclastes matures^{263,264}.

Les monocytes peuvent se différencier en ostéoclastes lorsqu'ils sont exposés à CSF-1 et au RANKL²⁶⁵. De façon intéressante, seuls les monocytes CD16⁻ (classiques) se différencient bien que les monocytes CD16⁺ répondent au RANKL en produisant des cytokines. Les monocytes classiques, bien que considérés comme des cellules matures, conservent donc une certaine pluripotentialité via leur capacité à se différencier en cellules dendritiques et en ostéoclastes.

1.3.6.3 Génération et fonctions des macrophages

Les macrophages sont des cellules myéloïdes résidant au sein des différents tissus de l'organisme où elles assurent des fonctions de maintenance de l'homéostasie, de surveillance immunitaire et de réparation tissulaire. Ces cellules apparaissent très tôt au cours du développement, et sont générées en trois vagues successives chez la souris²⁶⁶.

- Les premiers macrophages, d'origine maternelle, proviennent du sac vitellin (E7,5-E8).
- Ils sont progressivement remplacés par des macrophages d'origine foetale produits à partir de progéniteurs CD45⁻, c-Kit⁺ qui apparaissent entre E7 et E8 au niveau du sac vitellin. Vers E9 il génèrent deux types de progéniteurs, A1 (CD45⁺, c-Kit^{low/-}, CX3CR1⁻, F4/80^{low}) et A2 (CD45⁺, c-Kit^{high}, CX3CR1⁺, F4/80^{high}). Après la mise en place de la circulation (E8,5), les macrophages, générés essentiellement à partir de A2 vont coloniser les tissus²⁶⁷ où ils participeront à l'organogénèse.
- Les cellules souches hématopoïétiques définitives apparaissent dans la région AGM (aorto-gonado-mésonéphrotique) à E9 et vont remplacer les progéniteurs issus du sac vitellin pour assurer l'hématopoïèse au niveau du foie foetal entre E14,5 et E18,5. Ces cellules vont permettre à terme la production continue de monocytes sanguins²⁶⁸.

L'expression de CSF-1R apparaît dans les progéniteurs foetaux du sac vitellin à E8²⁶⁹ ou dans les progéniteurs A2 à E9²⁷⁰. Elle est importante pour l'apparition des macrophages tissulaires durant l'embryogénèse.

Au cours du développement, les macrophages jouent un rôle essentiel dans l'organogénèse et la morphogénèse. Ils phagocytent les cellules mortes et contribuent au remodelage de la matrice extracellulaire. Ces fonctions facilitent la croissance tissulaire, la mise en place de réseaux canalaires, la résorbtion de certains tissus comme les espaces interdigitaux²⁰⁰. Les macrophages participent également à la mise en place du réseau vasculaire^{271,272} et des circuits neuronaux²⁷³. Ils augmentent aussi la viabilité des cellules souches de la glande mammaire²⁷⁴ et des neurones²⁷³ et maintiennent la niche des cellules souches hématopoïétiques²⁷⁵.

Ces macrophages tissulaires persistent chez l'adulte où ils assurent des fonctions trophiques, qui diffèrent selon leur localisation.

- Les macrophages de l'intestin maintiennent un environnement anti-inflammatoire via la production d'IL-10 qui favorise une réponse T régulatrice pour induire la tolérance du microbiote et des antigènes alimentaires. Ils facilitent également la réparation de l'épithélium et participent aux réponses immunitaires en cas d'effraction de la barrière épithéliale²⁷⁶.
- Dans le foie, les cellules de Küpffer sont responsables de l'élimination des toxines et des pathogènes circulants et participent au métabolisme des lipides²⁷⁷.
- Dans la rate, les macrophages éliminent principalement les hématies et contribuent au recyclage du fer²⁷⁸.
- Dans les poumons, les macrophages phagocytent les débris (poussières, allergènes..), les pathogènes et l'excès de surfactant.
- Au niveau de l'épiderme, les cellules de Langherans exercent essentiellement des fonctions de phagocytose et de présentation de l'antigène.
- Enfin via leur production d'IL-10, les macrophage participent à la régulation du métabolisme en sensibilisant les adipocytes à l'insuline²⁷⁹.

Les macrophages étant présents dans tous les tissus, en particulier les épithéliums et le système nerveux central (où ils sont les seules cellules à fonction immunitaire), ils constituent une des premières lignes de défense contre les pathogènes. Ils expriment de nombreux récepteurs de surface (pattern recognition receptors comme les TLR, les récepteurs NOD-like (nucleotide-binding oligomerization domain), les récepteurs de type lectine C, les récepteurs Fc et du complément pour interagir avec les complexes immuns) permettant la reconnaissance des pathogènes (via les pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), des débris et des cellules mortes ou endommagées. Activés, ils produisent des cytokines et chimiokines pour initier la réponse inflammatoire et phagocyter les pathogènes ou les débris. Comme les monocytes, ils participent aux réponses anti-bactériennes via la production de TNF- α , d'IL-1 β et de NO. Ils sécrètent de l'IL-12 et de l'IL-23 pour favoriser le développement de réponses Th1 et Th17 respectivement. Ils contribuent aux réponses anti-virales via leurs fonctions de présentation de l'antigène²⁸⁰.

Une fois la réaction inflammatoire déclenchée et le pathogène éliminé, les macrophages (qui peuvent aussi être issus de la différenciation de monocytes sanguins) entrent en apoptose ou se repolarisent vers un phénotype anti-inflammatoire et réparateur. Cela entraîne l'arrêt de la réaction inflammatoire, qui, à terme, endommagerait les tissus, et le déclenchement des processus de réparation tissulaire (activation des fibroblastes pour la production de collagène, remodelage de la matrice extracellulaire et angiogénèse)²⁰⁰.

1.3.7 La polarisation des macrophages

Les macrophages notamment tissulaires, exercent des fonctions très différentes selon leur localisation et les stimuli auxquels ils sont exposés. Dans des conditions physiologiques, la plupart sont anti-inflammatoires mais leur phénotype peut être amené à changer en cas d'infection ou de lésion. Par analogie avec la polarisation des lymphocytes T, les macrophages ont été classés en deux grandes catégories selon leur phénotype.

- Les macrophages pro-inflammatoires appelés M1 ou classiquement activés sont induits notamment en cas d'infection bactérienne ou par des pathogènes intracellulaires via les cytokines de la réponse Th1. Ils possèdent de grandes capacités de phagocytose, produisent des ROS et des cytokines pro-inflammatoires¹³².
- Par opposition, les macrophages M2, ou alternativement activés, sont induits en cas de réponse Th2 dirigée contre les parasites extracellulaires²⁸¹. Ils favorisent le remodelage de la matrice extracellulaire et activent les fibroblastes pour augmenter la réparation tissulaire. Ils ont également des fonctions tolérogènes afin de limiter l'inflammation et favorisent les réponses T régulatrices²⁷⁷.

1.3.8 Différenciation et polarisation des macrophages in vitro

Il est possible de générer des macrophages humains *in vitro* à partir de monocytes sanguins en présence de sérum et de cytokines. Du CSF-1²⁸² ou du CSF-2 sont suffisants pour générer des macrophages²⁸³. Les monocytes cultivés en présence de ces cytokines vont adhérer à leur support, augmenter leur taille et modifier leur morphologie et l'expression de certains marqueurs de surface. Ces cellules doivent être stimulées par d'autres molécules pour induire leur polarisation et leur production de cytokines. Même en l'absence de stimulation supplémentaire, les macrophages générés par CSF-1 ou CSF-2 sont différents.

- CSF-1 produit des cellules au phénotype allongé, de type fibroblastique tandis que CSF-2 génère des cellules plutôt rondes, dépourvues d'extension¹²¹ (figure 10).
- Les marqueurs de surface de ces macrophages sont également différents : CSF-1 induit l'expression de CD163, augmente CD14 et CD16²⁰⁵ alors que CSF-2 induit CD71, CD206 et diminue l'expression du CD14²⁸³.



Figure 10 : Morphologie des monocytes différenciés 4 jours en macrophages *in vitro* avec CSF-1 ou CSF-2 (échelle : 20µm)

Les deux populations de macrophages obtenues ressemblent aux macrophages M2 et M1 respectivement²⁸⁴ de part leurs marqueurs de surface. De plus, la stimulation des macrophages générés par CSF-1 avec du LPS induit une production d'IL-10 et de CCL2 tandis que les macrophages générés avec CSF-2 produisent de l'IL-6, de l'IL-23, du TNF- α et de l'IL-12^{121,285}. Les macrophages générés par CSF-1 sont donc moins inflammatoires en réponse au LPS que ceux générés avec CSF-2.

D'autres cytokines sont utilisées pour différencier des macrophages *in vitro*, seules ou en combinaison, l'IL-4, l'IL-10 et l'IL-13²⁸⁵ pour générer des macrophages "M2", l'IFN- γ^{286} et le LPS pour obtenir des macrophages "M1".

L'exposition à une cytokine donnée induit en général l'inhibition de la polarisation opposée. Par exemple le pré-traitement des cellules par du CSF-2 ou de l'IFN- γ bloque l'induction du phénotype normalement induit par CSF-1 ou par l'IL-34 et *vice et versa*^{128,285}. Toutefois dans d'autres expériences, l'exposition séquentielle à deux cytokines induisant des polarisations opposées génère un phénotype intermédiaire entre M1 et M2, montrant la capacité des macrophages à répondre à un changement de leur environnement même après avoir déjà été orientés vers un phénotype particulier²⁸⁵.

Les macrophages obtenus *in vitro* avec ces différentes cytokines ne sont pas équivalents entre eux et ne reflètent que très imparfaitement la complexité de ces cellules *in vivo* où elles sont exposées à une combinaison de stimuli à la fois pro-M1 et pro-M2, qui peuvent évoluer au cours du temps, aboutissant à un spectre continu de polarités différentes.

1.3.8.1 Génération et fonctions des différents macrophages

Les macrophages M1 ou inflammatoires sont générés en cas de réponse Th1. Les lymphocytes NK, les lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ produisent du CSF-2 et de l'IFN- γ qui vont orienter la polarisation des macrophages vers un phénotype M1. Les macrophages produisent alors des ROS et du NO et phagocytent les pathogènes¹³² (figure 11). Les macrophages M1 sécrètent également des cytokines favorisant les réponses Th1 (IL-12), Th17 (IL-23) et l'inflammation (TNF- α et IL-6) ainsi que des chimiokines permettant de recruter d'autres cellules inflammatoires (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, IL-8, CCL9, CCL11)²⁸⁷. Ils expriment les molécules du CMH de classe I et II ainsi que des molécules

de co-stimulation (CD80-86). Ils sont ainsi capables de présenter l'antigène aux lymphocytes T et de les activer bien que moins efficacement que les cellules dendritiques. Les macrophages M1 participent donc à la défense contre les bactéries, les parasites intracellulaires mais aussi contre les tumeurs.

Les macrophages M2 sont associés à la réponse immunitaire de type Th2 mais peuvent être induits dans d'autres contextes. La catégorisation M2 est très générique et regroupe tous les macrophages qui ne sont pas activés de façon classique. Il a donc été proposé de subdiviser cette catégorie en plusieurs groupes (figure 11).

Les macrophages M2a sont induits par l'IL-4, l'IL-13 (produits lors de la réponse Th2 par les lymphocytes T, les mastocytes et les polynucléaires basophiles) et l'IL-21. Ils produisent de l'IL-10 favorisant la réponse Th2²⁸⁸.

- Ils sécrètent des chimiokines favorisant le recrutement de polynucléaires éosinophiles et basophiles et de lymphocytes Th2 (CCL17, CCL22, CCL24).
- Ils expriment l'arginase 1, enzyme catalysant l'hydrolyse de l'arginine en ornithine et en urée. En diminuant la quantité d'arginine disponible, cette enzyme bloque la production de NO par l'enzyme NOS2 (nitric oxyde synthase), réaction qui est en revanche favorisée dans les macrophages M1.
- Leur production d'IL-1Ra (antagoniste du récepteur de l'IL-1) et d'IL-1RII (récepteur leurre soluble de l'IL-1) leur permet de limiter l'inflammation²⁸⁷.
- Leur sécrétion de PDGF et de TGF- β (transforming growth factor) favorise la prolifération et la différenciation des fibroblastes et augmente la production de collagène.
- Parallèlement, les macrophages produisent des MMPs (comme MMP12) et des inhibiteurs de MMPs (comme TIMP1, tissue inhibitor of MMP) pour permettre une dégradation et un renouvellement contrôlé de la matrice extracellulaire²⁷⁷.

Les macrophages M2b sont activés par des ligands des TLRs comme le LPS, l'IL-1 β et les complexes immuns.

- Ils régulent la réponse Th2 via la production d'IL-10 et de CCL1 pour attirer les polynucléaires éosinophiles, les lymphocytes Th2 et Treg²⁸⁹.
- Ils produisent aussi des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α et favorisent la production d'IgG1.

Les macrophages M2c sont activés par le TGF-β, l'IL-10 et les glucocorticoïdes.

- Ils exercent des fonctions anti-inflammatoires et immunosuppressives via leur production d'IL-10 de CXCL13, CCL16 et CCL18. Cette dernière chimiokine leur permet de recruter des cellules immunosuppressives (DC et Treg) ainsi que des lymphocytes naïfs et des cellules dendritiques immatures pour favoriser leur polarisation vers un phénotype immunosuppresseur.

- De plus, ces cellules n'expriment pas de molécules de co-stimulation des lymphocytes T mais des molécules de co-répression comme PDL-2 (programmed cell death ligand)²⁷⁷.
- Ils favorisent également le remodelage et la réparation tissulaire via leur production de TGF- β^{289} .

Une grande variété de signaux peuvent induire la génération de macrophages M2 comme les prostaglandines, la mélanocortine, la dopamine, l'adiponectine, l'histamine, le VIP (vaso-active intestinal peptide), l'adénosine, le sphingosine 1-phosphate et les cellules apoptotiques²⁹⁰.



Figure 11 : Polarisation des macrophages (MEC : Matrice extracellulaire)

Après avoir été polarisés vers un phénotype particulier, les macrophages peuvent être repolarisés différemment. Ce processus est souvent observé dans la résolution de l'inflammation stérile. Par exemple, en cas de lésion musculaire, les cellules sont orientées vers un phénotype pro-inflammatoire pour favoriser la prolifération des cellules myogéniques. La phagocytose de débris et de cellules mortes polarise ensuite ces macrophages vers un phénotype anti-inflammatoire qui va favoriser la résolution de l'inflammation et la différenciation des myoblastes permettant la réparation de la lésion²⁹¹.

Les macrophages conservent donc une grande plasticité au cours de leur processus de différenciation et peuvent modifier leur phénotype en réponse aux changements affectant leur environnement. Il est également proposé que l'évolution du phénotype des macrophages au sein des tissus soit effectuée par le recrutement séquentiel de monocytes qui se différencieraient différemment au cours du temps. Les macrophages inflammatoires générés en premier lieu mourraient au cours de la phase inflammatoire et seraient progressivement remplacés par de nouveaux macrophages anti-inflammatoires²⁹².

Lorsque la polarisation des macrophages est dérégulée, on observe la prolongation d'un état inflammatoire ou immunosuppresseur inapproprié pouvant être à l'origine ou favoriser le développement d'une pathologie.

1.3.8.2 Classification des populations de macrophages in vivo

La classification M1/M2 des macrophages bien qu'utile et pertinente dans le cadre des réponses immunitaires Th1, Th2 et de la différenciation *in vitro*, est limitée pour la description des différentes populations de macrophages tissulaires présentes *in vivo* et les modifications de leur phénotype en conditions pathologiques. En réalité, il existe un continuum de phénotypes situés entre ces deux extrêmes.

Il semble plus pertinent de définir les macrophages selon les fonctions qu'ils exercent²⁹⁰ : inflammation et défense de l'hôte (M1), régulation de la réponse immune et enfin réparaton tissulaire. Les macrophages M1 sont effectivement assez bien définis avec un rôle précis tandis que les macrophages M2 regroupent les macrophages qui ne sont pas M1, désignant des cellules très différentes. Par exemple les macrophages régulateurs participent au contrôle de la réponse immunitaire mais n'ont que peu ou pas d'effet sur la production et le remodelage de la matrice extracellulaire. Certaines cellules produites *in vitro* et considérées comme M2 sont parfois plus proches des macrophages M1²⁹³ et présentent un phénotype intermédiaire.

La sous-classification en M2a, b et c permet d'avoir une désignation plus précise mais ne reflète pas totalement la complexité des phénotypes observés *in vivo* où les cellules peuvent présenter plusieurs phénotypes à la fois. Par exemple, les macrophages infiltrant les tumeurs ont à la fois des fonctions immunosuppressives et des fonctions de remodelage de la matrice extracellulaire et leur phénotype peut également évoluer au cours du temps et selon leur localisation au sein de la tumeur^{294,295}. En outre, l'analyse des transcriptomes des différentes populations de macrophages tissulaires chez la souris a montré que ces cellules étaient très différentes d'un point de vue transcriptionnel²⁹⁶ et régulées par différents facteurs de transcription (par exemple, GATA6 participe à l'autorenouvellement des macrophages du péritoine tandis que Spi-C intervient dans la maintenance des macrophages de la rate et leurs fonctions de recyclage du fer)¹¹¹. Les macrophages constituent une myriade de cellules individuelles, régulées finement par leur micro-environnement et présentant un spectre de fonctions qui leurs sont propres. L'étude de l'expression des gènes dans des macrophages différenciés *in vitro* par CSF-1 ou CSF-2 puis polarisés par différentes combinaisons de signaux montre que chaque stimulus génère un état transcriptionnel particulier. La classification M1/M2 regroupe des cellules transcriptionnellement proches mais pas identiques. L'exposition des cellules à d'autres stimuli moins conventionnels (HDL, acides gras libres) génère un profil d'expression encore différent, montrant les grandes capacités d'adaptation de ces cellules aux signaux auxquels elles sont exposées²⁹⁷.

1.3.8.3 Facteurs de transcription impliqués dans la différenciation puis la polarisation des macrophages

En aval de la signalisation des récepteurs de surface, de nombreux facteurs de transcription sont impliqués dans la différenciation des monocytes en macrophages

- Les principaux sont PU.1, EGR1 et 2, AP-1, les STATs, les IRFs, les PPARs (peroxisome proliferator-activated receptor), les membres de la famille C/EBP et KLF, NF-κB, HIF, GATA2 et cMAF. Lors de la différenciation des monocytes en macrophages, on observe une augmentation des gènes impliqués dans l'endocytose, la phagocytose et le métabolisme des lipides, des acides aminés et des stéroïdes^{298,299}.
- Beaucoup de facteurs de transcription sont ensuite régulés négativement (AP-1, IRFs, SMAD (SMA- and MAD-related protein), CEBP δ , AML-1 et 3, ELK3, FOXOs (forkhead box), KLFs, EGR1, ID1 (inhibitor of DNA binding), MAFF, HIF-1 α) indiquant qu'ils interviennent à certaines phases de la différenciation mais ne sont plus nécessaires par la suite.
- CSF-1 augmente rapidement (à 16h) puis diminue dans les jours suivants tandis que CSF-1R est régulé positivement.

Le contrôle de la polarisation M1 dépend des protéines de la famille IRF comme IRF1, IRF3, IRF5 et IRF7, d'AP-1 ainsi que STAT1 et STAT5.

- STAT1 est activé par l'IFN-γ, IRF3 et NF-κB en réponse à la stimulation des TLR et des NLR^{290,300,301}. STAT5 et IRF5 sont activés en réponse au CSF-2 et à l'IFN-β.
- IRF5 active la transcription des gènes de l'IL-12, l'IL-23 et du TNF- α et réprime parallèlement l'expression de l'IL-10³⁰².
- NF- κ B induit l'expression de gènes de l'inflammation (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, et la cyclo-oxygénase 2, enzyme responsable de la synthèse des prostanoïdes) et de HIF-1 $\alpha^{285,301,303}$.
- STAT1 et NF-κB induisent également l'expression de SOCS3 (suppressor of cytokine signaling) qui permet d'inactiver STAT3, un des médiateurs de la polarisation M2³⁰⁴.

- L'activation de ces différents facteurs de transcription aboutit à l'expression d'un panel de gènes "M1" pro-inflammatoires et réprime certains gènes "M2".

Les facteurs de transcription KLF4, STAT3, STAT6, HIF-2 α , PPAR- γ et PPAR- δ participent à la polarisation M2.

- L'exposition des cellules à l'IL-4 et l'IL-13 induit la phosphorylation de STAT6 et l'induction de KLF4. Ces deux protéines favorisent la transcription de PPAR- γ et de l'arginase et repriment l'expression de gènes M1 (iNOS, TNF- α) via l'inhibition de la voie NF- κ B et l'induction de SOCS1 qui inactive STAT1^{288,301}.
- Ces cytokines activent également c-MYC qui va lui aussi activer STAT6 et PPAR- $\gamma^{305}\!.$
- L'IL-10 active STAT3, c-MAF (qui va permettre la production d'IL-10) et la formation de dimères p50NF- κ B qui vont bloquer l'induction des gènes M1 NF- κ B dépendants³⁰⁶.
- L'activation de STAT3 va également inhiber la production de cytokines proinflammatoires et de NO en réponse au LPS³⁰⁷.

Les changements d'épissage et l'utilisation des miRNA sont des mécanismes supplémentaires pour moduler la différenciation et la polarisation des macrophages.

L'expression de nombreux miRNA est affectée lors de la différenciation et de la polarisation des macrophages. Ces miRNA sont liés à la régulation de gènes clés dans le processus de différenciation comme *CFMS*, *AML-1*, *PU.1*, *PPAR-α* et *PPAR-γ*. De plus, ces miRNA régulent des gènes impliqués dans les fonctions de phagocytose, d'extravasation et de réponse aux facteurs de croissance/stimuli exterieurs (IL-6, IL-8, LPS, HGF...)³⁰⁸. D'autres contribuent à la plasticité phénotypique des macrophages. miR-9, miR125b, miR-146 et miR155 sont induits par le LPS mais inhibent l'expression de protéines participant à la signalisation des TLR (*TRAF6* (TNF receptor-associated factor), *IRAK-1* (interleukin 1 receptor-associated kinase), *IKKε* (I-kappa-B kinase) et *TNF-α*)³⁰¹. MiR-155 a un rôle ambivalent puisque d'autres études ont montré qu'il pouvait aussi favoriser la polarisation M1 et inhiber la polarisation M2^{309,310}.

Lors de la différenciation des monocytes en macrophages, on observe un changement global de l'épissage des pré-ARNm, en particulier lors de la polarisation M1 (les macrophages M2 diffèrent peu des monocytes de ce point de vue). Cet épissage alternatif affecte en partie des gènes impliqués dans les fonctions des macrophages. Par exemple, dans les macrophages M1, il concerne des gènes liés à la réponse inflammatoire tandis que dans les macrophages M2, l'épissage alternatif est plus prépondérant sur les gènes du métabolisme³¹¹.

1.3.9 Origine des macrophages tissulaires et contribution des monocytes

Il a longtemps été admis que les macrophages tissulaires dérivaient de la différenciation de monocytes, recrutés dans la circulation, et permettant le renouvellement continu des macrophages présents dans les tissus. Plusieurs études ont

démontré ces dernières années que la quasi-totalité des populations de macrophages tissulaires était générée au cours du développement, par différents précurseurs, les macrophages étant capables d'auto-renouvellement à l'âge adulte^{312,313}.

Seuls les macrophages du derme³¹⁴, du coeur et de la lamina propria de l'intestin sont renouvelés à partir des monocytes sanguins en conditions homéostatiques³¹⁵. Dans le cas de l'intestin et du coeur, l'organe est d'abord colonisé par des macrophages d'origine embryonnaire mais qui ne persistent pas ou peu chez l'adulte et sont progressivement remplacés par des macrophages dérivés de monocytes (dans le coeur, les capacités d'autorenouvellement des macrophages résidents diminuent avec l'âge)³¹⁶.

Toutefois, en cas d'inflammation, et dans des conditions pathologiques (cancer, athérosclérose), on peut observer un recrutement des monocytes sanguins, par exemple au cours d'une inflammation du péritoine, bien que le devenir de ces cellules au sein des tissus soit encore peu exploré^{312,317,318}. Ces données, acquises chez la souris, semblent en partie valides chez l'homme. L'étude de monocytopénies congénitales ou acquises montrent que l'absence de monocytes n'affecte pas ou peu le nombre de macrophages tissulaires¹¹⁵, y compris les macrophages du derme³¹⁹.

Bien que la plupart des macrophages tissulaires soient générés au cours du développement, leur origine peut différer. Les cellules microgliales dérivent des progéniteurs érythromyéloïdes foetaux du sac vitellin²⁷⁰ grâce au facteur de transcription PU.1. Les autres macrophages proviennent des cellules souches hématopoïétiques définitives localisées au niveau de la région AGM puis du foie foetal et dépendent du facteur de transcription MYB (myeloblastosis)^{320,321}. Les cellules de Langherans et de Küpffer proviendraient à la fois des progéniteurs du sac vitellin et des cellules souches hématopoïétiques.

Les macrophages tissulaires sont donc générés essentiellement au cours du développement maintiennent l'adulte et se chez via leurs capacités d'autorenouvellement. In vivo, la prolifération des macrophages est inhibée par MAF-B et c-MAF. Ces deux protéines contrôlent l'expression d'un ensemble de gènes impliqués dans l'autorenouvellement via la répression d'enhancers spécifiquement utilisés par les macrophages (et donc différents de ceux utilisés par les cellules souches)³²². Ces protéines peuvent être transitoirement inhibées permettant l'activation des gènes d'autorenouvellement et la prolifération des macrophages grâce à KLF4 et c-MYC³²³ ou GATA6 pour les macrophages péritonéaux¹¹¹. L'autorenouvellement des macrophages alvéolaires et péritonéaux est aussi contrôlé par SIRT1 qui favorise l'expression des cibles de c-MYC et de E2F1 tout en réprimant celles de FOXO1³²⁴. La prolifération des macrophages peut être stimulée par des cytokines comme l'IL-4, produite en cas d'infection parasitaire³²⁵.

1.3.10 Polarisation pathologique des macrophages

La polarisation des macrophages est un processus finement régulé et impliqué dans le développement des réponses immunitaires (Th1, Th2 et Treg), de la réaction inflammatoire, de la réparation tissulaire et dans le maintien de l'homéostasie. La dérégulation de ce processus peut conduire au développement de nombreuses maladies, inflammatoires, auto-immunes ou cancéreuses. La polarisation anormale des macrophages peut être à l'origine de la pathologie, accompagner son développement ou en être la manifestation.

1.3.10.1 Polarisation des macrophages et pathologies inflammatoires

Les macrophages peuvent adopter un phénotype inflammatoire ou antiinflammatoire selon leur micro-environnement. Plusieurs pathologies inflammatoires ont été associées à un excès de macrophages M1 au détriment des macrophages M2.

Les macrophages du tissu adipeux présentent à l'état physiologique un phénotype M2 et sécrètent de l'IL-10 afin de sensibiliser les adipocytes à l'insuline. En cas d'obésité, des monocytes sont recrutés via CCR2 et se différencient en macrophages inflammatoires producteurs de TNF- α et de NO, favorisant le développement d'une résistance à l'insuline des adipocytes²⁷⁹. La présence d'acides gras saturés contribue à la reprogrammation des macrophages du tissu adipeux vers un phénotype pro-inflammatoire M1³²⁶. Des macrophages inflammatoires sont également recrutés dans le pancréas où leur production d'IL-1 β et de TNF- α endommage les ilôts béta et diminue leur sécrétion d'insuline, contribuant au développement d'un diabète³²⁷.

En cas d'infarctus, la déplétion des macrophages M2 accompagnée d'une augmentation des macrophages M1 via l'utilisation d'un inhibiteur de CSF-1R compromet la réparation tissulaire (baisse de la production de collagène). Les macrophages M1 recrutent d'autres cellules inflammatoires, ce qui aboutit à une aggravation de la pathologie³²⁸.

Au niveau du poumon, les macrophages physiologiques sont plutôt polarisés M1 et dépendent du CSF-2. Ils sont impliqués dans la résorbtion de l'excès de surfactant¹⁰¹. Dans l'asthme en revanche, on oberve un excès de macrophages polarisés M2, induits par le développement d'une réponse Th2 anormale contre des allergènes. Ces macrophages favorisent à leur tour la production de cytokines Th2 par les lymphocytes T CD4⁺, augmentant le recrutement de polynucléaires éosinophiles, basophiles et la polarisation M2 des macrophages³²⁹.

Au cours de l'athérosclérose, les monocytes sont recrutés dans la paroi de l'artère où ils se différencient en macrophages. Ils phagocytent les lipoprotéines en excès et finissent par mourir, libérant les lipides oxydés dans le mileu extracellulaire. L'accumulation des cellules mortes et des lipides forment le coeur nécrotique de la plaque. La polarisation M2 diminue la formation des plaques d'athérome en limitant le développement de l'inflammation tandis que les macrophages M1 favorisent la croissance des plaques via la production de médiateurs inflammatoires. Ces deux populations co-existent néanmoins au sein de la plaque avec des localisations différentes. Les monocytes entrant dans la plaque sont exposés à une combinaison de signaux pro-M1 et pro-M2 complexifiant leur phénotype³¹⁸.

L'évaluation et la compréhension du phénotype des macrophages pathologiques *in vivo* sont complexes et pas toujours expliquées par les expériences menées *in vitro*.

1.3.10.2 Polarisation des macrophages et pathologies auto-immunes

Les macrophages sont impliqués dans plusieurs maladies auto-immunes comme l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn ou la sclérose en plaque. La production de certaines cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-12, l'IL-18 et l'IL-23 peut favoriser le développement d'une réponse auto-immune.

Les macrophages intestinaux favorisent le maintien d'un environnement antiinflammatoire²⁷⁶. Dans la maladie de Crohn, on observe une augmentation d'une population de macrophages pro-inflammatoires (production de TNF- α , d'IL-6 et d'IL-23) qui favorisent la sécrétion d'IFN- γ par les cellules de la lamina propria et le maintien d'un état inflammatoire permanent³³⁰. En cas d'inflammation de l'intestin, les macrophages inflammatoires seraient recrutés à partir des monocytes sanguins via CCR2³³¹.

Dans l'arthrite rhumatoïde, des monocytes et des macrophages inflammatoires sont recrutés dans l'articulation par CSF-1. Leur production de TNF- α , d'IL-12 et d'IL-18 maintient un environnement inflammatoire favorable aux réactions auto-immunes. Ces cytokines augmentent le recrutement ainsi que l'activation des fibroblastes et des ostéoclastes responsables de la destruction osseuse³³²⁻³³⁴.

Dans la sclérose en plaque, l'activation anormale des cellules microgliales participe à la co-activation des lymphocytes T autologues et à la démyélinisation³³⁵.

Toutefois, le rôle exact des macrophages dans ces pathologies reste à définir. D'autres études ont montré qu'ils pouvaient freiner leur développement. En cas d'inflammation de l'intestin, les macrophages produisent de l'IL-10 pour favoriser les réponses T régulatrices²⁷⁶. Dans l'arthrite rhumatoïde, leur production de ROS réduit la prolifération des lymphocytes T et oriente leur polarisation vers un phénotype Th2, diminuant ainsi la sécrétion d'IFN- γ^{336} . Enfin, dans un modèle murin de sclérose en plaque, le recrutement et la différenciation de monocytes dans le système nerveux central favorise l'activation des lymphocytes T par la présentation de l'antigène. Par, la suite, la production de TNF- α , d'IFN- γ et de CSF-2 par les lymphocytes activés augmente la sécrétion de NO par les macrophages, entraînant l'apoptose des lymphocytes T³³⁷. *In vivo*, il est probable que les différentes populations de macrophages co-existent et exercent des fonctions opposées sur le développement de la maladie. Le déclenchement de la pathologie serait lié à la prédominance d'une population sur l'autre.

1.3.10.3 Polarisation des macrophages et fibrose

Les macrophages sont capables de favoriser la réparation tissulaire en activant la différenciation et la production de collagène des fibroblastes, via la sécrétion de TGF- β , de PDGF et d'IGF-1. Ils régulent également le remodelage la matrice extracellulaire en contrôlant la balance entre les MMPs et leurs inhibiteurs³³⁸. Enfin ils participent au développement des vaisseaux en produisant des facteurs pro-angiogéniques³³⁹.

Cependant, lorsque la conversion des macrophages pro-inflammatoires en macrophages réparateurs et suppresseurs ne s'effectue pas correctement, une inflammation pathologique persiste et favorise le développement de la fibrose³⁴⁰.

- Dans la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine, les macrophages produisent de l'IL-1 β contribuant au développement d'une réponse Th17 anormale, responsable de la fibrose^{341,342}.

 Dans la fibrose hépatique, la déplétion des macrophages une fois la fibrose établie diminue l'inflammation et réduit la fibrose. En revanche l'élimination des macrophages au moment de l'initiation de la cicatrisation a des effets délétères en inhibant le remodelage de la matrice³⁴³.

1.3.10.4 Polarisation des macrophage et cancer

A l'heure actuelle, un des principaux enjeux en cancérologie est la compréhension du micro-environnement tumoral et des mécanismes lui permettant de soutenir ou non la croissance des cellules tumorales. Ce micro-environnement comporte très fréquemment des cellules du système immunitaire comme des lymphocytes T, des cellules myéloïdes immatures ou des macrophages.

Plusieurs études démontrent un effet globalement néfaste des macrophages associés aux tumeurs (TAM). La présence de ces cellules est associée à un moins bon pronostic (cancer du sein, de l'ovaire, de la vessie, de la thyroïde, ORL, cancer gastrique³⁴⁴, carcinome rénal³⁴⁵, lymphome de hodgkin³⁴⁶, gliome¹⁷⁹, tumeurs neuro-endocrines du pancréas³⁴⁷) et à un stade tumoral plus avancé (cancer du sein et de la vessie)³⁴⁴.

Dans le cancer du côlon en revanche, les TAMs sont de bon pronostic et activent la réponse Th1 anti-tumorale via la production d'IFN- γ , d'IL-1 et d'IL-6³⁴⁸.

Les macrophages tumoraux favorisent le développement de la tumeur par plusieurs mécanismes (figure 12).

- Ils produisent des facteurs de croissance (EGF, FGF, PDGF, TGF- β) stimulant la prolifération et la survie des cellules tumorales¹⁸⁰ et l'angiogénèse (VEGF)³⁴⁹.
- Ils favorisent également la migration des cellules endothéliales en produisant de la thymidine phosphorylase³⁵⁰.
- En induisant le remodelage de la matrice extracellulaire par la sécrétion de MMPs et d'autres protéases, les TAMs facilitent aussi la migration des cellules tumorales et la formation de métastases^{351,352}.
- Les macrophages assurent ainsi le switch angiogénique qui permet l'évolution des tumeurs naissantes vers un stade malin³⁵³ et sont correlés au grade vasculaire de certaines tumeurs (carcinome de l'oesophage³⁵⁴ et gliome³⁵⁵).
- D'autre part, les TAMs contribuent au développement d'un micro-environnement tolérogène en produisant des cytokines immuno-modulatrices comme l'IL-10¹⁸² et des chimiokines permettant le recrutement de lymphocytes T régulateurs et Th2 (CCL17 et CCL22) au détriment de lymphocytes Th1 et cytotoxiques qui sont antitumoraux^{183,356}.
- Via leur expression de PDL-1 et de PDL-2, les TAMs sont directement impliqués dans l'inhibition des réponses T anti-tumorales³⁵⁷⁻³⁵⁹.

- Les TAMs produisent également du CSF-1 et du CCL2 qui permettent le recrutement et la différenciation de monocytes circulants en TAM³⁵⁶.



Figure 12 : Fonctions pro-tumorales des macrophages associés aux tumeurs (CTL : Lymphocyte T cytotoxique, MEC : matrice extracellulaire)

La plupart des TAMs dérivent de monocytes sanguins recrutés par la tumeur, grâce à CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, IL-8, CXCL8, CXCL12 et CSF-1^{287,317,354,356}. Ces cytokines sont produites par les cellules tumorales ou par celles de leur environnement comme les fibroblastes ou les macrophages. La quantité de CCL2 corrèle avec le nombre de TAMs et est de mauvais pronostic. Le ciblage de CCR2 (élimination des cellules CCR2⁺ ou croisement avec un modèle CCR2^{-/- 317,360,361}) diminue le nombre de TAMs présents dans la tumeur.

Après leur recrutement au sein de la tumeur, les monocytes sont exposés à un micro-environnement favorisant leur différenciation et leur polarisation en macrophages M2 (IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β)²⁸⁷. La présence de CSF-1, d'IL-6, d'IL-10, de LIF et de VEGF induit la différenciation des monocytes en macrophages plutôt qu'en cellules dendritiques³⁶². De plus, les cellules tumorales inhibent directement la

phagocytose et les fonctions anti-tumorales des macrophages via une interaction PDL-1/PD-1 et peuvent induire l'expression de PDL-1 sur les macrophages³⁶³.

Bien que les macrophages tumoraux semblent présenter un phénotype M2 (expression du CD163¹⁸², production d'IL-10, de MMPs, de VEGF...), leur signature transcriptionnelle et leur phénotype sont différents de ceux des macrophages M2 générés *in vitro*^{317,362}. Les macrophages tumoraux sont également hétérogènes au sein de la tumeur.

- Dans le lymphome de hodgkin, tous les macrophages CSF-1R⁺ n'expriment pas CD163³⁶⁴ indiquant l'existence d'au moins deux populations différentes.
- Dans le carcinome hépatocellulaire, les macrophages localisés au coeur de la tumeur induisent des réponses T régulatrices. En revanche, en périphérie, ils favorisent plutôt des réponses inflammatoires Th17, au détriment des réponses Th1, pour augmenter le remodelage tissulaire et l'angiogénèse²⁹⁵.
- Le phénotype des TAMs évoluerait aussi en fonction du stade de développement de la tumeur. Certains cancers apparaissent à la suite d'irritations, d'inflammations ou d'infections chroniques. Lors de l'initiation du processus tumoral, les macrophages seraient pro-inflammatoires ce qui favoriserait la croissance tumorale et l'instabilité génétique³⁶⁵. Une fois la tumeur établie, les macrophages adopteraient un phénotype immunosuppresseur et favorisant l'angiogénèse et le remodelage tissulaire²⁹⁴.

La forte implication des TAMs dans la tumorigénèse en a fait des cibles thérapeutiques intéressantes pour augmenter l'efficacité des traitements existants. La repolarisation des TAMs vers un phénotype M1 favorise les réponses Th1 et augmente les réponses CD8 anti-tumorales, limitant la croissance tumorale et la formation de métastases³⁶⁶. Il est également possible d'éliminer les TAMs pré-existants ou d'empêcher leur recrutement en ciblant CCL2 et/ou CSF-1³⁶⁷.

1.3.10.5 Ciblage des TAMs via CSF-1/CSF-1R

Plusieurs stratégies ciblant CSF-1 et CSF-1R ont été développées dans le but d'éliminer les TAMs en les privant d'un facteur de survie et/ou d'empêcher leur recrutement et leur différenciation en cellules immuno-inhibitrices.

De nombreuses études ont montré l'implication de CSF-1 et CSF-1R dans le recrutement des TAMs dans différents types de tumeurs^{368–372}. L'utilisation d'anticorps bloquant ou d'inhibiteurs de l'activité kinase de CSF-1R aboutissent à la réduction du nombre de TAMs dans des modèles de cancer du sein³⁶⁸, de mélanome, de cancer de la thyroïde³⁷¹ et chez l'homme dans les tumeurs osseuses à cellules géantes¹⁷⁸. Ces traitements diminuent également la croissance tumorale^{368,373}, l'angiogénèse³⁷⁴, l'invasion, le nombre de cellules initiant les tumeurs³⁶¹ et la formation de métastases³⁷⁴. Les traitements ciblant CSF-1R modifient aussi le phénotype des macrophages résiduels en les orientant vers une polarisation M1 (augmentation de l'expression du CMH-II^{375,376} et de la phagocytose, diminution de l'expression de gènes M2 comme EGR2, CD163 ou l'IL-10^{371,373} ce qui aboutit à l'augmentation de la réponse T anti-tumorale¹⁸³).

L'utilisation de ces traitements en monothérapie semble avoir un effet limité^{178,377,378}. En revanche, la combinaison des anti-CSF-1R avec d'autres approches thérapeutiques semble plus prometteuse. Ces traitements augmentent l'efficacité de la radiothérapie³⁷⁰ et de la chimiothérapie dans le cancer du sein¹⁸³ et le cancer du pancréas³⁶¹, ainsi que du traitement ciblé anti-BRAF dans le mélanome³⁷¹. De plus la combinaison d'anti-CSF-1R avec des anti-angiogéniques prévient le développement d'une résistance secondaire dans des tumeurs pulmonaires et de la prostate³⁷². Enfin, l'effet majeur de ces traitements sur la polarisation des macrophages et le développement d'une réponse T anti-tumorale a motivé leur association avec les anticorps anti-checkpoint immunitaire.

Dans le cancer du pancréas, CSF-1R seul est insuffisant pour l'induction d'une réponse anti-tumorale efficace du fait de l'expression de PDL-1 sur la tumeur et de CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated) sur les lymphocytes T. Les anti-checkpoints immunitaires utilisés seuls sont également peu efficaces. La combinaison de ces deux approches permet l'élimination des TAMs polarisés M2 et l'induction d'une réponse T efficace, potentialisant les effets des deux traitements³⁵⁸.

Le ciblage des TAMs via l'inhibition de l'axe CSF-1/CSF-1R est une stratégie prometteuse pour renforcer l'effet des thérapies conventionnelles et de l'immunothérapie des checkpoints. De nombreux essais sont actuellement menés chez l'homme (tableau 4) et pourraient aboutir à la validation d'une nouvelle voie immunothérapeutique ciblant les macrophages.

Anti-CSF-1R	Combinaison	Type de cancer	Phase
Pexidartinib (TKI)	Anti-PDL-1 (Ac)	Colorectal/pancréatique	I
LY3022855 (Ac)	Anti-PDL-1 (Ac) ou Anti-CTLA-4 (Ac)	Tumeurs solides	I
LY3022855 (Ac)	Cyclophosphamide + Anti-PD1 (Ac) + vaccin anti-cancéreux	Pancréatique	Ι
PLX3397 (TKI)	Anti-PD1 (Ac)	Mélanome, pulmonaire non à petites cellules,carcinome de la tête et du cou, ovaire, GIST	1/11
LY3022855 (Ac)		Tumeurs solides	I
DCC-3014 (TKI)		Tumeurs	I
FPA008 (Ac)	Anti-PD1 (Ac)	Tumeurs solides	I
Chiauranib (TKI)		Carcinome hépatocellulaire	I
Chiauranib (TKI)		Pulmonaire à petites cellules	I
SNDX-6352 (Ac)		Tumeurs solides	I
Chiauranib (TKI)		Lymphome non hodgkinien	I
Chiauranib (TKI)		Ovaire	1/11
FPA008 (Ac)		Tumeur à cellules géantes et synovite villonodulaire pigmentée	1/11
LY3022855 (Ac)	BRAF/MEK (TKI)	Mélanome	1/11
BLZ945 (TKI)	Monothérapie ou en combinaison avec anti-PD1 (Ac)	Tumeurs solides	1/11
PLX3397 (TKI)		Tumeur à cellules géantes et synovite villonodulaire pigmentée	III
RO5509554 (Ac)	Monothérapie ou en combinaison avec Paclitaxel	Tumeurs solides	Ι

Tableau 4 (d'après clinicaltrials.gov)

<u>En résumé</u> :

- Les monocytes sont des cellules plastiques capables de se différencier en macrophages, en cellules dendritiques et en ostéoclastes.

- Il existe trois sous-populations de monocytes représentant différentes étapes de maturation. CSF-1 et CSF-1R sont très probablement impliqués dans la génération de ces populations.

- CSF-1 participe à la génération des macrophages tissulaires qui sont presque exclusivement produits au cours du développement. Les monocytes participent au renouvellement des macrophages tissulaires de l'intestin, du coeur et du derme et en cas d'inflammation.

- Les macrophages sont classés en deux catégories, M1 ou M2 selon leur phénotype proinflammatoire ou anti-inflammatoire respectivement. CSF-1 différencie les monocytes en macrophages qui sont orientés vers le phénotype M2.

- La polarisation anormale des macrophages est impliquée dans le développement de pathologies inflammatoires, auto-immunes, cancéreuses et de la fibrose. CSF-1 participe au développement des macrophages infiltrant les tumeurs, qui ont une activité protumorale.

- Des traitements ciblant CSF-1R afin d'éliminer les TAMs ou de les repolariser vers un phénotype anti-tumoral sont actuellement à l'essai chez l'homme, seuls ou en combinaison avec les immunothérapies des checkpoints.

2 Résultats

2.1 Article : Dynamic gene regulation by nuclear CSF-1R in human monocytes and macrophages

CSF-1R est impliqué dans la différenciation et la polarisation des monocytes en macrophages. Sa localisation nucléaire a été démontrée dans des lignées et tumeurs primaires humaines ainsi que dans des macrophages murins, mais pas dans les monocytes et les macrophages humains. Notre premier objectif a été de déterminer si CSF-1R était exprimé dans le noyau de ces cellules.

Différentes techniques ont été utilisées dans le but de mettre en évidence une localisation nucléaire de CSF-1R dans les monocytes humains isolés à partir du sang de donneurs sains : microscopie confocale, microscopie électronique, séparation des compartiments cellulaires suivie d'immuno-empreinte, et imagerie en flux. Toutes ces méthodes ont démontré une localisation nucléaire de CSF-1R dans les monocytes humains.

Afin d'explorer les mécanismes impliqués dans la translocation nucléaire de CSF-1R, nous avons utilisé un CSF-1 rendu fluorescent afin de rechercher une cotranslocation du récepteur et de son ligand de la membrane vers le noyau. Des inhibiteurs de l'activité kinase de CSF-1R et de l'export nucléaire ont été employés pour évaluer s'ils pouvaient modifier cette localisation. CSF-1R étant capable d'interagir avec la chromatine dans d'autres contextes cellulaires, nous avons voulu déterminer si cette interaction était possible dans les monocytes. Des expériences de ChIP-seq ont permis d'identifier les sites de recrutement du récepteur sur la chromatine ainsi que ses potentiels interacteurs via une analyse des motifs de recrutement. L'interaction du récepteur avec ses partenaires potentiels a pu être démontrée par coimmunoprécipitation. Certains sites cibles de CSF-1R ont été clonés en amont d'un gène rapporteur afin d'évaluer l'activité de co-régulation de la transcription du récepteur. Toutes ces expérimentations ont également été menées sur des monocytes stimulés par CSF-1 et dans des monocytes leucémiques issus de patients atteints de LMMC pour déterminer si la localisation nucléaire de CSF-1R était modifiée lors de la différenciation et en condition pathologique.

Ces travaux ont mis en évidence les éléments suivants :

Dans les monocytes :

- CSF-1R est localisé dans le noyau des monocytes, sous forme d'holorécepteur monomérique.

- La translocation de CSF-1R vers le noyau s'effectue avec son ligand CSF-1 et dépend de l'activation du récepteur.

- La stimulation des cellules par CSF-1 n'augmente pas la quantité de CSF-1R dans le noyau.

- La quantité CSF-1R dans le noyau est régulée par export nucléaire dépendant de CRM1.

- CSF-1R est recruté sur la chromatine, principalement au niveau des régions intergénique et intronique et colocalise en partie avec la marque H3K4me1.

- CSF-1R cible des gènes impliqués dans la morphogénèse, la formation des tissus (dont le tissu osseux) et la différenciation cellulaire.

- CSF-1R intéragit avec le facteur de transcription EGR1 et exerce un rôle de corépresseur transcriptionnel.

Dans les macrophages :

- La localisation nucléaire de CSF-1R persiste lors de la différenciation des monocytes en macrophages induite par CSF-1.

- CSF-1R est relocalisé dans les régions promotrice, exonique et 5'UTR et colocalise avec la marque H3K4me3.

- CSF-1R cible d'autres gènes impliqués dans la signalisation des récepteurs Fc, la phagocytose et la réponse cellulaire au stress.

- CSF-1R interagit avec d'autres facteurs de transcription comme YY1 (yin yang 1) et ELK1 pour exercer un rôle de co-activateur transcriptionnel.

- Une stimulation de 6h par CSF-1 est suffisante pour induire une relocalisation de CSF-1R au niveau des promoteurs et de la marque H3K4me3. La localisation de CSF-1R sur la chromatine est cependant différente de celle des macrophages différenciés.

Dans la LMMC :

- L'expression globale de CSF-1R est plus faible que dans les monocytes de donneurs sains.

- Lorsqu'il est suffisamment exprimé, CSF-1R est présent dans le noyau où il cible d'autres gènes.

Article

Dynamic gene regulation by nuclear CSF-1R in human monocytes and macrophages

Laura Bencheikh, Khadija Diop M'Boyba, Julie Rivière, Gérard Pierron, Sylvie Souquere, Audrey Naimo, Margot Morabito, Michaël Dussiot, Frédéric De Leeuw, Eric Solary, Nathalie Droin

In preparation

Abstract

Beside their location at the cell surface, several receptor tyrosine kinases (RTK) are also in the nucleus as either intracellular domains or full length proteins. Their nuclear functions remain controversial. We demonstrate that a fraction of full length Colony-Stimulating Factor 1 Receptor (CSF-1R), an RTK involved in monocyte/macrophage generation, migrates in the nucleus of human primary monocytes upon exposure to CSF-1. Chromatin-immunoprecipitation identifies CSF-1R recruitment to intergenic and intronic regions, where it co-localizes with H3K4me1 and interacts with the transcription factor EGR1 to decrease gene expression. When monocytes are differentiated into macrophages with CSF-1, CSF-1R is redirected to transcription starting sites, colocalizes with H3K4me3 and interacts with ELK and YY1 transcription factors. CSF-1R expression and chromatin recruitement is modulated by small molecule CSF-1R inhibitors and altered in monocytes from chronic myelomonocytic leukemia patients. Unraveling this dynamic non-canonical CSF-1R function suggests new avenues to explore poorly understood functions of the receptor and its ligands.

Introduction

Receptor tyrosine kinases (RTK) constitute the largest family of catalytic receptors with 58 members¹. Upon stimulation, RTKs undergo homo- or hetero-oligomers formation required for cytoplasmic catalytic domain auto-phosphorylation. In turn, multiple signaling pathways are activated and relay information from the cell membrane to intracellular compartments to trigger critical cellular processes¹. Beside this canonical mode of signaling, several RTKs are also present in the cell nucleus as either intracellular domains (ICD), or full length proteins^{3,379}. ICD are generated by proteolytic cleavage or alternative mRNA splicing³. Full length RTKs usually translocate from the cell surface to the nucleus through Golgi apparatus and endoplasmic reticulum²⁸ before nuclear addressing through importin β -mediated pathways³⁸⁰. In the nucleus, RTKs phosphorylate proteins^{54,71} and regulate gene transcription⁷¹ to modulate DNA damage response⁵⁴, cell proliferation⁷¹, survival³⁸¹, and migration³⁸². Therapeutic strategies targeting RTKs were developed, mostly to treat cancers, and RTKs nuclear accumulation may decrease their efficacy³⁸³.

Colony-Stimulating Factor 1 Receptor (CSF-1R), also called M-CSFR (Macrophage colony-stimulating factor) is a class III RTK expressed by phagocytic mononuclear cells³⁸⁴. CSF-1R is involved in several human diseases, its constitutive inactivating mutation induces a leuko-encephalopathy while its stimulation supports tumor progression and chronic inflammatory diseases. CSF-1R-targeting strategies are currently tested clinically in treating tumor infiltrated with macrophages³⁶⁷.

Upon binding of either Colony-Stimulating Factor 1 (CSF-1) or interleukin (IL)-34⁹⁸, its two known ligands, CSF-1R undergoes oligomerization, relieving catalytic domain inhibition⁸⁶ and activating signal transduction^{154,159}, which is subsequently attenuated by CSF-1R ubiquitinylation, internalization and degradation¹⁶⁹. CSF-1R proteolytic cleavage generating an ICD with a short half-life that migrates in the nucleus was initially reported⁶³. Holoreceptor nuclear localization was subsequently described in human epithelial cancer cell lines⁷⁰ and murine macrophages⁶⁹, where CSF-1R was phosphorylated⁶⁹ and binds the promoter of selected genes⁷⁰. Little is known however about nuclear CSF-1R functional importance in physiological and pathological conditions.

Here, we demonstrate that a fraction of CSF-1R is in the nucleus of human monocytes, is recruited to DNA, co-localizes with H3K4me1 histone marks and interacts with EGR1 to negatively regulate gene expression. Upon CSF-1 exposure, inducing monocyte differentiation into macrophages, CSF-1R moves on chromatin within a few hours, colocalizes with H3K4me3, and promotes gene expression through interaction with transcription factors YY1 and ELK. This function is affected by small molecule CSF-1R inhibitors and altered in dysplastic monocytes collected from patients with a chronic myelomonocytic leukemia (CMML). These results emphasize a dynamic role of nuclear CSF-1R in monocyte differentiation into macrophages.

Materials and methods

Antibodies

For immunofluorescence, imaging cytometry and electron microscopy experiments, we used anti-CSF-1R antibodies (sc-692, sc-365719) and corresponding isotype controls (normal rabbit IgG sc-2027, normal mouse IgG sc-2025) from Santa Cruz Biotechnology (Clinisciences, Nanterre, France). Secondary antibodies (Alexa Fluor 488 goat anti-Rabbit) were purchased at ThermoFisher Scientific (Waltham, USA) and at TEBU-Bio (Le Perray-en-Yvelines, France, goat anti-rabbit and anti-mouse with gold particles). For immunoblot experiments, we used Cell Signaling Technology (Clinisciences, Nanterre, France) antibodies : anti-CSF-1R (#3152), anti-YY1 (#2185), anti-HDAC2 (#2540), anti-RCAS1 (#12290), anti-αTUBULIN (#3873); Santa Cruz Biotechnology antibodies : anti-GAPDH (sc-32233), anti-CALNEXIN (sc-11397), anti-EGR1 (sc-110), anti-LAMIN B (sc-6217); anti-ACTIN (A5441) from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) and anti-H3K4me3 from Active Motif (39159) (La Hulpe, Belgium). Secondary antibodies were purchased at ThermoFisher Scientific (anti-rabbit, anti-mouse and anti-goat HRPconjugated). For immunoprecipitation experiments, we used anti-CSF-1R (sc-365719), anti-ELK1 (sc-365876) or control Mouse IgG (sc-2025) from Santa Cruz Biotechnology. For ChIP-gPCR and ChIP-seg experiments we used two anti-CSF-1R antibodies (sc-692 and sc-46662), EGR1 antibody (sc-110X), corresponding isotype controls (normal rabbit IgG sc-2027, normal mouse IgG sc-2025) from Santa Cruz Biotechnology, anti-H3K4me3 and H3K4me1 from Active Motif (39159 and 39297 respectively).

Chemical inhibitors of CSF-1R were purchased at Interchim (BLZ945, ThermoFisher Scientific) and Sigma-Aldrich (GW2580).

Monocyte sorting and culture

Peripheral blood mononucleated cells (PBMC) were obtained from healthy donor buffy coats (Etablissement Français du sang, Rungis, France) or CMML whole blood, separated on Pancoll (Pan-Biotech, Dutscher, Brumath, France). Peripheral blood CD14⁺ monocytes were sorted with magnetic beads and the AutoMacs system (Miltenyi Biotech, Paris, France)³⁸⁵. Monocytes used for nucleofection experiments were sorted with Monocyte isolation kit II (Miltenyi Biotech). After sorting, monocytes were cultured overnight at 10⁶/mL in RPMI 1640 Glutamax medium (ThermoFisher Scientific) supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS, Lonza, Amboise, France), 1% penicillin/streptomycin and 2mM L-Glutamine (ThermoFisher Scientific). Cells were then seeded at 0.5.10⁶/mL and differentiated into macrophages in the same medium containing recombinant human CSF-1 (100ng/mL Peprotech, Neuilly-Sur-Seine, France) during 1 to 3 days. Cells were detached using PBS-EDTA and centrifuged at 300g into dry pellets for further RNA or protein extraction.

Confocal microscopy

150.10³ monocytes were cytospined 5 min at 65g then fixed 10 min with 4% paraformaldehyde (PFA). For adherent macrophages cultured in chamber slides (Nunc Lab-Tek II, ThermoFisher Scientific), the medium was removed and the cells directly

fixed with PFA on the slide. After 3 washes in PBS, cells were incubated with anti-CSF-1R antibody ($2\mu g/mL$) or isotype control ($2\mu g/mL$ rabbit IgG) and with blocking peptide if necessary (sc-692P at $2\mu g/mL$, Santa Cruz Biotechnology) diluted in 0.05% saponin during 1 hour at room temperature (RT), followed by wash. The secondary antibody was added ($10\mu g/mL$) with 0.05% saponin during 30 min followed by wash. Slides were mounted using Vectashield mounting medium with Dapi (Vectorlabs, Clinisciences). Specimens were examined on Leica confocal microscopes (TCS SPE and SP8, Leica Microsystems, Nanterre, France). The nuclear CSF-1R fluorescence was quantified using ImageJ software. The nucleus areas were selected in each cell using Dapi staining before measuring the mean intensity of CSF-1R fluorescence inside each nucleus with ROI manager.

CSF-1 chemical modification

Human recombinant CSF-1 (Peprotech) was coupled with Alexa Fluor 488 using the Alexa fluor 488 Microscale Protein Labeling Kit (ThermoFisher Scientific) according to the supplier instructions.

Electron microscopy

Cells were centrifuged 5 min at 200g and the pellet fixed with 1.6% glutaraldehyde (Fluka Chemie, Sigma-Aldrich) in PBS during 1 hour at 4°C. Pieces of pellets were then dehydrated in increasing concentrations of methanol prior to Lowicryl K4M embedding under UV illumination at -20°C. Grids bearing thin-sections of cells were first placed for 2 min over drops of BSA (5% in PBS) in order to prevent background. They were then floated for 1 hour, at RT, on primary CSF-1R antibodies diluted 1/10 in PBT (PBT= 1X PBS + 1% BSA + 0,25% triton X-100). After 5 min washing on three drops of PBS, the grids were incubated for 30 min over drops of secondary antibodies, anti-IgG, conjugated to 10 nm gold particles, dilution 1/25 in PBS. After 3 passages on three drops of PBS, the grids were rapidly rinsed in a jet distilled water, air dried, and stained for 5 min with 4% aqueous uranyl acetate, prior to observation with a Tecnai 12 electron microscope (FEI, Hillsboro, USA). Digital images were taken with a SIS MegaviewIII charge-coupled device camera (Olympus, Rungis, France).

Imaging cytometry

Two to 10.10^5 cells were fixed with 4% PFA for 10 min at 4°C, washed with 0.05% saponin and incubated 1h at 4°C with primary CSF-1R antibody or control isotype diluted in 0.05% saponin. After washing, cells were incubated with a secondary antibody (goat anti-rabbit AF488, $20\mu g/mL$) diluted in 0.05% saponin for 1h at 4°C, washed, and resuspended in 2% FBS-PBS before adding 200ng/mL Dapi (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). Samples were analysed on ImageStream X MK2. Focused cells were selected using Gradient RMS function and analysis was performed on singulet CSF-1R⁺/Dapi⁺ cells.

Cell fractionation and protein extraction

For extracting the cytoplasmic/membrane and the nuclear fractions, cells were incubated 15 min on ice in a buffer containing 10mM HEPES, 10mM KCl, 0.1mM EDTA, 0.1mM EGTA, 1mM DTT, 0.5mM PMSF (Buffer 1). NP-40 (0.625%) was added and the

cells briefly vortexed. Samples were then centrifuged 1 min at 16,000g at 4°C. The supernatant (constiting of cytoplasmic plus membrane fraction) was collected and the pellet rinced with Buffer 1 3 times (centrifugation 1min at 16,000g and supernatant discarded). The rinced pellets (consisting of the nuclear fraction) were resuspended in 2X Laemmli sample buffer (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) supplemented with 0.1M DTT and 1X Protease inhibitor cocktail (Roche) during 15 min with agitation at 4°C. 4X Laemmli sample buffer (Bio-Rad) supplemented with 0.1M DTT was added to the cytoplasmic fraction and all the samples were then boiled 10 min at 95°C.

To explore the location of CSF-1R dimers, the same protocol was used without DTT in both buffers. After compartment separation, the samples were sonicated 3 times and 4X Laemmli added to cytoplasmic fraction. Samples were then used without boiling.

Extraction of total proteins from CMML peripheral blood sorted monocytes was performed with RNA/DNA/Protein Purification Plus Kit (NorgenBiotek, Interchim, Montluçon, France) according to the supplier instructions. 4X Laemmli, 0.1M DTT and 1X Protease inhibitor cocktail were added and the samples were boiled 10 min at 95°C.

Immunoprecipitation

Cells were lysed 20 min on ice in a buffer containing 50mM Tris pH 7.4, 150mM NaCl, 1% NP-40, 10% Glycerol, 1mM Na₃VO₄ and 1X Protease inhibitor cocktail (100uL for 10.10⁶ cells). Samples were then centrifuged 15 min at 4°C at 18,000g and the supernatant containing the proteins was collected. Ten μ g of CSF-1R or ELK1 antibody or negative control IgG were added for 10.10⁶ cells and the samples incubated one night at 4°C with agitation. One hundred μ L of Protein A/G PLUS-Agarose (Santa Cruz biotechnology) were incubated with the samples during 2h at 4°C with agitation. The complexes were then precipitated with 1 min centrifugation at 2,000g and the supernatant, consisting of «output» was collected. The remaining beads were washed 5 times with 500 μ L of lysis buffer without NP-40. 2X Laemmli with 0.1M DTT and Protease inhibitor cocktail 1X was added on the beads and outputs. The samples were then boiled 10 min at 95°C.

Immunoblot assays

Proteins were separated on polyacrylamide gel and transferred to nitrocellulose membrane (ThermoFisher Scientific). Membranes were blocked with 5% bovine serum albumin in PBS, with 0.1% Tween-20 (Sigma-Aldrich) for 40 min at RT, incubated overnight at 4°C with the primary antibodies, washed in PBS-0.1% Tween-20, incubated further with HRP-conjugated secondary antibody (400ng/mL) for 1h at RT and washed again before analysis using Immobilon Western Chemiluminescent HPR Substrate system (Millipore, Molsheim, France). The chemiluminescent emission was recorded by imageQuant LAS 4000 camera (GE Healthcare Life Science, Vélizy, France).

Transient transfection and siRNA knockdown

Small interfering RNA and plasmids were introduced into monocytes by nucleofection (Lonza). Briefly, 5.10^6 monocytes resuspended in 100μ l nucleofector solution with 1nmol siRNA and 150ng total plasmids were electroporated. Cells were incubated 24 hours with 5 ml of pre-warmed complete medium and 10ng/mL IL-3

(Peprotech) were subsequently added. 48-72h after transfection, cells were collected using EDTA for gene expression analysis. We used Stealth siRNAduplex (ThermoFisher Scientific) targeting CSF-1R and Stealth RNAi[™] siRNA Negative Control (table 5).

Small interfering RNAs were introduced into macrophages by transfection with lipofectamin 2000 (ThermoFisher Scientific). Monocytes were cultured for 2 days with CSF-1 (100ng/mL), medium was then replaced by the same medium without antibiotics, and cells were transfected with 0.1nmol siRNA for 0.3.10⁶ cells according to the supplier instructions. Fourty-eight hours after transfection, cells were collected using EDTA for gene expression analysis.

siRNA Target gene	Forward Sequence
CSF1-R (1)	GGCUCAACCUCAAAGUCAUGGUGGA
CSF1-R (2)	GCAUCCGGCUGAAAGUGCAGAAAGU
CSF1-R (3)	GCUCAGCCAGCAGCGUUGAUGUUAA

Gene expression analysis

Total RNA was isolated from primary monocytes or macrophages with RNeasy mini Kit (Qiagen). Reverse transcription was carried out using random hexamers (ThermoFischer Scientific) and reverse transcriptase (Super Script II, ThermoFischer Scientific). Quantitative real-time PCR was performed using SYBR-Green (ThermoFisher Scientific) in an applied biosystem 7500 thermocycler using the standard SYBR-Green detection protocol as outlined by the manufacturers (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific). Briefly, 100-200ng of total cDNA, 50nM (each) primers, and 1X SYBR-Green mixture were used in a total volume of 20µl. Specific forward and reverse primers are in table 6.

Gene	Forward Primer	Reverse Primer
CFMS	GCCCCCCATCACCTCACT	GTGTTTTGGAAGGTAGCGTTGTT
LUCIFERASE 2	CAGCTGCACAAAGCCATGA	CGATATGTGCGTCGGTAAAGG
B2M	ACACAACTGTGTTCACTAGC	CAACTTCATCCACGTTCACC
GAPDH	AAGGTCGGAGTCAACGGGT	AGAGTTAAAAGCAGCCCTGGTG
TUBULIN A	TCCAGATTGGCAATGCCTG	GGCCATCGGGCTGGAT
RENILLA	AATTTGCAGCATATCTTGAACCATT	GGATTTCACGAGGCCATGAT
HPRT	GGACAGGACTGAACGTCTTGC	CTTGAGCACACAGAGGGCTACA
RPL32	TGTCCTGAATGTGGTCACCTGA	CTGCAGTCTCCTTGCACACCT
PU.1	GGAGAGCCATAGCGACCATTACT	CGGCGAAGCTCTCGAACTC
BCL2	AACTGTACGGCCCCAGCAT	GCCAAACTGAGCAGAGTCTTCAG
EZH2	CGCTGACCATTGGGACAGTA	TTGGAGCCCCGCTGAATA
ASXL1	CCGCGCGCCTGGTA	CTGCAGAATCTGTTTTGGTGTCAT
CBL	GAAGTGCTGGAAGCTCATGGA	CGCCAGCTTTGGGTTCTG
CSF2RB	TACAACGACTACACCAGCCACAT	AGCCGCTGGGCATCCT
CEBPD	GGAGATGCAGCAGAAGTTGGT	CGCGCTGGTGCAGCTT
SRC	GGACAGCCCCTGCCTTCTA	GGCATCCTTGGGCTTGCT
KLF6	TGCACGAGACCGGCTACTTC	TAGGCAGGTCTGTTGCCAGTAC
YY1	GGCTGCGTCTCAGGTTTCC	CCACCGTTGGGAGGATGTC
С3	GGGAGTCCCATGTACTCTATCATCA	TGGGCCTCCAGCACCAT
FGR	CCATCAACCCTGGCTTCCT	CACCCCAATCCCTGACACA
CJUN	AACGACCTTCTATGACGATGCC	TGTAGCCATAAGGTCCGCTCTC

Table 6 : qPCR primer sequences

ChIP-qPCR and ChIP-seq experiments

Cells were cross-linked with addition of 1% formaldehyde directly to the culture medium for 10 min at RT with agitation. Fixation was stopped by addition of 125mM glycin during 5 min at RT with agitation and samples were then washed 2 times in icecold PBS before addition of SDS lysis buffer (Millipore, 10uL per 1.10⁶ cells) supplemented with 1% protease inhibitor cocktail (Active Motif). Samples were vortexed and incubated 15 min on ice before 10-15 min sonication at 40W (Covaris S220, Woodingdean, UK). The chromatin immunoprecipitation was carried out using ChIP-it express kit (Active Motif). Briefly, 10 µL sheared chromatin were kept aside for input samples, 25µL protein G magnetic beads and 10 µL ChIP Buffer 1 were added to 30-60 µL sheared chromatin. Then, 1 µL protease inhibitor cocktail, water (for a final volume of 100 µL) and 1-3 µg antibody (anti-Cter- or Nter-CSF-1R or anti-EGR1, anti-H3K4me1, anti-H3K4me3) or corresponding negative control IgG were added. The samples were incubated one night at 4°C on an end-to-end rotator before wash of the beads 3 times with ChIP Buffer 1 and 2 times with ChIP Buffer 2. Beads were incubated in 50µL Elution Buffer for 15 min at RT on an end-to-end rotator before adding 50µL Reverse Cross-linking Buffer and collecting the supernatant (without the beads). Eightyeight µL ChIP Buffer 2 and 0.1M NaCl were added to the input samples which were then incubated at 95°C for 15 min along with the immunoprecipitated chromatin. Proteins were removed by 1h Proteinase K treatment at 37°C followed by enzyme inactivation by Proteinase K Stop Solution. Purified DNA was then used for qPCR or sequencing experiments.

Enriched DNA from ChIP and Input DNA fragments were end-repaired, extended with an 'A' base on the 3'end, ligated with indexed paired-end adaptors (NEXTflex, Bioo Scientific, Proteigene, Saint Marcel, France) using the Bravo Platform (Agilent, Les Ulis, France), size-selected after 4 cycles of PCR with AMPure XP beads (Beckman Coulter, Villepinte, France) and amplified by PCR for 10 cycles more. Fifty-cycle single-end sequencing was performed using Illumina HiSeq 2000 (Illumina, San Diego, USA).

ChIP-qPCRs were performed in the same way as RT-qPCRs with 2 μ L of ChIP or IgG samples instead of cDNA. Specific forward and reverse primers are in table 7.

Gene	Forward Primer	Reverse Primer
PU.1 promoter	CTCCACCCCCAGAAAAGAT	GCGCTGGGAAAACAAAAAG
<i>PU.1</i> intron 4-1	GGCTGAGACAGGAGAATTGCTT	GGCACGATCTCGGCTCACT
<i>PU.1</i> intron 4-2	GGAGGTGGAGGTTGCAGTGA	GTTTTTGAGATGGAGTTGCTCTTGT
CSF2RB intron1	GTTTGCATGGGCATCTTGAGT	CAAGTGTGGCTCCTTTTCTTCTG
<i>KLF6</i> -18kb	TGTGTGCCTCTGTGTGTATGTG	CTTACCCACACAGAGACACACAGAC
<i>KLF6</i> -24kb	TCACAGACACACATGCGTACAC	GTCTCTCTGTGTGTCTGCTGCATA
C3 intron 4	TCCGTGGATTCTGCTTTCAGT	CGTCATGATCCCGATATTCAGAT
FGR intron 2	AGGCAAACTCACCCATACTTAGAG	GTCCTATTGCTTTGATATGTTGTGTTTC
CMKLR1	CTACCACAGAATTAGCAAAAGAGTAGCT	CGCCTAGCCATCCATCCA
CEBPD	CCCGAGAGGATTCAGACTGG	ACACACTAGGAGGTTCATTGC
SRC	GACTCTGCTCATGCCACGTATTT	GCCAGAAGAAGTGGGAGAAGAC
CFMS intron 1	CCCCAACACCTGCAATTGA	CCTGAGCAAGCCTCTGATACTCTT
MYB TSS	GCCGCTCCAGAGACTGATG	CCCAACGTCCGGATACATTT
EZH2 TSS	GGAGACACAGTCCGTCCTTTG	ACGGGACAGACACAAGTTGGT
IDH1 TSS	CCTGATTTTCCCCTTGTCGTT	GGCCTGGGAGGGAGAAACT
FOS intron 1	GGGATAGCCTCTCTTACTACCACTCA	ACAGGCGAGCCCATGCT

Table 7 : ChIP-qPCR primers sequences

ChIP-seq analysis

Fifty-cycle single-end sequencing was performed using IlluminaHiSeq 2000 (Illumina). Reads were aligned into human genome hg19 with BWA aln (v0.7.5a) and peak calling assessed using MACS 2.0 with a q-value cut-off of 0.05 for histone marks and a p-value cut-off of 0.01 for CSF-1R. Annotation and motif analyses have been done with HOMER (v4.7.2), with a p value of 0.01. Integrative Genomics Viewer (IGV 2.1) was used for representation. Heatmaps of short read coverage across the genomic regions of interest (TSS, enhancers) were done using ngsplot version 2.61.

Whole-transcriptome RNAseq analysis

The RNA integrity (RNA Integrity Score \geq 7.0) was checked on the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent) and quantity was determined using Qubit (Invitrogen). SureSelect Automated Strand Specific RNA Library Preparation Kit was used according to manufacturer's instructions with the Bravo Platform. Briefly, 100 ng of total RNA sample was used for poly-A mRNA selection using oligo(dT) beads and subjected to thermal
mRNA fragmentation. The fragmented mRNA samples were subjected to cDNA synthesis and were further converted into double stranded DNA using the reagents supplied in the kit, and the resulting dsDNA was used for library preparation. The final libraries were processed using Illumina TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit and sequenced on an Illumina Hiseq 2000 (Illumina) in paired-end 100bp mode in order to reach at least 30 millions reads per sample at Gustave Roussy.

Raw reads were mapped to hg19 genome with Tophat2 (v2.0.14) / Bowtie2 (v2.1.0) with the following parameters : --read-realign-edit-dist 0 --library-type fr-firststrand --mate-inner-dist 50.

Expression analysis was performed by counting the number of reads per gene using HTSeq (0.5.4p5) with the following parameters : -m union -s reverse -a 10 and GENECODE gene annotation (v24lift37).

DESeq2 (v1.10.1) package was used for differential gene expression analysis

Plasmids

For luciferase assays, we cloned EGR1 known motif identified by ChIP-seq analysis for CSF-1R recruitment in a Luciferase reporter system (pGL4.17 vector, Promega, Charbonnières-les-Bains, France). Four EGR1 motif identified sequences (table 8) were ordered at Eurofins (Les Ulis, France), denatured 5 min at 95°C and hybridized by slow temperature drop before enzymatic cloning. CSF1-R binding PU.1 promoter sequences (primers in table 8) were first amplified with PCR from healthy monocyte genomic DNA, purified, sub-cloned in TOPO 2.1 vector (ThermoFisher Scientific) before enzymatic cloning in pGL4.17 vector. Luciferase plasmids were co-transfected with pRL-Renilla control reporter vector (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) used for transfection efficiency normalization.

Sequences	Forward	Reverse	
EGR1 motif (x4)	CTAGCTGCGTGGGTGTGCGTGGGTG	AGCTTCACCCACGCACACCCACG	
	TGCGTGGGTGTGCGTGGGTGA	CACACCCACGCACACCCACGCAG	
PU.1 promoter 1 (complete)	ATTAGCTAGCTCTACTCATCCCTCCA	TAAGCTTTCCAGCCGGGCTCCGA	
	С	G	
PU.1 promoter 2 (without	ATTAGCTAGCGGTAGATGGGTGGAT	ATTTAGATCTTCCAGCCGGGCTCC	
CSF-1R recruitment sequence)	AG	GA	

 Table 8 : EGR1 motif sequence primers cloned in reporter plasmid and primers used for

 PU.1 promoter cloning

Statistical analysis

All statistical analyses (t tests and Mann-Whitney tests for Ctrl vs CMML *CFMS* expression) were performed using prism software,* corresponding to p<0.05, ** to p<0.01, *** to p<0.001

Gene ontology (GO) analysis

Gene ontology annotation was performed using geneontology.org website. We selected the 30 first pathways based on higher fold change.

Patients

Peripheral blood samples were collected on EDTA from 28 patients with a CMML diagnosis according to the World Health Organisation (WHO) 2016 criteria²⁴³. All the procedures were approved by the institutional board of Gustave Roussy and the ethical committee Ile de France 1, and written informed consent was obtained from each patient. Cohort characterization is summarized in Table 9.

Table 9	
CMML patient characteristics	N = 28
Mean age in years (range)	80.3 (60-96)
Sex ratio M/F	15/13
CMML 0/CMML 1/CMML 2 (WHO criteria)	10/14/3
Proliferative/dysplastic forms (WHO criteria)	14/14
Leucocyte mean .10 ⁹ /L (range)	27.3 (2.1-167.4)
Monocyte mean .10 ⁹ /L (range)	8.12 (1.0-110)
Platelet count mean .10 ⁹ /L (range)	146.9 (23-597)
Hemoglobin level mean g/dL (range)	11.5 (7.7-15.9)
Karyotype (normal/abnormal/not done)	24/3/1
Mutations	
TET2	20/27 (74%)
SRSF2	11/24 (46%)
ASXL1	10/24 (42%)
AML-1	3/24 (12.5%)
NRAS	2/22 (9%)
KRAS	2/25 (8%)
CBL	2/25 (8%)

Results

A fraction of CSF-1R is located in the nucleus of human monocytes.

We sorted human monocytes from healthy donor peripheral blood and detected CSF-1R in both the cytoplasm and the nucleus by confocal microscopy (Fig. 13a,b). The signal specificity was confirmed by the use of a blocking peptide mimicking the epitope recognized by CSF-1R antibody, and by monocyte transfection with CSF-1R siRNA (Fig. 13c). CSF-1R was also detected in monocyte nucleus by imaging flow cytometry (Supplementary Fig. 1a,b). Monocyte fractionation into nuclear, cytoplasmic and membrane fractions followed by immunoblotting confirmed CSF-1R nuclear detection as a full-length protein with partially (130kDa) and fully glycosylated (170 kDa) forms (Fig. 13d). Again, signal specificity was demonstrated by two CSF-1R siRNAs, which totally abolished the signal in both subcellular fractions (Supplementary Fig. 1c). Finally, CSF-1R localization was observed by electron microscopy in heterochromatin and euchromatin (Fig. 13e), which was validated by a distinct antibody targeting CSF-1R Nterminal fragment (Supplementary Fig. 1d). Monocyte fractionation without denaturation, followed by immunoblotting, detected a transient CSF-1R dimerization in the membrane and cytoplasmic fraction after 10min of CSF-1 treatment, which was not detected in nuclear extracts, even after prolonged immunoblot exposure, suggesting the nuclear expression of monomeric holoreceptor (Supplementary Fig. 1e). All together, these results demonstrate the presence of a fraction of full-length CSF-1R in human monocyte nucleus.



Figure 13 : A fraction of CSF-1R is located in the nucleus of human monocytes. a. Sorted peripheral blood human monocytes were stained with an anti-CSF-1R antibody (Cter sc-692) or a control IgG (green) and Dapi (blue), followed by confocal imaging analysis (n = 3, scale : 10μ m). **b.** Quantification of the signal generated by CSF-1R labeling (green) and Dapi labeling (blue) according to indicated axes (A.U. : arbitrary units, ROI : region of interest, scale : 10μ m). **c.** The specificity of CSF-1R labeling with sc-692 antibody (Ab in green) was explored in monocytes transfected 24 hours before with a CSF-1R specific or a control si-RNA and treated or not with sc-692 blocking peptide (BP, n = 2, scale : 10μ m, Dapi in blue). **d.** Monocytes were fractionated into cytoplasmic plus membrane (C+M) and nuclear (N) fractions and analyzed by immunoblotting with antibodies that recognize CSF-1R (Cell signaling #3152), Lamin B (N fraction) and actin (C+M fraction) (n = 3). **e.** Immunogold analysis of CSF-1R expression in monocytes using the anti-Cter sc-692 antibody and electron microscopy (n = 2).



Supplemental figure 1 : A fraction of CSF-1R is located in the nucleus of human monocytes. a,b. Monocytes were fixed and stained for CSF-1R (anti-Cter sc-692) or a non-relevant antibody (IgG) and Dapi, followed by imaging flow cytometry (Amnis); a. representative image (Dapi in purple and CSF-1R in yellow); b. quantification of nuclear CSF-1R (mean +/- SEM of 3 independent experiments, MFI : mean fluorescence intensity, A.U. : arbitrary units, *P<0.05). c. Monocytes were transfected with CSF-1R specific (#1 and 3) or control (Co) siRNAs; 24 hours later, cytoplasmic plus membrane (C+M) and nuclear (N) proteins were extracted and separated for immunoblotting with CSF-1R, Lamin B (nucleus marker) and actin (cytoplasmic marker) antibodies (n = 1). d. Electron microscopy analysis of monocytes stained with an anti-CSF-1R Nter (sc-365719) antibody (scale : 500nm, n = 1). e. Monocytes were fractionated into cytoplasmic plus membrane (C+M) and nucleus (CF-1R) and nucleus (N) before and after CSF-1 stimulation (100ng/mL for indicated times in minutes), and proteins extracted from these fractions in the absence of DTT and boiling were analyzed by immunoblotting for CSF1-R, histone deacetylase 2 (HDAC2, nuclear protein) and GAPDH (cytoplasmic protein) (n = 2).

Nuclear accumulation of CSF-1R holoreceptor is driven by its ligand.

Peripheral blood monocytes were exposed to AF488-labeled recombinant CSF-1 for 15min before fixation and staining with anti-CSF-1R antibody. As expected, CSF-1 and CSF-1R co-localized mainly at the plasma membrane and in the cytoplasm. CSF-1 was also detected in monocyte nucleus where it co-localizes with CSF-1R (Fig. 14a). This nuclear localization of CSF-1 and CSF-1R could not be related to nuclear localization signals (NLS) as CSF-1R primary sequence is devoid of this sequence and the putative NLS (amino acids 521 to 524) in CSF-1 sequence⁷⁰ is deleted from the recombinant CSF-1 used in this experiment. CSF-1 nuclear accumulation could be prevented by monocyte pre-treatment for 3h with CSF-1R inhibitors, either BLZ945 or GW2580 (Fig. 14b). Confocal imaging further showed that monocyte exposure to CSF-1R inhibitors for 3 hours partially depleted nuclear CSF-1R in a dose-dependent manner (Fig. 14c), which could be prevented by leptomycin B, an inhibitor of CRM1-mediated nuclear export (Fig. 14d). All together, these results suggest a role for CSF-1 in CSF-1R nuclear localization in human monocytes.



Figure 14 : Nuclear accumulation of CSF-1R holoreceptor is driven by its ligand. a. Peripheral blood monocytes were fixed and stained for CSF-1R or control IgG (red) and Dapi (blue) after 15min exposure to AF488-labeled CSF-1 (1µg/mL in green) followed by confocal imaging analysis (n = 3, scale : 7µm). b. Monocytes were pre-treated for 3 hours with CSF-1R small molecule inhibitors (BLZ945 50nM; GW2580 200nM or control DMSO), exposed 15min to AF488-labeled CSF-1 (except Co, 1µg/mL, in green)), fixed and stained for Dapi (blue) before analysis by confocal imaging; Lower panel : quantification of nuclear CSF-1 positive cells (mean +/- SEM of 3 independent experiments, scale : 10µm, *P<0.05). c. Monocytes were treated or not for indicated concentrations of BLZ945 and GW2580 before confocal imaging analysis of CSF-1R nuclear localization (MFI, mean fluorescence intensity, mean +/- SEM, ***P<0.001, n = 3). d. Monocytes were treated or not for 3 hours with 200nM GW2580, in the absence or presence of 20 nM Leptomycin B, fixed and stained for CSF-1R or control IgG before confocal imaging analysis of CSF-1R nuclear localization (MFI, mean fluorescence intensity, mean +/- SEM, ***P<0.001, n = 3).

CSF-1R is recruited to the chromatin in human monocyte nucleus.

Chromatin immunoprecipitation followed by deep sequencing (ChIP-Seq) was performed with an anti-CSF-1R antibody in monocytes sorted from three healthy donors. Peak calling identified a mean number of 52,415 peaks, 15% being common to 2 samples and 3% (5,082) to all samples (Fig. 15a). Common peaks analysis indicated that CSF-1R was mainly recruited to intergenic (58.9%) and intronic (39.3%) regions while barely detected in other regions (Fig. 15b). To gain insight into CSF-1R function at the chromatin level, we performed genome-wide analysis of H3K4me1 and H3K4me3 marks by ChIP-seq. For example, CSF-1R was recruited upstream of *KLF6 and SPI1/PU.1* genes, and in the last intron of the latter, co-localizing with histone mark H3K4me1, suggesting regulating/enhancer regions (Fig. 15c,d)^{386,387}. ChIP-seq results were validated by ChIPqPCR in independent healthy donors monocytes with two anti-CSF-1R antibodies that recognize either its N- or C-terminal part (Supplementary Fig. 2a,b). Motif analysis of ChIP-seq data indicated that CSF-1R could be recruited on several transcription factor binding sites, including EGR1, EGR2, ARNT/HIF-1β, FOXA1, HOXA2 and GATA3 motifs (Fig. 15e). Gene ontology (GO) analysis indicated an enrichment in organ morphogenesis, tissue development and cell differentiation pathways (Table 10), suggesting a role for nuclear CSF-1R in supporting monocyte trophic functions.



Figure 15 : CSF-1R is recruited to the chromatin in human monocyte nucleus. a. Venn diagram of peak calling (input normalization) from ChIP-seq experiment with sc-46662 anti-CSF-1R antibody performed on monocytes from 3 healthy donors. **b.** Repartition of the ChIP-seq peaks common to the 3 donors on the genome. **c.** Peak calling for CSF-1R (blue) and H3K4me1 (orange) on *KLF6* gene in monocytes from the three studied donors (TSS : transcription starting site, TTS : transcription termination site). **d.** Peak calling for CSF-1R (blue), H3K4me3 (purple) and H3K4me1 (orange) on *PU.1* gene in monocytes from the three studied donors (TSS : transcription starting site, TTS : transcription termination site). **e.** Motif analysis of the ChIP-seq peaks common to the 3 donors.

а

b



Supplemental figure 2 : **CSF-1R is recruited to the chromatin in hum an monocyte nucleus. a.** Chromatin was immunoprecipitated from monocytes with the anti-N-ter (sc-46662) CSF-1R antibody or control IgG followed by qPCR directed against *PU.1, CSF2RB, KLF6, CMKLR1, C3, CEBPD* and *SRC* genes (normalization to IgG, mean +/- SEM of 3 independent experiments). **b.** Chromatin was immunoprecipitated from monocytes with the anti-C-ter (sc-692) CSF-1R antibody or control IgG followed by qPCR directed against *PU.1, CSF2RB, KLF6, CMKLR1, C3, CEBPD* and *SRC* genes (normalization to IgG, mean +/- SEM of 3 independent experiments). **b.** Chromatin was immunoprecipitated from monocytes with the anti-C-ter (sc-692) CSF-1R antibody or control IgG followed by qPCR directed against *PU.1, CSF2RB, KLF6, CMKLR1, C3, CEBPD* and *SRC* genes (normalization to IgG, mean +/- SEM of 4 independent experiments).

Table 10

Enrichment of G	ene Ontology biological process terms in ChIP hits with CSF-1R in monocytes		
Go term ID	GO biological process	Fold Enrichment	P-value
GO:0021697	Cerebellar cortex formation	5.36	1.43E-02
GO:0021696	Cerebellar cortex morphogenesis	4.74	4.71E-03
GO:0021587	Cerebellum morphogenesis	4.50	2.07E-03
GO:0098815	Modulation of excitatory postsynaptic potential	4.34	1.48E-02
GO:0021575	Hindbrain morphogenesis	4.07	8.46E-03
GO:0007215	Glutamate receptor signaling pathway	3.80	2.18E-02
GO:0030574	Collagen catabolic process	3.21	2.63E-02
GO:0001657	Ureteric bud development	2.90	2.17E-02
GO:0072164	Mesonephric tubule development	2.87	2.66E-02
GO:0072163	Mesonephric epithelium development	2.87	2.66E-02
GO:0022037	Metencephalon development	2.76	1.02E-02
GO:0021549	Cerebellum development	2.73	4.36E-02
GO:0045667	Regulation of osteoblast differentiation	2.72	9.24E-03
GO:0072073	Kidney epithelium development	2.59	5.80E-03
GO:0021953	Central nervous system neuron differentiation	2.46	1.41E-03
GO:0030902	Hindbrain development	2.39	2.56E-02
GO:0007187	G-protein coupled receptor signaling pathway, coupled to cyclic nucleotide	2.36	2.25E-03
	second messenger		
GO:0071805	Potassium ion transmembrane transport	2.36	1.88E-02
GO:0071804	Cellular potassium ion transport	2.36	1.88E-02
GO:0030278	Regulation of ossification	2.35	2.61E-03
GO:0018108	Peptidyl-tyrosine phosphorylation	2.32	1.90E-03
GO:0043583	Ear development	2.30	7.56E-04
GO:0018212	Peptidyl-tyrosine modification	2.30	2.53E-03
GO:0050770	Regulation of axonogenesis	2.28	3.87E-02
GO:0048839	Inner ear development	2.27	8.31E-03
GO:0006813	Potassium ion transport	2.22	4.19E-02
GO:0030098	Lymphocyte differentiation	2.20	2.96E-03
GO:0090596	Sensory organ morphogenesis	2.15	1.37E-03
GO:0002521	Leukocyte differentiation	2.10	2.71E-04
GO:0001503	Ossification	2.09	5.18E-03

CSF-1R interacts with EGR1 to down-regulate gene expression.

Since CSF-1R is mainly recruited on EGR1 motifs and EGR1 is involved in monocytopoiesis¹¹¹, we searched for an interaction between CSF-1R and EGR1. Coimmunoprecipitation experiments in whole monocyte extracts demonstrated an interaction between CSF-1R and EGR1 (Fig. 16a). Of note, CSF-1R recruiting EGR1 motifs have a repartition similar to that observed for CSF-1R (Supplementary Fig. 3a). We reasoned that CSF-1R and EGR1 peaks must colocalize in genome-wide analysis. ChIPseq experiments on monocytes from three healthy donors with an anti-EGR1 antibody generated 4,022 peaks common to the three donors after peak calling. It revealed that 35.6% of EGR1 peaks co-localized with 28.2% of CSF-1R peaks on chromatin (Fig. 16b), EGR1 showing a similar repartition on genomic features compared to CSF-1R (Fig. 16c). We also observed that 90.2% of common CSF-1R and EGR1 peaks colocalized with H3K4me1 mark which is exemplified on specific genes, namely PU.1, KLF6, C3 and CEBPD (Fig. 16d and Supplementary Fig. 3b). Motif analysis obviously identified EGR2 and EGR1 motifs as EGR1 recruitment sequences but also HOXA2, GATA3 and ARNT/HIF-1β motifs (Supplementary Fig. 3c), previously shown to be associated with CSF-1R (Fig. 15e). These results indicate that EGR1 is recruited with CSF-1R on chromatin with H3K4me1 mark.

In monocytes transfected with CSF-1R-targeting or control siRNA, we observed that CSF-1R down-regulation induced a significant increase of several CSF-1R target genes expression identified by ChIP-seq experiments, namely CEBPD, SRC, FGR, KLF6 and a tendancy for CSF2RB and C3 (Fig. 16e). However, this experiment did not uncouple membrane and nuclear CSF-1R functions. To better understand CSF-1R recruitment impact on gene expression, we cloned four identified EGR1 motif sequences upstream of a LUCIFERASE reporter gene and transfected monocytes with this construct and CSF-1Rspecific or control siRNA (Fig. 16f). An increased LUCIFERASE expression after CSF-1R down-regulation suggested a repressive role of CSF-1R on EGR1 sites. Since ChIP-seq experiments identified CSF-1R and EGR1 on PU.1 promoter (Fig. 16d), we also cloned PU.1 promoter with (PU.1 promoter 1) or without (PU.1 promoter 2) CSF-1R recruitment site upstream of LUCIFERASE gene. In monocytes transfected with the first plasmid, we observed an increased LUCIFERASE expression after CSF-1R downregulation (Supplementary Fig. 3d), which correlated with an increased expression of *PU.1* (Supplementary Fig. 3e). These effects were not observed with the second plasmid encoding a promoter deleted of CSF-1R recruitment site (Supplementary Fig. 3d). These data suggest that CSF-1R negatively regulates gene expression in human monocytes.



Figure 16 : CSF-1R interacts with EGR1 to down-regulate gene expression. **a.** Immunoprecipitation with anti-CSF-1R (sc-365719) or control IgG in monocytes followed by immunoblotting with anti-CSF-1R and anti-EGR1 (n = 3). **b.** Venn diagram of peak calling (input normalization) common to three donors from ChIP-seq experiment with sc-46662 anti-CSF-1R and sc-110X anti-EGR1 antibodies. **c.** Repartition on the genome of EGR1 peaks detected by ChIP-Seq in monocytes of the 3 donors. **d.** Peak calling for H3K4me1 (orange), H3K4me3 (purple), EGR1 (blue), CSF-1R (red) ChIP-seq on *KLF6* and *PU.1* genes in monocytes (TSS : transcription starting site, TTS : transcription termination site). **e.** mRNA expression (qPCR) of *CFMS, CSF2RB, CEBPD, C3, SRC, FGR* and *KLF6* genes in monocytes transfected 72h with control or CSF-1R siRNA (mean +/- SEM of 6 independent experiments, normalization to control siRNA, *P<0.05, ns : non significant). **f.** mRNA expression (qPCR) of *LUCIFERASE* and *CFMS* genes in monocytes transfected 48h with control or CSF-1R siRNA and PGL4.17-EGR1 motif plasmid (mean +/- SEM of 3 independent experiments, normalization to control siRNA, *P<0.05, **P<0.01).





Supplemental figure 3 : CSF-1R interacts with EGR1 to down-regulate gene expression. a. ChIP-seq CSF-1R peaks containing EGR1 motif common to the 3 donors repartition on the genome. b. Peak calling of ChIP-Seq experiments performed with H3K4me1 (orange), H3K4me3 (purple), EGR1 (blue), CSF-1R (red) antibodies on C3 and CEBPD genes in human monocytes of healthy donors (TSS : transcription starting site, TTS : transcription termination site). c. Motif analysis of the 4,022 EGR1 ChIP-seq peaks common to the 3 donors. d. mRNA expression (qPCR) of LUCIFERASE and CFMS genes in monocytes transfected 48 hours before with control or CSF-1R siRNA and PGL4.17-PU1 promoter 1 (complete) or PGL4.17-PU1 promoter 2 (deleted for CSF-1R recruitment site) plasmids (mean +/- SEM of 3 independent experiments, normalization to PU.1 promoter 1 control siRNA, *P<0.05, **P<0.01). e. mRNA expression (qPCR) of 4 independent experiments, normalization to control siRNA, *P<0.05).

Differential CSF-1R chromatin localization in CSF-1-induced macrophages.

Primary monocytes exposed to CSF-1 during 72h differentiate into macrophages. Immunoblot analysis of nuclear extracts collected during this process detected a transient decrease in nuclear CSF-1R expression, 6 to 24h after CSF-1 stimulation. After 72h, the lower molecular weight CSF-1R was increased in macrophages (Fig. 17a). Confocal imaging also detected CSF-1R in the nucleus of a fraction of these macrophages (Fig. 17b,c), which was further validated by immunoglold staining and electron microscopy (Fig. 17d). Interestingly, nuclear CSF-1R was mainly located on the verge of heterochromatin, which suggested its association with actively transcribed regions.



Figure 17 : Differential CSF-1R chromatin localization in CSF-1-induced macrophages. a. Nuclear proteins were extracted from monocytes stimulated with 100ng/mL CSF-1 during the indicated times, and analyzed by immunoblotting for CSF-1R, LAMIN B (nucleus marker) and α TUBULIN (cytoplasm marker) (n = 3). b. Monocytes were differentiated 3 days with 100ng/mL CSF-1, fixed and stained for CSF-1R or control IgG (green) and Dapi (blue) followed by confocal imaging (n = 3, scale : 10µm). c. Quantification of the signal generated by CSF-1R labeling (green) and Dapi labeling (blue) according to indicated axes (A.U. : arbitrary units, ROI : region of interest, scale : 10µm). d. Monocytes were differentiated 3 days with 100ng/mL CSF-1, fixed and stained for CSF-1R (sc-692) followed by electron microscopy (n = 1, scale : 500nm).

CSF-1R ChIP-Seq was performed in macrophages generated by exposure of monocytes from 3 healthy donors to CSF-1 during 72h (same donors as in figure 15). Peak calling identified a mean number of 145,382 peaks, 10.4% being common to 2 samples and 1.94% to all samples (Supplementary Fig. 4a). Common peak analysis indicated that CSF-1R was recruited mainly to intergenic (21.9%) and intronic (42.3%) regions. However, a significant fraction of CSF-1R was detected on other regions as promoter-TSS (transcription starting site), exonic and 5'UTR regions (20.1, 8.5 and 4.5% respectively, Supplementary Fig. 4b). CSF-1R promoter-TSS recruitment was validated by ChIP-qPCR for CFMS, MYB, EZH2, IDH1 and FOS genes in macrophages from independent healthy donors (Supplementary Fig. 4c). Comparison of peak localization in monocytes and macrophages identified 2,119 common peaks (representing 35.9% and 24% of monocyte and macrophage peaks respectively, Fig. 18a). ChIP-Seq experiments with histone marks H3K4me1 and H3K4me3 were performed on the same samples, showing a higher fraction of CSF-1R associated with H3K4me1 in monocytes and H3K4me3 in macrophages (Fig. 18a). Heatmaps centered on TSS indicated that CSF-1R moved around the TSS where it colocalizes with H3K4me3 in macrophages (Fig. 18b) as examplified for MAFB, JUN and MYC genes whereas CSF-1R moved from the promoter region of PU.1 gene in monocytes to PU.1 first intron in macrophages where it colocalizes with H3K4me3 mark (Supplementary Fig. 4d). GO analysis of CSF-1Rinteracting genes in macrophages (Table 11) showed a dramatic change as compared to monocytes with a strong enrichment in Fc receptor signaling, phagocytosis and cellular response to stress. Renforcing this dynamic process, motif analysis revealed CSF-1R recruitment on new transcription factor binding sites namely ELK, ETS, E2F4 and YY1 (yin yang 1), not seen in monocytes, and GATA3, already detected in monocytes (Fig. 18c). All together our results demonstrate that CSF-1-induced monocyte differentiation into macrophages modifies CSF-1R chromatin recruitment.

ELK proteins can bind to serum response elements to modulate immune response³⁸⁸, while YY1 is involved in macrophage response to lipopolysaccharides³⁸⁹. Co-immunoprecipitation experiments in macrophages detected CSF-1R interaction with these 2 proteins (Fig. 18d,e). To explore CSF-1R nuclear functions in macrophages, we compared the expression of genes located near CSF-1R, H3K4me1 and H3K4me3 peaks between monocytes and macrophages (Fig. 18f upper panel). While global gene expression assessed by RNA-seq did not change during monocyte differentiation (Fig. 18f lower panel), we observed a globally increased expression of genes associated with CSF-1R peaks in macrophages regardless of the histone mark, suggesting that CSF-1R, which behaves as a transcriptional co-repressor in monocytes, becomes a transcriptional co-activator in macrophages. siRNA mediated down-regulation of CSF-1R in CSF-1 treated monocytes induced a significant decrease in *YY1, ASXL1, CBL* and *JUN* expression (Supplementary Fig. 4e), further renforcing that CSF-1R may directly or indirectly participate to the transcription of these genes in macrophages.



Supplemental figure 4 : Differential CSF-1R chromatin localization in CSF-1-induced macrophages. a. Venn diagram of peak calling (input normalization) from ChIP-seq experiment (anti-CSF-1R sc-46662) performed on monocytes differentiated 3 days with 100ng/mL CSF-1 from 3 donors. **b.** Repartition of the ChIP-seq peaks common to the 3 donors on the genome. **c.** Monocytes were stimulated 3 days with 100ng/mL CSF-1. Chromatin was immunoprecipitated with CSF-1R antibody (anti-N-ter sc-46662) or control IgG followed by qPCR directed against *CFMS, MYB, EZH2, IDH1* and *FOS* genes (normalization to IgG, mean +/- SEM of 3 independent experiments). **d.** Peak calling for H3K4me1 (orange), H3K4me3 (purple) and CSF-1R (blue) on *MAFB, JUN, MYC* and *PU.1* genes in monocytes (Mo) compared to 3 day CSF-1 differentiated macrophages (Mac) (TSS : transcription starting site). **e.** mRNA expression (qPCR) of *CFMS, YY1, ASXL1, CBL, BCL2* and *CJUN* genes in 2 day differentiated monocytes (CSF-1 100ng/mL) which were transfected during 48h with control or CSF-1R siRNA (mean +/- SEM of 4 independent experiments, normalization to control siRNA, *P<0.05, **P<0.01, ns : non significant).



Figure 18 : Differential CSF-1R chromatin localization in CSF-1-induced macrophages. a. Venn diagram of ChIP-seq peak number in untreated monocytes (Mo) and monocytes treated with CSF-1 for 3 days (Mac, 100ng/mL), showing peaks common to the 3 donors. Left, CSF-1R alone; middle, common CSF-1R and H3K4me1 peaks; right, common CSF-1R and H3K4me3 peaks. b. Heatmap centered on gene transcription starting sites (TSS) of CSF-1R, H3K4me3 and H3K4me1 peaks in monocytes and CSF-1-differentiated macrophages (3 days 100ng/mL). **c.** Motif analysis of ChIP-seq experiment on 3 day CSF-1 differentiated monocytes (100ng/mL). **d.** Immunoprecipitation (IP) with anti-ELK1 (sc-365876) or control IgG in monocytes differentiated 3 days with 100ng/mL CSF-1, followed by immunoblotting with anti-CSF-1R (n = 2). **e.** Immunoprecipitation (IP) with anti-CSF-1R (sc365719) or control IgG in monocytes differentiated 3 days with 100ng/mL CSF-1 differentiated cells (Mac, same 3 donors as those for ChIP-seq experiments in monocytes) and expression of genes close to CSF-1R and H3K4me1 or H3K4me3 peaks was evaluated (upper panel). Global gene expression was also assessed in monocytes and macrophages (lower panel).

Table 11

Enrichment of Gene Ontology biological process terms in ChIP hits with CSF-1R in Macrophages (3 days CSF-1)						
Go term ID	GO biological process	Fold Enrichment	P-value			
GO:0048010	Vascular endothelial growth factor receptor signaling pathway	2.21	2.16E-02			
GO:0042787	Protein ubiquitination involved in ubiquitin-dependent protein catabolic process	2.02	4.55E-04			
GO:0038093	Fc receptor signaling pathway	1.99	2.63E-08			
GO:0017148	Negative regulation of translation	1.97	3.51E-04			
GO:0002433	Immune response-regulating cell surface receptor signaling pathway involved in phagocytosis	1.97	5.54E-03			
GO:0038096	Fc-gamma receptor signaling pathway involved in phagocytosis	1.97	5.54E-03			
GO:0002431	Fc receptor mediated stimulatory signaling pathway	1.97	4.63E-03			
GO:0038094	Fc-gamma receptor signaling pathway	1.94	7.77E-03			
GO:0038095	Fc-epsilon receptor signaling pathway	1.92	1.95E-04			
GO:0031098	Stress-activated protein kinase signaling cascade	1.91	7.49E-03			
GO:0034249	Negative regulation of cellular amide metabolic process	1.91	6.11E-04			
GO:0006661	Phosphatidylinositol biosynthetic process	1.91	6.26E-03			
GO:0034620	Cellular response to unfolded protein	1.89	4.03E-02			
GO:0043433	Negative regulation of sequence-specific DNA binding transcription factor activity	1.86	1.54E-02			
GO:0007050	Cell cycle arrest	1.80	2.46E-02			
GO:0006417	Regulation of translation	1.79	5.20E-10			
GO:0000209	Protein polyubiquitination	1.77	5.26E-06			
GO:0036294	Cellular response to decreased oxygen levels	1.77	4.19E-03			
GO:0071453	Cellular response to oxygen levels	1.75	3.13E-03			
GO:0010498	Proteasomal protein catabolic process	1.75	5.00E-06			
GO:0071456	Cellular response to hypoxia	1.75	1.04E-02			
GO:0043161	Proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein catabolic process	1.74	1.24E-05			
GO:0034248	Regulation of cellular amide metabolic process	1.74	9.23E-10			
GO:0010608	Posttranscriptional regulation of gene expression	1.73	7.30E-12			
GO:0034599	Cellular response to oxidative stress	1.73	1.78E-03			
GO:0070302	Regulation of stress-activated protein kinase signaling cascade	1.73	6.85E-03			
GO:0030099	Myeloid cell differentiation	1.73	1.60E-02			
GO:0008654	Phospholipid biosynthetic process	1.72	1.23E-04			
GO:1903052	Positive regulation of proteolysis involved in cellular protein catabolic process	1.72	3.75E-02			
GO:0032872	Regulation of stress-activated MAPK cascade	1.72	9.94E-03			

CSF-1 modulates CSF-1R recruitment on chromatin within a few hours.

Having observed that monocyte exposure to CSF-1 for 72h induced CSF-1R relocalization on gene TSS, we explored the kinetics of this event by treating monocytes with CSF-1 for 1, 3, 6 and 24h before evaluating CSF-1R localization on MYB, EZH2 and IDH1 promoters by ChIP-qPCR (Fig. 19a). CSF-1R is recruited on MYB TSS 3h after CSF-1 treatment initiation and on *EZH2* and *IDH1* promoters at 6h. ChIP-seq experiment on monocytes stimulated 6h with CSF-1 identified a dramatic increase in CSF-1R recruitment on exonic, promoting-TSS, TTS (transcription termination site) and 5'UTR regions compared to unstimulated monocytes (Fig. 19b,c showing the donor with the most dramatic effect among the three assessed). 59.4% of CSF-1R peaks colocalize with H3K4me3 after 6h of CSF-1 exposure. Only 33% of CSF-1R peaks remained similar to unstimulated cells (Fig. 19d). CSF-1R was detected on a fraction of chromatin sites identified in macrophages, e.g PU.1 TSS, while some CSF-1R localizations as CSF2RB TSS were only transiently detected in cells treated 6h with CSF-1 (Fig. 19e). Pathway analysis indicated that CSF-1R localizes to genes involved in protein and mRNA synthesis and catabolism, RNA splicing, cell differentiation, hypoxia and stress responses (Table 12). Most of these pathways differ from those identified in resting monocytes as well as in macrophages. Motif analysis suggests CSF-1R localization on ELK and YY1 motifs, as in macrophages, E2F4, as in unstimulated monocytes, but also on STAT5 and E2F7 motifs, which are only transiently detected after 6h of CSF-1 stimulation (Fig. 19f). These results demonstrate a dynamic CSF-1R/chromatin interaction through monocyte to macrophage differentiation upon CSF-1 exposure.



Figure 19 : CSF-1 modulates CSF-1R recruitment on chromatin within a few hours. a. Monocytes were exposed to 100ng/mL CSF-1 during indicated times. Chromatin was immunoprecipitated with CSF-1R antibody or control IgG followed by qPCR directed against *MYB, EZH2* and *IDH1* genes (mean +/- SEM of 3 independant experiments, normalisation to IgG and to unstimulated condition). **b.** Repartition of CSF-1R ChIP-seq peaks on the genome of monocytes stimulated 6h with 100ng/mL CSF-1. **c.** Heatmap centered on gene transcription starting sites (TSS) of CSF-1R and H3K4me3 peaks in unstimulated and 6h CSF-1 exposed monocytes from 1 healthy donor among the three assessed. **d.** Venn diagram of peak calling (input normalization) from ChIP-seq experiment with sc-46662 anti-CSF-1R antibody performed on unstimulated monocytes and monocytes exposed to CSF-1 for 6h (healthy donor). **e.** IGV plots showing CSF-1R (in blue, ligth blue and red), H3K4me1 (orange) and H3K4me3 (purple) peak localization (ChIP-seq experiment) on *PU.1, CSF2RB* and *SYK* genes in monocytes before and after 6h or 3 days of stimulation by CSF-1 (TSS : transcription starting site, TTS : transcription termination site). **f.** Motif analysis of the CSF-1R ChIP-seq peaks from monocytes stimulated during 6h with 100ng/mL CSF-1.

Table 12					
Enrichment of Gene Ontology biological process terms in ChIP hits with CSF-1R in monocytes after 6h CSF-1 stimulation					
Go term ID	GO biological process	Fold Enrichment	P-value		
GO:0000184	Nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	2.00	2.52E-06		
GO:0019080	Viral gene expression	1.99	8.27E-07		
GO:0006614	SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane	1.94	9.12E-04		
GO:0019083	Viral transcription	1.94	4.13E-05		
GO:0045047	Protein targeting to ER	1.93	2.94E-04		
GO:0072599	Establishment of protein localization to endoplasmic reticulum	1.93	1.92E-04		
GO:0006613	Cotranslational protein targeting to membrane	1.92	6.74E-04		
GO:1902036	Regulation of hematopoietic stem cell differentiation	1.89	2.95E-02		
GO:0043620	Regulation of DNA-templated transcription in response to stress	1.89	8.78E-05		
GO:0006413	Translational initiation	1.88	5.87E-06		
GO:0061418	Regulation of transcription from RNA polymerase II promoter in response to hypoxia	1.87	4.34E-02		
GO:0000956	Nuclear-transcribed mRNA catabolic process	1.86	9.36E-09		
GO:0043618	Regulation of transcription from RNA polymerase II promoter in response to stress	1.86	4.46E-04		
GO:0006402	mRNA catabolic process	1.85	3.67E-09		
GO:0051444	Negative regulation of ubiquitin-protein transferase activity	1.85	3.10E-02		
GO:1901532	Regulation of hematopoietic progenitor cell differentiation	1.84	2.61E-02		
GO:0070972	Protein localization to endoplasmic reticulum	1.83	2.97E-04		
GO:0006401	RNA catabolic process	1.81	1.45E-09		
GO:0043484	Regulation of RNA splicing	1.79	3.79E-03		
GO:2000058	Regulation of protein ubiquitination involved in ubiquitin-dependent protein catabolic process	1.78	1.29E-02		
GO:0050684	Regulation of mRNA processing	1.77	1.39E-02		
GO:0061013	Regulation of mRNA catabolic process	1.75	3.13E-05		
GO:0043488	Regulation of mRNA stability	1.74	3.59E-04		
GO:1903311	Regulation of mRNA metabolic process	1.74	1.91E-09		
GO:0031397	Negative regulation of protein ubiquitination	1.74	2.07E-03		
GO:0006612	Protein targeting to membrane	1.73	3.20E-03		
GO:0043487	Regulation of RNA stability	1.73	2.06E-04		
GO:2000736	Regulation of stem cell differentiation	1.71	4.75E-02		
GO:1903900	Regulation of viral life cycle	1.71	9.30E-03		
GO:1903321	Negative regulation of protein modification by small protein conjugation or removal	1.70	2.21E-03		

CSF-1R is abnormally expressed and recruited on chromatin in CMML monocytes.

We then explored CSF-1R/chromatin interaction in monocytes collected from patients with a CMML, a myelodysplatic/myeloproliferative syndrome characterized by an abnormal expansion of circulating classical monocytes²⁰⁹. A decreased CSF-1R protein and mRNA expression in CMML patient monocytes (Fig. 20a,b) precluded CSF-1R ChIP-seq in most cases. Nevertheless, we succeeded in carrying out ChIP-seq experiments in monocytes of two patients by using a polyclonal CSF-1R antibody. As in healthy monocytes, CSF-1R was recruited mainly in intergenic and intronic regions (Fig. 20c). However, only 5% of peaks were common to healthy donor (Fig. 20d), *e.g.* in leukemic cells, CSF-1R recruitment on *CSF2RB* gene and *PU.1* last intron was conserved (Fig. 20e) whereas its recruitment on *PU.1* promoter was partially lost and a new location observed on *STAT6* promoter in monocytes from one patient. Pathway analysis of CSF-1R targets identified common pathways in healthy donor and CMML monocytes (Table 13) and suggested an additional role of CSF-1R in CMML cell migration. These results suggest a deregulated CSF-1R expression and chromatin recruitment in leukemic conditions.



Figure 20 : CSF-1R is abnormally expressed and recruited on chromatin in CMML monocytes. a. Total proteins were extracted from isolated control or CMML monocytes and analyzed by immunoblotting with antibodies that recognize CSF-1R and actin. **b.** *CFMS* expression was assessed by RNA-sequencing and qPCR in monocytes of 9 and 13 CMML patients respectively compared to 3 and 8 control buffy coats (Ctrl) (mean +/-SEM, *P<0.05, **P<0.01). **c.** Repartition of the CSF-1R ChIP-seq peaks (sc-692 antibody) on the genome in monocytes isolated from two CMML patients. **d.** Venn diagram of peak calling (input normalization) from ChIP-seq experiment with anti-CSF-1R sc-692 antibody performed on unstimulated monocytes from healthy donor (ctrl) and two CMML patients. **e.** IGV plots showing CSF-1R peak localization (ChIP-seq experiment) on *CSF2RB, PU.1* and *STAT6* genes in CMML (in pink and red) and control monocytes (N-ter : sc-46662 monoclonal antibody in blue, C-ter and CMML : sc-692 polyclonal antibody in light blue, TSS : transcription starting site, TTS : transcription termination site).

Table 13

Enrichment of Gene Ontology biological process terms in ChIP hits with CSF-1R in CMML monocytes (#1)					
Go term ID	GO biological process	Fold Enrichment	P-value		
GO:0007411	Axon guidance	1.44	1.29E-02		
GO:0097485	Neuron projection guidance	1.43	2.14E-02		
GO:0061564	Axon development	1.42	3.61E-05		
GO:0007409	Axonogenesis	1.41	2.06E-04		
GO:0048667	Cell morphogenesis involved in neuron differentiation	1.41	3.47E-05		
GO:0032990	Cell part morphogenesis	1.39	3.78E-06		
GO:0120039	Plasma membrane bounded cell projection morphogenesis	1.39	1.31E-05		
GO:0048858	Cell projection morphogenesis	1.39	1.15E-05		
GO:0030900	Forebrain development	1.39	3.09E-04		
GO:0048812	Neuron projection morphogenesis	1.39	2.12E-05		
GO:0050769	Positive regulation of neurogenesis	1.39	1.40E-04		
GO:0000904	Cell morphogenesis involved in differentiation	1.38	4.38E-06		
GO:0010720	Positive regulation of cell development	1.38	1.75E-05		
GO:0023014	Signal transduction by protein phosphorylation	1.38	1.51E-04		
GO:0030335	Positive regulation of cell migration	1.38	2.41E-04		
GO:2000147	Positive regulation of cell motility	1.38	1.43E-04		
GO:0051272	Positive regulation of cellular component movement	1.37	1.08E-04		
GO:0045666	Positive regulation of neuron differentiation	1.37	7.27E-03		
GO:0032147	Activation of protein kinase activity	1.37	1.21E-02		
GO:0048511	Rhythmic process	1.37	3.33E-02		
GO:0040017	Positive regulation of locomotion	1.37	7.00E-05		
GO:0051962	Positive regulation of nervous system development	1.37	6.05E-05		
GO:0000165	MAPK cascade	1.36	2.66E-03		
GO:0048638	Regulation of developmental growth	1.36	3.46E-02		
GO:0031175	Neuron projection development	1.36	4.91E-07		
GO:0022604	Regulation of cell morphogenesis	1.36	4.52E-04		
GO:0042493	Response to drug	1.36	1.11E-03		
GO:0000902	Cell morphogenesis	1.36	6.42E-07		
GO:0050804	Modulation of chemical synaptic transmission	1.35	4.13E-02		
GO:0060284	Regulation of cell development	1.35	1.36E-09		

Discussion

The present study demonstrates the presence of a fraction of CSF-1R in human primary monocyte nucleus and its recruitment to chromatin where it colocalizes with H3K4me1 mark and interacts with EGR1 to exert a repressive function. Upon CSF-1induced monocyte differentiation into macrophage, nuclear CSF-1R moves along the chromatin to eventually promote gene expression through interaction with YY1 and ELK transcription factors. Small molecule inhibitors of CSF-1R interfere with these nuclear functions that are otherwise altered in CMML monocytes.

Several RTKs modulate gene transcription either by interacting with transcription factors^{19,29}, carrying these proteins to the nucleus⁴³, promoting their recruitment to DNA⁷⁷ or phosphorylating nuclear proteins^{40,55}. ChIP-qPCR detected CSF-1R recruitment to *CCND1, CMYC, CJUN* and *CSF1* genes in breast cancer cells⁷⁰. Here, we demonstrate a physiological and dynamic role of CSF-1R in regulating gene expression along the differentiation of human monocytes. CSF-1R colocalizes with H3K4me1 on intergenic and intronic regions in monocytes and with H3K4me3 on promoter-TSS regions in macrophages, arguing for a nuclear CSF-1R function in the differentiation process, for example by modulating *CEBPD* and *KLF6* gene expression²⁹⁸.The molecular mechanisms that switch nuclear CSF-1R from a co-repressor to a co-activator of gene expression in monocytes exposed to CSF-1 will have to be deciphered.

The distinct CSF-1R interactions with chromatin among cell types is observed at the level of individual genes, *e.g.* CSF-1R is recruited to distinct sequences on *CMYC* and *CJUN* genes in macrophages and breast cancer cells. As CSF-1R lacks DNA binding domain, it may be recruited to DNA through interaction with other proteins, including transcription factors. In monocytes, CSF-1R interacts with EGR1 while ELK1 and YY1 become CSF-1R partners in macrophages. The lost interaction with EGR1 in macrophages correlates with its down-regulation along differentiation²⁹⁸ (and our not shown RNA-seq data).

CSF-1R relocalization to active genes with an H3K4me3 mark was detected as soon as 6h after CSF-1 stimulation without being totally similar to that observed after 72h of CSF-1 exposure, suggesting a dynamic pattern of CSF-1R recruitment to chromatin. Monocytes are plastic cells and future investigations will indicate how nuclear CSF-1R interacts with chromatin upon monocyte stimulation with CSF-1 and RANKL that promote monocyte differentiation into osteoclasts²⁶⁵, and with CSF-2 and IL-4 that induce dendritic cells formation¹⁸⁹.

Finally, CSF-1R expression and chromatin recruitment are altered in CMML patient monocytes, which argues further for the dysplastic nature of these cells and may impact CSF-1R nuclear functions and monocyte differentiation. Future investigations will indicate if CSF-1R alterations in CMML cells may be related to splicing and epigenetic disruptions that characterize this disease²⁴⁶.

Nuclear CSF-1R could also play an important role in CSF-1 capacity to instruct hematopoietic stem cell commitment towards monocyte lineage through promoting PU.1/SPI1 gene transcription as depicted in mice¹⁰⁷. CSF-1R differential recruitment on

PU.1/SPI1 sequence in monocytes and macrophages suggests a subtle regulation of this gene in response to CSF-1. More generally, CSF-1R nuclear functions could be shared with other RTK subfamily members as PDGF-R (Platelet-derived growth factor receptor), which was detected in cell nucleus, KIT/SCF-R (Mast/Stem cell growth factor receptor) and FLT3/FLK2 (Fms-like tyrosine kinase 3/Fetal liver kinase-2), whose nuclear localization remains to be explored. Finally, therapeutic strageties targeting these receptors are largely developed, *e.g.* CSF-1R-targeting strategies are used to deplete tumor-associated macrophages³⁶⁷, and how nuclear RTKs modulate the response to these drugs deserves investigation^{19,383}.

2.2 Supplementary materials and methods

2.2.1 Antibodies and reagents

For imaging cytometry, anti-CD34 PE, anti-CD38 PerCP-Cy5.5, CD123 PE-Cy7, anti-CD45RA APC-H7, anti-CD14 PE-Cy7 (BD Biosciences), anti-CD16 (sc-58962, Santa cruz Biotechnology), Alexa Fluor 488 Goat anti-Rat (for CD16) and Alexa Fluor 546 anti-Rabbit (for CSF-1R) (ThermoFisher Scientific) were used. Anti RAB5 (#2143) and anti-SEC61B (#14648) antibodies were purchased at Cell signaling Technology, anti-caspase 3 antibody (sc-7143) at Santa Cruz Biotechnology. Human recombinant CSF-2 was purchased at Miltenyi Biotech, IL-34 at R&D systems (Lille, France), IL-4 at Peprotech and LPS at Sigma-Aldrich. Hoechst used for live cell imaging was purchased at BD Biosciences.

2.2.2 Cell lines

U937 cell line was purchased at ATCC.

2.2.3 Monocyte subset isolation

Peripheral blood mononucleated cells (PBMC) were obtained from healthy donnor Buffy coats, separated on Fycoll-Hypaque. Total monocytes were sorted with magnetic beads (Pan monocyte isolation kit, Miltenyi Biotech) and the AutoMacs system.

2.2.4 CD34⁺ cells isolation

Peripheral blood mononucleated cells (PBMC) were obtained from healthy donnor Buffy coat or cord blood (Functional cellular therapy unit of Saint-Louis hospital, Paris, France) separated on Fycoll-Hypaque. CD34⁺ cells were sorted with magnetic beads and the AutoMacs system (Miltenyi Biotech)³⁸⁵.

2.2.5 Live cell imaging

Monocytes were differentiated 3 days with 100ng/mL CSF-1 in chamber slides, serum-deprived 1 hour and stained with 100ng/mL Hoechst (BD Biosciences) during 30 min, stimulated 15 min with 1 μ g/mL fluorescent CSF-1 before wash and living cell observation with a spinning disk microscope (Andor Technology, Belfast, UK) during 10 min (one minute delay between each image).

2.2.6 Total Protein extraction

Cells were lysed in 2X laemmli sample buffer (Bio-Rad) supplemented with 0.1M DTT and Protease inhibitor cocktail 1X (Roche, Sigma-Aldrich) 10 min on ice. The samples were then boiled 10 min at 95°C.

2.2.7 siRNA sequences

siRNA sequences targeting RAB5A and SEC61B are listed in table 14.

siRNA Target gene	Forward Sequence
RAB5A (1)	GGAGAGUCCGCUGUUGGCAAAUCAA
<i>RAB5A</i> (2)	CCAGGAAUCAGUGUUGUAGUAACUA
RAB5A (3)	CCAAUUUCAUGAAUUUCAAGAGAGU
SEC61B (1)	UCUUCUGUUCAUCGUUCUGUAUUU
SEC61B (2)	GGGAUGUGGCGAUUCUACACAGAAG
SEC61B (3)	ACCUGGGCUCAAAGUUGGCCCUGUU

Table 14 : RAB5A and SEC61B siRNA sequences

2.2.8 CSF-1R construct and mutagenesis

CSF-1R sequence containing pCMV6 vector was purchased at Origen (Rockville, USA). CSF-1R was cloned in pRRL vector with Golden Gate assembly Mix (NEB, Evry, France). NES sequence was deleted partially (DelNES1, deletion of residues 528 to 531) or completely (DelNES2, deletion of residues 528 to 537) with Q5 site-directed mutagenesis kit (NEB). NLS sequences [CCG AAA AAA AAA CGC AAA GTG (PKKKRKV)] were added in C-terminus and N-terminus of CSF-1R sequence using Q5 site-directed mutagenesis kit.

2.3 Unpublished results

2.3.1 Live cell imaging of CSF-1 shows its nuclear translocation

To further explore the mechanisms of CSF-1R nuclear translocation from the cell surface to the nucleus, we performed live cell imaging of AF488-labeled CSF-1 in CSF-1 differentiated macrophages. Cells were serum-deprived, then stimulated 15 min with fluorescent CSF-1 before wash and living cell observation with a spinning microscope (Fig. 21a). We observed CSF-1 entry into the nucleus (arrow), showing that a part of the internalized ligand is translocated to the nucleus. This observation supports the hypothesis that CSF-1 could mediate CSF-1R nuclear localization.

2.3.2 No effect of CSF-1R chemical inhibitors on CSF-1R gene regulation

To determine if nuclear CSF-1R kinase activity is required for gene expression regulation, we treated monocytes with CSF-1R kinase inhibitors during 6 hours and assessed the expression of identified CSF-1R target genes by qPCR (Fig. 21b). We did not observe any significant change in the expression of the studied genes. Thus, we were not able to validate the hypothesis that nuclear CSF-1R function may depend on its kinase activity.



Figure 21 : Live cell imaging of CSF-1 shows its nuclear translocation. No effect of CSF-1R chemical inhibitors on CSF-1R gene regulation. a. Monocytes were differentiated 3 days with 100ng/mL CSF-1, deprived 1h, stained with Hoechst and exposed 15 min to CSF-1F-AF488, then washed before image recording on a spinning disk microscope (1min delay between each image). **b.** mRNA expression (qPCR) of *PU.1, CSF2RB, CEBPD, KLF6, FGR,* and *SRC* genes in monocytes treated 6h with CSF-1R kinase activity inhibitors (BLZ945 at 50nM or GW2580 at 200nM, with a control DMSO).

а

2.3.3 Localisation of CSF-1R peaks on chromatin of monocytes and CSF-1differentiated macrophages

We did not report all the peaks identified by ChIP-seq experiments in the manuscript (Tables 15 and 16). In monocytes, CSF-1R was detected also on genes involved in matrix remodeling, fibroblast-growth factor (FGF) pathway, immune response and ROS generation. CSF-1R was also associated with genes encoding cytokine receptors (*CSF2RB, CFMS, KIT*) and essential transcription factors (*PU.1, MAFB, MAF* genes.). In macrophages, CSF-1R was localized on genes encoding SOCS and STAT proteins, transcription factors (*KLF4, YY1, GATA3, MAFB, ELK4*), cytokines (*VEGFA, TGFB, TNF*), cytokine receptors (*CFMS, IL20RA, IL17RA*) and proteins involved in TLR signaling.

Table 15					
CSF-1R peak	location in m	onocytes			
Chromosome	Peak Start	Peak End	Annotation	Distance to TSS	Nearest Gene Name
chr10	127984379	127984680	intron (NM_001288975, intron 2 of 18)	92598	ADAM12
chr10	128006709	128007196	intron (NM_001288975, intron 2 of 18)	70175	ADAM12
chr16	55477049	55477529	Intergenic	-35792	MMP2
chr16	55488818	55489126	Intergenic	-24109	MMP2
chr4	123706150	123706580	Intergenic	-41498	FGF2
chr11	69629805	69630090	intron (NM_005247, intron 2 of 2)	4245	FGF3
chr11	69624197	69624541	TTS (NM_005247)	9823	FGF3
chr13	22264347	22264680	intron (NM_002010, intron 2 of 2)	19298	FGF9
chr4	15941962	15942359	Intergenic	-1797	FGFBP1
chr10	123426737	123427075	Intergenic	-68934	FGFR2
chr16	27317246	27317761	Intergenic	-7727	IL4R
chr4	38754983	38756362	Intergenic	28939	TLR10
chr6	43721540	43721948	Intergenic	-16202	VEGFA
chr6	43705766	43706440	Intergenic	-31843	VEGFA
chr20	36942006	36943170	intron (NM_001725, intron 5 of 14)	10036	BPI
chr1	23004846	23006068	Intergenic	25775	C1QB
chr19	6719669	6720406	intron (NM_000064, intron 1 of 40)	625	C3
chr19	6717367	6718045	intron (NM_000064, intron 4 of 40)	2956	C3
chr16	57422460	57423181	Intergenic	-15859	CCL17
chr20	44815865	44816397	intron (NM 021248, intron 8 of 11)	69225	CD40
chr5	149476589	149476978	intron (NM 005211, intron 1 of 21)	-10580	CSF1R
chr22	37316878	37317612	intron (NM 000395, intron 1 of 13)	7570	CSF2RB
chr4	55627789	55628179	Intergenic	103889	KIT
chr19	18194431	18195516	intron (NM 001290023, intron 1 of 16)	2840	IL12RB1
chr1	67808040	67808444	intron (NR 047583, intron 8 of 13)	35195	IL12RB2
chr10	6060782	6061346	intron (NM 000417, intron 6 of 7)	-40914	IL15RA
chr16	28512507	28513240	intron (NM 145659, intron 4 of 4)	5282	IL27
chr10	3851098	3851515	Intergenic	-23833	KLF6
chr10	3844529	3845319	Intergenic	-17451	KLF6
chr16	50726346	50727265	Intergenic	-4245	NOD2
chr8	15846584	15847424	Intergenic	203296	MSR1
chr12	117833517	117833871	Intergenic	-34087	NOS1
chr12	117946185	117946822	intron (NM 173598. intron 14 of 19)	-146896	NOS1
chr6	155950750	155951196	Intergenic	-173936	NOX3
chr4	154583679	154584704	Intergenic	-21250	TLR2
chr9	120522158	120522441	Intergenic	55846	TLR4
chr8	48758060	48758290	intron (NM 001081640, intron 54 of 84)	-107449	CEBPD
chr8	48703976	48704242	intron (NM 001081640, intron 74 of 84)	-53383	CEBPD
chr12	96558030	96558552	Intergenic	-29916	FLK3
chr14	38162632	38162984	Intergenic	-98483	FOXA1
chr10	8154740	8155521	Intergenic	58463	GATA3
chr16	79581083	79581339	Intergenic	53411	MAF
chr20	39296008	39296724	Intergenic	21514	MAFR
chrq	37035936	37036424	Intergenic	-1704	ΡΔΧ5
chr11	47401560	47402076	Intergenic	-1691	SPI1
	., 101300	17 102070		1001	5111

Table 16

CSF-1R peak location in CSF-1-differentiated monocytes (3 days)					
Chromosome	Peak Start	Peak End	Annotation	Distance to TSS	Nearest Gene Name
chr6	31543442	31544821	intron (NM_000594, intron 1 of 3).3	787	TNF
chr16	11349060	11350812	5' UTR (NM_003745, exon 1 of 2)	103	SOCS1
chr2	46926395	46927154	intron (NM_144949, intron 1 of 1)	425	SOCS5
chr18	67956187	67957281	intron (NM_004232, intron 1 of 1)	597	SOCS6
chr17	76355122	76356280	promoter-TSS (NR_110847)	459	SOCS3
chr17	40540160	40540532	promoter-TSS (NM_213662)	59	STAT3
chr12	57504297	57505230	promoter-TSS (NM_001178079)	433	STAT6
chr17	40427481	40428831	intron (NM_012448, intron 1 of 18)	268	STAT5B
chr17	40440428	40440811	intron (NM_001288719, intron 1 of 17)	545	STAT5A
chr9	110250693	110251819	exon (NM_004235, exon 2 of 5)	791	KLF4
chr20	44815685	44816444	intron (NM_021248, intron 8 of 11)	69158	CD40
chr1	155023851	155024898	promoter-TSS (NR_040772)	626	ADAM15
chr14	23305616	23307090	intron (NM_004995, intron 1 of 9)	611	MMP14
chr19	41856786	41859360	intron (NM_000660, intron 1 of 6)	1765	TGFB1
chr5	135364532	135365643	intron (NM_000358, intron 1 of 16)	503	TGFBI
chr4	154583746	154584665	Intergenic	-21236	TLR2
chr4	154605409	154606104	intron (NM_003264, intron 1 of 2)	315	TLR2
chr16	85932689	85933561	intron (NM_002163, intron 1 of 8)	351	IRF8
chr5	131825726	131826415	intron (NM_002198, intron 1 of 9)	395	IRF1
chr7	128578167	128579014	intron (NM_032643, intron 1 of 8)	319	IRF5
chr4	185394845	185395598	intron (NM_002199, intron 1 of 8)	505	IRF2
chr3	38179959	38180844	exon (NM_001172567, exon 1 of 5)	432	MYD88
chr14	100704188	100705219	promoter-TSS (NM_003403)	-399	YY1
chr14	100706463	100707080	intron (NM_003403, intron 1 of 4)	1669	YY1
chr10	8154745	8155539	Intergenic	58475	GATA3
chr20	39316796	39318265	5' UTR (NM_005461, exon 1 of 1)	350	MAFB
chr1	205600370	205600768	intron (NM_021795, intron 1 of 2)	1431	ELK4
chr22	17565888	17566751	intron (NM_014339, intron 1 of 12)	470	IL17RA
chr6	43738301	43739918	promoter-TSS (NM_001287044)	-613	VEGFA
chr11	117856606	117859072	intron (NR_026691, intron 2 of 7)	733	IL10RA
chr5	149476513	149477205	intron (NM_005211, intron 1 of 21)	-10656	CSF1R
chr5	149464093	149466077	intron (NM_001288705, intron 1 of 20)	1118	CSF1R

2.3.4 Effect of CSF-2 on CSF-1R nuclear localization in human macrophages

Since a differential CSF-1R location on chromatin was observed in untreated and CSF1-treated monocytes, we also evaluated the impact of CSF-2, another cytokine that triggers monocyte differentiation into macrophages, on this localization.

2.3.4.1 CSF-1R is expressed in the nucleus of macrophages generated by CSF-2 induced differentiation of monocytes

Human monocytes were sorted from healthy donor peripheral blood and differentiated into macrophages by exposure to CSF-2 for 3 days. We used confocal microscopy to explore CSF-1R cellular localization in these cells. The receptor was detected in both cytoplasm and nucleus (Fig. 22a,b). Full length CSF-1R was identified in cell nuclear fraction by immunoblotting (Fig. 22c), and immunogold staining of CSF-1R allowed to detect the receptor in both heterochromatin and euchromatin of macrophage nucleus by electron microscopy (Fig. 22d). All together, a fraction of full-length CSF-1R remains in the nucleus of monocytes when induced to differentiate into macrophages upon CSF-2 exposure.



Figure 22 : CSF-1R is expressed in the nucleus of macrophages generated by CSF-2 induced differentiation of monocytes. a. Sorted peripheral blood human monocytes were differentiated 3 days with 100ng/mL CSF-2 and stained with an anti-CSF-1R antibody (Cter sc-692) or a control IgG (green) and Dapi (blue), followed by confocal imaging analysis. b. Quantification of the signal generated by CSF-1R labeling (green) and Dapi labeling (blue) according to the indicated axes (A.U. : arbitrary units, ROI : region of interest). **c.** 3 day CSF-2-differentiated macrophages were fractionated into cytoplasmic plus membrane (C+M) and nuclear (N) fractions and analyzed by immunoblotting with antibodies that recognize CSF-1R (Cell signaling #3152), Lamin B (N fraction) and caspase 3 (C+M fraction). **d.** Immunogold analysis of CSF-1R expression using the anti-Cter sc-692 antibody and electron microscopy in CSF-2-differentiated macrophages

2.3.4.2 CSF-1R is localized on the chromatin of CSF-2-differentiated macrophages

ChIP-Seq was performed with an anti-CSF-1R antibody in macrophages generated by exposure of monocytes from 3 healthy donors to CSF-2 for 3 days (monocyte samples are those analysed also by ChIP-seq in figures 15 and 18). Peak calling identified a mean number of 187,817 peaks per sample (range 47,538– 363,045), with 8.9% being common to 2 samples and 0.71% common to the three samples (Fig. 23a). Analysis of the 4,010 common peaks indicated that CSF-1R was recruited mainly to intergenic (54.5%) and intronic (41%) regions. A small fraction of CSF-1R was also present on promoter (2%), exonic (1%) and termination site regions (0.9%) (Fig. 23b). The mean distance of CSF-1R peaks to TSS was 109,110pb, which is close to that observed in monocytes (116,345pb) while CSF-1R peaks were closer to TSS (mean of 41,828pb) in macrophages generated by exposure to CSF-1.

ChIP-Seq experiments with histone marks H3K4me1 and H3K4me3 indicated that CSF-1R, which had moved around the TSS, colocalizes with H3K4me3 and H3K4me1 in CSF-2-treated monocytes (Fig. 23c). Comparison of peak localization in untreated, CSF-1 and CSF-2 treated monocytes identified 893common peaks (15.1% of peaks in untreated monocyte, 10.1% in CSF-1-treated and 15.1% in CSF-2-treated monocytes, respectively) (Fig. 23d).

The fraction of CSF-1R associated with H3K4me1 in CSF-2-treated monocytes is intermediate between untreated and CSF-1-treated monocytes, and the fraction associated with H3K4me3 is lower compared to the two other cell types (Fig. 23d). In CSF-2 treated cells, CSF-1R is close to genes involved in M2 polarization, PDGF-R signaling and inflammation (Table 17). Gene ontology analysis of CSF-1R-interacting genes in CSF-2-treated monocytes (Table 18) identifies many similarities with untreated monocytes with a strong enrichment in neuronal development and morphogenesis, cell differentiation with the exception of migration only present in macrophages. This suggests that CSF-2 modifies CSF-1R localization on DNA without significantlty modifying the regulated pathways.


Figure 23 : CSF-1R is localized on the chromatin of CSF-2-differentiated macrophages. a. Venn diagram of peak calling (input normalization) from ChIP-seq experiment (anti-CSF-1R sc-46662) performed on monocytes differentiated 3 days with 100ng/mL CSF-2 from 3 donors. **b.** Repartition of the 4,010 ChIP-seq peaks common to the 3 donors on the genome. **c.** Heatmap centered on gene transcription starting sites (TSS) of CSF-1R, H3K4me3 and H3K4me1 peaks in CSF-2-differentiated macrophages (3 days 100ng/mL). **d.** Venn diagram of CSF-1R peaks (common to the 3 donors) in untreated monocytes compared to 3 day CSF-1 treated and CSF-2 treated cells (100ng/mL), common CSF-1R and H3K4me3 peaks and common CSF-1R and H3K4me1 peaks.

Tak	ble	17
-----	-----	----

CSF-1R peak location in CSF-2-differentiated monocytes (3 days)					
Chromosome	Peak Start	Peak End	Annotation	Distance to TSS	Nearest Gene Name
chr11	102601669	102602162	Intergenic	-6230	MMP8
chr16	11335126	11335889	Intergenic	14532	SOCS1
chr17	40547557	40548267	Intergenic	-7399	STAT3
chr4	38734914	38736033	Intergenic	49138	TLR10
chr1	92298253	92298844	intron (NR_036634, intron 2 of 17)	53288	TGFBR3
chr7	506863	507492	Intergenic	52304	PDGFA
chr4	55061553	55062223	Intergenic	-33376	PDGFRA
chr1	23004982	23005886	Intergenic	25752	C1QB
chr19	6717399	6718129	intron (NM_000064, intron 4 of 40)	2898	C3
chr4	186991580	186992158	intron (NM_003265, intron 1 of 4)	1560	TLR3
chr16	3600979	3602059	intron (NM_178844, intron 11 of 20)	25886	NLRC3
chr20	36942013	36943035	intron (NM_001725, intron 5 of 14)	9972	BPI
chr17	5448401	5448998	intron (NM_001033053, intron 5 of 15)	39133	NLRP1
chr19	55486219	55486785	intron (NM_017852, intron 3 of 12)	8791	NLRP2
chr11	112008215	112008547	Intergenic	26459	IL18
chr5	43429453	43429862	Intergenic	-17169	CCL28
chr16	57441530	57442553	intron (NM_002987, intron 1 of 3)	3362	CCL17
chr20	44793315	44793799	Intergenic	46651	CD40
chr15	99223633	99224186	intron (NM_001291858, intron 1 of 20)	32141	IGF1R
chr1	150832957	150833402	intron (NM_001286036, intron 1 of 21)	16065	ARNT
chr8	48676141	48676880	Intergenic	-25784	CEBPD

Tab	le	18
-----	----	----

Enrichment of	Enrichment of Gene Ontology biological process terms in ChIP hits with CSF-1R in Macrophages (3 days CSF-2)				
Go term ID	GO biological process	Fold Enrichment	P-value		
GO:0021549	Cerebellum development	3.19	5.54E-04		
GO:0022037	Metencephalon development	3.01	1.19E-03		
GO:0003002	Regionalization	2.04	1.37E-03		
GO:0030900	Forebrain development	1.99	3.26E-04		
GO:0000904	Cell morphogenesis involved in differentiation	1.83	5.74E-04		
GO:0007420	Brain development	1.82	2.71E-06		
GO:0010975	Regulation of neuron projection development	1.82	8.02E-03		
GO:0060322	Head development	1.81	1.31E-06		
GO:0048858	Cell projection morphogenesis	1.80	4.67E-03		
GO:0120039	Plasma membrane bounded cell projection morphogenesis	1.79	6.23E-03		
GO:0048812	Neuron projection morphogenesis	1.79	8.29E-03		
GO:0032990	Cell part morphogenesis	1.78	4.20E-03		
GO:0048667	Cell morphogenesis involved in neuron differentiation	1.78	4.00E-02		
GO:0000902	Cell morphogenesis	1.77	1.31E-04		
GO:1905114	Cell surface receptor signaling pathway involved in cell-cell signaling	1.77	2.02E-02		
GO:0030182	Neuron differentiation	1.76	3.46E-08		
GO:0048666	Neuron development	1.76	5.18E-06		
GO:2000145	Regulation of cell motility	1.75	1.21E-05		
GO:0045664	Regulation of neuron differentiation	1.75	1.16E-03		
GO:0051270	Regulation of cellular component movement	1.73	4.93E-06		
GO:0007417	Central nervous system development	1.72	1.34E-06		
GO:0032989	Cellular component morphogenesis	1.72	9.23E-05		
GO:0120035	Regulation of plasma membrane bounded cell projection organization	1.72	3.93E-03		
GO:0030334	Regulation of cell migration	1.69	4.42E-04		
GO:0031175	Neuron projection development	1.69	2.20E-03		
GO:0031344	Regulation of cell projection organization	1.69	7.70E-03		
GO:0040012	Regulation of locomotion	1.67	7.41E-05		
GO:0043009	Chordate embryonic development	1.67	1.55E-02		
GO:0048699	Generation of neurons	1.66	4.68E-10		
GO:0009887	Animal organ morphogenesis	1.66	3.19E-05		

2.3.4.3 CSF-1R is localized on EGR1 motifs in CSF-2-differentiated macrophages

Analysis of CSF-1R recruiting motifs in CSF-2-treated monocytes identified GATA3 motif, which is common to untreated, CSF-1-treated and CSF-2-treated monocytes, EGR1, EGR2 and ARNT motifs, as in untreated monocytes, and C/EBP and OCT4 motifs, which were specific to CSF-2 treatment (Fig. 24a).

Co-immunoprecipitation of CSF-1R and EGR1 was observed after both 24h and 72h of monocyte exposure to CSF-2 (Fig. 24b,c). CSF-1R and EGR1 mostly regulate common pathways in untreated and CSF-2-treated monocytes, including cell differentiation, nervous system development and morphogenesis (Tables 19 and 20). CSF-1R and ELK1, which interact in CSF1-treated monocytes, regulate distinct pathways, including protein metabolism and modification as well as autophagy (Table 21). All together, CSF-1 and CSF-2 differentially modulate CSF-1R interaction with DNA and the regulated pathways.

a				
	Motif	Transcription factor	Target sequence with motif	P-value
	<u>IGFGIGGGEG</u>	EGR2	15.13%	1e ⁻⁶¹
	ŞIİSTÇÇAAIÇŞŞŞTÇ ŞA	As C/EBP	10.31%	1e ⁻¹³
	<u>ZGFGTGGGFGFZ</u>	EGR1	30.23%	1e ⁻⁸
	ZEPCACCCAE	ARNT/HIF1β	27.58%	1e ⁻⁵
		OCT4	7.65%	1e ⁻⁴
	AGAT & See See See See See See See See See S	😫 GATA3	4.14%	1e ⁻⁴



Figure 24 : CSF-1R is localized on EGR1 motifs in CSF-2-differentiated macrophages. a. Motif analysis of ChIP-seq experiment on 3 day CSF-2 differentiated monocytes (100ng/mL, peaks common to the three donors). **b,c.** Immunoprecipitation with anti-CSF-1R (sc-365719) or control IgG in monocytes stimulated 24h or 72h with 100ng/mL CSF-2 followed by immunoblotting with anti-CSF-1R and anti-EGR1.

Table 19

Enrichment of Gene Ontology biological process terms in ChIP hits with CSF-1R with EGR1 motif in Monocytes					
Go term ID	GO biological process	Fold Enrichment	P-value		
GO:0030574	Collagen catabolic process	4.83	4.21E-02		
GO:0090287	Regulation of cellular response to growth factor stimulus	2.77	1.93E-02		
GO:0051272	Positive regulation of cellular component movement	2.54	1.63E-04		
GO:0030900	Forebrain development	2.50	2.84E-03		
GO:2000147	Positive regulation of cell motility	2.49	5.62E-04		
GO:0040017	Positive regulation of locomotion	2.47	2.41E-04		
GO:0030335	Positive regulation of cell migration	2.47	1.39E-03		
GO:0048608	Reproductive structure development	2.25	3.27E-02		
GO:0061458	Reproductive system development	2.23	4.06E-02		
GO:0007420	Brain development	2.21	7.68E-05		
GO:0060322	Head development	2.17	8.73E-05		
GO:0071363	Cellular response to growth factor stimulus	2.16	3.97E-02		
GO:0045597	Positive regulation of cell differentiation	2.11	1.35E-05		
GO:0030334	Regulation of cell migration	2.07	1.63E-03		
GO:0045596	Negative regulation of cell differentiation	2.05	8.56E-03		
GO:2000145	Regulation of cell motility	2.05	8.39E-04		
GO:0051270	Regulation of cellular component movement	2.05	2.18E-04		
GO:0045664	Regulation of neuron differentiation	2.04	3.71E-02		
GO:0048646	Anatomical structure formation involved in morphogenesis	2.03	2.87E-04		
GO:0030182	Neuron differentiation	2.01	5.84E-05		
GO:0040012	Regulation of locomotion	1.99	9.60E-04		
GO:0048699	Generation of neurons	1.98	2.52E-08		
GO:0022008	Neurogenesis	1.98	4.03E-09		
GO:0007417	Central nervous system development	1.98	3.86E-04		
GO:0051094	Positive regulation of developmental process	1.97	1.53E-06		
GO:0051960	Regulation of nervous system development	1.96	3.62E-03		
GO:0048666	Neuron development	1.96	5.67E-03		
GO:0051240	Positive regulation of multicellular organismal process	1.94	4.33E-08		
GO:0060284	Regulation of cell development	1.93	5.43E-03		
GO:2000026	Regulation of multicellular organismal development	1.90	1.87E-09		

Table 20			

Enrichment of Gene Ontology biological process terms in ChIP hits with CSF-1R with EGR1 motif in Macrophages (3 days CSF-2)					
Go term ID	GO biological process	Fold Enrichment	P-value		
GO:0007420	Brain development	2.29	6.03E-03		
GO:0060322	Head development	2.23	8.89E-03		
GO:0030182	Neuron differentiation	2.05	8.78E-03		
GO:0007417	Central nervous system development	2.02	3.27E-02		
GO:0048699	Generation of neurons	1.89	1.37E-03		
GO:0022008	Neurogenesis	1.87	1.03E-03		
GO:0048468	Cell development	1.82	4.58E-03		
GO:0045595	Regulation of cell differentiation	1.69	4.85E-02		
GO:0009653	Anatomical structure morphogenesis	1.69	5.05E-03		
GO:0051239	Regulation of multicellular organismal process	1.63	3.03E-04		
GO:0007399	Nervous system development	1.61	1.40E-02		
GO:0032879	Regulation of localization	1.61	2.40E-03		
GO:0048513	Animal organ development	1.51	1.27E-02		
GO:0023051	Regulation of signaling	1.51	6.48E-03		
GO:0010646	Regulation of cell communication	1.48	3.47E-02		
GO:0030154	Cell differentiation	1.46	1.30E-02		
GO:0048731	System development	1.44	3.40E-03		
GO:0048869	Cellular developmental process	1.43	3.84E-02		
GO:0048523	Negative regulation of cellular process	1.43	2.49E-03		
GO:0007275	Multicellular organism development	1.40	3.38E-03		
GO:0048522	Positive regulation of cellular process	1.39	3.27E-03		
GO:0048856	Anatomical structure development	1.39	1.67E-03		
GO:0048518	Positive regulation of biological process	1.38	9.66E-04		
GO:0048519	Negative regulation of biological process	1.38	1.02E-02		
GO:0032502	Developmental process	1.35	1.04E-02		
GO:0032501	Multicellular organismal process	1.28	3.64E-02		

Table 21

Enrichment of Gene Ontology biological process terms in ChIP hits with CSF-1R with ELK motif in Macrophages (3 days CSF-1)				
Go term ID	GO biological process	Fold Enrichment	P-value	
GO:0035304	Regulation of protein dephosphorylation	3.57	2.76E-02	
GO:0051403	Stress-activated MAPK cascade	2.89	3.54E-02	
GO:0031098	Stress-activated protein kinase signaling cascade	2.85	2.34E-03	
GO:0042787	Protein ubiquitination involved in ubiquitin-dependent protein catabolic process	2.65	2.24E-02	
GO:1902275	Regulation of chromatin organization	2.49	1.90E-02	
GO:0000209	Protein polyubiquitination	2.41	1.94E-05	
GO:0038093	Fc receptor signaling pathway	2.40	4.14E-04	
GO:1903052	Positive regulation of proteolysis involved in cellular protein catabolic process	2.34	3.89E-02	
GO:0071826	Ribonucleoprotein complex subunit organization	2.33	7.49E-03	
GO:0022618	Ribonucleoprotein complex assembly	2.30	2.40E-02	
GO:0006914	Autophagy	2.26	3.84E-03	
GO:0061919	Process utilizing autophagic mechanism	2.26	3.84E-03	
GO:0002758	Innate immune response-activating signal transduction	2.22	2.51E-02	
GO:0002218	Activation of innate immune response	2.20	2.27E-02	
GO:0022613	Ribonucleoprotein complex biogenesis	2.20	3.92E-07	
GO:0016197	Endosomal transport	2.17	2.51E-02	
GO:0043161	Proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein catabolic process	2.15	3.17E-03	
GO:0016567	Protein ubiquitination	2.14	7.17E-11	
GO:0045732	Positive regulation of protein catabolic process	2.13	1.47E-02	
GO:0045862	Positive regulation of proteolysis	2.13	9.22E-05	
GO:0006511	Ubiquitin-dependent protein catabolic process	2.11	2.88E-06	
GO:0031331	Positive regulation of cellular catabolic process	2.10	1.84E-04	
GO:0044257	Cellular protein catabolic process	2.10	1.08E-07	
GO:0043632	Modification-dependent macromolecule catabolic process	2.09	2.51E-06	
GO:0006364	rRNA processing	2.09	4.93E-02	
GO:0033044	Regulation of chromosome organization	2.08	8.36E-03	
GO:0019941	Modification-dependent protein catabolic process	2.08	5.09E-06	
GO:0009896	Positive regulation of catabolic process	2.08	3.34E-05	
GO:0008654	Phospholipid biosynthetic process	2.08	3.56E-02	
GO:0051603	Proteolysis involved in cellular protein catabolic process	2.07	8.23E-07	

2.3.4.4 Cytokines and LPS impact on nuclear CSF-1R amout

CSF-1R nuclear intensity was quantified by confocal imaging on monocytes exposed to other cytokines, including IL-34, an alternative ligand of CSF-1R, and CSF-2 + IL-4 that are commonly used to differentiate monocytes into dendritic cells (Fig. 25a). We did not observe any significant difference in CSF-1R nuclear expression between unstimulated and cytokine treated monocytes, whatever the cytokine. Also, we did not detect any impact of LPS treatment at various concentrations and different time points, on nuclear CSF-1R (Fig. 25b). All together, neither cytokines nor LPS have limited impact on the nuclear localization of CSF-1R in human monocytes.



Figure 25 : Cytokines and LPS impact on nuclear CSF-1R amount. a. Peripheral blood monocytes were fixed and stained for CSF-1R or control IgG and Dapi followed by confocal imaging analysis of CSF-1R nuclear localization (MFI, mean fluorescence intensity) after exposure or not to 100ng/mL CSF-1 or 100ng/mL CSF-2, 100ng/mL IL-34, 50ng/mL IL-4 during 24h or 96h (mean +/- SEM of 3 independent experiments). b. Peripheral blood monocytes were fixed and stained for CSF-1R or control IgG and Dapi followed by confocal imaging analysis of CSF-1R nuclear localization (MFI, mean fluorescence intensity) after exposure or not (monocytes) to 100ng/mL CSF-1 during 24h or 96h followed by 4h exposure to LPS at the indicated concentrations (mean +/- SEM of 3 independent experiments).

2.3.5 Regulation of CSF-1R nuclear localization

2.3.5.1 CSF-1R doesn't localize in the nucleus of U937 cell line

We constructed a pRRL plasmid encoding CSF-1R without and with a partial (DelNES1) or complete (DelNES2) deletion of its putative NES or with NLS sequences added in C-ter and N-ter regions and transduced U937 cells with these constructs, using the empty vector as a control. U937 cells do not express CSF-1R, as assessed by immunoblotting (Fig. 26a). Upon transfection with these constructs, the receptor was detected at the cell surface or in the cytoplasm but never found in the nucleus (Fig. 26a,b). Of note, complete deletion of the putative NES sequence prevented the generation of fully glycosylated mature CSF-1R.



Figure 26 : CSF-1R doesn't localize in the nucleus of U937 cell line. a. U937 were transduced with PRRL-CSF-1R constructs or empty vector and fractionated into cytoplasmic plus membrane (Cytoplasm+Mb) and nuclear fractions and analyzed by immunoblotting with antibodies that recognize CSF-1R (Cell signaling #3152), Lamin B (N fraction) and Tubulin (C+M fraction). **b.** U937 were transduced with PRRL-CSF-1R constructs or empty vector and stained with an anti-CSF-1R antibody (Cter sc-692) or a control IgG and Dapi, followed by confocal imaging.

2.3.5.2 RAB5A and SEC61B down-regulation do not decrease CSF-1R nuclear amount

In mice, CSF-1R nuclear localization was reported to depend on RAB5A. SEC61B is involved in the nuclear translocation of many other RTKs. We down-regulated RAB5A and SEC61B expression with siRNAs in human monocytes, which did not induce any significant decrease in CSF-1R nuclear amount (Fig. 27a, Fig. 27 b showing siRNA efficiency). Either RAB5A and SEC61B are not involved in CSF-1R nuclear transport or the remaing protein amounts after si-RNA treatment are sufficient to induce CSF-1R nuclear localization.



Figure 27 : RAB5A and SEC61B down-regulation do not decrease CSF-1R nuclear amount. a. Monocytes were transduced with control or anti-RAB5A or SEC61B siRNA during 48h. Cells were fixed and stained for CSF-1R or control IgG and Dapi followed by confocal imaging analysis (MFI : mean fluorescence intensity, A.U : arbitrary unit). b. Monocytes were transduced with control or anti-RAB5A or SEC61B siRNA during 48h and proteins were extracted and analysed by immunoblotting with RAB5 (cs2143), Tubulin (cs3873) and SEC61B (cs14648) antibodies.

2.3.6 CSF-1R is in the nucleus of all human monocyte subsets and myeloid progenitors

2.3.6.1 CSF-1R is differentially expressed in the nucleus of monocyte subsets

Human monocytes are heterogeneous, with three subsets according to the cell surface expression of CD14 and CD16. CSF-1R expression is higher in intermediate and non classical monocytes compared to classical monocytes. In our previous experiments, we used CD14⁺ monocytes, which include a large majority of classical monocytes with 5 to 10% cells of the intermediate subset. We sorted total monocytes by depleting other PBMC with magnetic beads, stained these cells for CD14, CD16, CSF-1R and Dapi before performing amnis imaging (Fig. 28a). We observed an increase of nuclear CSF-1R in intermediate and non classical monocytes compared to classical monocytes (Fig. 28b).



Figure 28 : CSF-1R is differentially expressed in the nucleus of monocyte subsets. a,b. Monocytes were fixed and stained for CSF-1R (anti-Cter sc-692 in red), CD14 (light blue), CD16 (yellow) and Dapi (purple) followed by imaging flow cytometry (Amnis); **a.** Representative image; **b.** quantification of nuclear CSF-1R (mean +/- SD of 2 independent experiments, MFI : mean fluorescence intensity, A.U. : arbitrary unit).

2.3.6.2 CSF-1R is expressed in the nucleus of myeloid progenitors

CSF-1 was involved in monocyte commitment at the stem cell and myeloid progenitor levels by inducing *PU.1* gene. We observed an interaction of nuclear CSF-1R with *PU.1* gene in monocytes. We sorted cord blood and buffy coat CD34⁺ cells and stained these cells for CD34, CD38, CD45RA, CD123, Dapi and CD115 before amnis imaging. In the Dapi⁺ CD34⁺ CD38⁺ populations, we sorted CMP (common myeloid progenitor), GMP and MEP based on their CD123 and CD45RA expression (Fig. 29a) and studied CSF-1R nuclear location in these populations. As shown in Fig. 29b, we observed an intracellular and membrane CSF-1R staining in CMP and GMP but not in MEP. This was confirmed by quantification of nuclear CSF-1R intensity, showing an equivalent amount of nuclear receptor in CMP and GMP and a lower amount in MEP (Fig. 29c). We then compared the nuclear CSF-1R intensity labeling in CD14⁺ and CD34⁺ cells collected from the same donors with confocal imaging analysis (Fig. 29d) and did not observe any significant difference, suggesting that CSF-1R is already expressed in the nucleus of hematopoietic stem cells and progenitors and remained stably expressed along monocytic differentiation.



Figure 29 : CSF-1R is expressed in the nucleus of myeloid progenitors. a,b,c. CD34⁺ cells isolated from cord blood or buffy coat were fixed and stained for CSF-1R (anti-Cter sc-692), CD34, CD38, CD123, CD45RA and Dapi followed by imaging flow cytometry (Amnis); **a.** Gating strategy to discriminate CMP, GMP and MEP; **b.** Representative image (CD34 in yellow, CSF-1R in red, Dapi in blue); **c.** quantification of nuclear CSF-1R (mean +/- SD of 2 independent experiments, MFI : mean fluorescence intensity, A.U. : arbitrary unit). **d.** Monocytes and CD34⁺ cells isolated from the same buffy coats were fixed and stained for CSF-1R or control IgG and Dapi followed by confocal imaging analysis (mean +/- SEM of 3 independent experiments, MFI : mean fluorescence intensity, A.U. : arbitrary unit).

3 Discussion et perspectives

La thèse que je défends au terme de ce travail est qu'une fraction de CSF-1R est localisée dans le noyau des cellules hématopoïétiques à potentiel monocytaire où il exerce une fonction de co-régulateur de la transcription qui évolue au cours de la différenciation. Plus spécifiquement, mon travail a permis de montrer que :

- CSF-1R est au niveau du nucléoplasme des monocytes et des macrophages primaires humains.

- CSF-1R est probablement co-transporté depuis la membrane vers le noyau avec son ligand, CSF-1. Ce transport dépend de l'activation du récepteur. La quantité de CSF-1R nucléaire est également régulée par CRM1.

- CSF-1R est présent sur la chromatine et cette localisation évolue lorsque les monocytes sont exposés à des cytokines.

- CSF-1R colocalise avec des facteurs de transcription et des marques d'histones qui varient avec la différenciation cellulaire.

- CSF-1R est situé au niveau de gènes participant à la différenciation et à la polarisation des macrophages.

- CSF-1R a un rôle co-répresseur avec EGR1 dans les monocytes et co-activateur avec ELK1 et YY1 dans les macrophages générés par exposition de ces monocytes à CSF-1.

- L'expression de CSF-1R et sa localisation sur la chromatine sont altérés dans les monocytes de patients atteints de LMMC.

- CSF-1R est dans le noyau de toutes les populations de monocytes et dans certains progéniteurs myéloïdes.

Ces résultats suscitent de nombreuses questions. Nous envisagerons les mécanismes impliqués dans le transport nucléaire de CSF-1R, son activité de régulation de la transcription, et son rôle dans le noyau des progéniteurs, des sous-populations de monocytes et des macrophages générés dans différentes conditions *in vivo*.

3.1 Le transport nucléaire de CSF-1R

3.1.1 Séquences NLS et transport nucléaire de CSF-1R

Les observations que j'ai colligées suggèrent que CSF-1 est impliqué dans la translocation nucléaire de CSF-1R à partir de la membrane et induit l'activation du récepteur requise pour ce transport. Pour la plupart des autres RTKs étudiés, leur activation par un ligand est nécessaire à leur translocation et l'inhibition de l'activité kinase du récepteur bloque ce transport^{15,17}. La localisation nucléaire de CSF-1R avait déjà été décrite dans des macrophages murins⁶⁹ et CSF-1 semblait capable d'induire la phosphorylation de la forme nucléaire de CSF-1R. Nos résultats vont aussi dans ce sens.

Il a été proposé que CSF-1 sert de chaperonne à CSF-1R pour son acheminement jusqu'au noyau, CSF-1 possédant un NLS putatif constitué de trois résidus arginine en position 521-523. Ce mécanisme de transport a déjà été observé pour FGF-R1 qui est acheminé jusqu'au noyau grâce au NLS de son ligand, FGF-2, permettant l'interaction du récepteur avec l'importine- β^{39} . Dans le cas de CSF-1, les résidus constituant un NLS putatif sont situés dans le domaine cytoplasmique de la protéine et absents de la forme sécrétée et de la protéine recombinante utilisée dans ce travail. CSF-1R étant dépourvu de séquence NLS, il est donc probablement orienté vers le noyau par un autre interacteur recruté après son activation comme FMIP ou par des chaperonnes de type HSP (heat shock protein).

CSF-1 est co-transporté avec CSF-1R vers le noyau. Cette association pourrait permettre de maintenir le récepteur sous forme active. Certains ligands comme FGF-1 interagissent avec des protéines intracellulaires comme p53, indépendamment de leur récepteur³⁹⁰. La localisation nucléaire et intracellulaire de CSF-1 pourrait donc aussi lui permettre d'exercer un rôle propre. CSF-1 intracellulaire favoriserait la prolifération des macrophages¹⁶⁷ et la présence de CSF-1 dans le noyau de certaines tumeurs mammaires a été associée à un risque accru de développement de métastases et à une survie diminuée³⁹¹.

Que les observations antérieures soient exactes ou non, nos résultats suggèrent qu'il serait intéressant d'immunoprécipiter CSF-1 afin de déterminer ses interacteurs intracellulaires et d'explorer les éventuelles fonctions assurées par ce ligand dans le noyau.

3.1.2 Séquences NES/NLS et localisation nucléaire de CSF-1R

Nous avons montré que la localisation nucléaire de CSF-1R est régulée par les mécanismes d'export nucléaire dépendants de CRM1. L'étude de la séquence de CSF-1R a révélé une séquence d'export nucléaire (NES) putative. Cette séquence riche en leucines (LLLLLYK, score de 1 obtenu avec le logiciel NetNES³⁹²) correspond aux résidus 533 à 539 et se situe dans la partie transmembranaire du récepteur. Nous avons délété partiellement ou totalement cette région puis exprimé les formes mutées de CSF-1R dans la lignée myéloïde U937 (qui n'exprime pas nativement le récepteur). La délétion totale de cette séquence perturbe la synthèse et l'adressage du récepteur et conduit à

l'expression d'une forme immature de la protéine. La forme délétée partiellement est en revanche correctement exprimée mais ne montre aucune accumulation dans le noyau. Cependant, l'expression ectopique de la forme sauvage de CSF-1R dans les cellules U937 ne présente aucune localisation nucléaire, même après stimulation par CSF-1. Ces cellules ne constituent donc pas un bon modèle d'étude de la localisation nucléaire de CSF-1R et sont probablement dépourvue de la machinerie nécessaire à cette translocation.

L'ajout de NLS sur la séquence du récepteur est également insuffisante pour induire sa relocalisation dans les cellules U937. La lignée macrophagique THP-1 serait un meilleur modèle d'étude puisque nous avons pu détecter CSF-1R dans son noyau. Il sera donc possible de transduire ces cellules avec une forme mutée et étiquettée de CSF-1R pour étudier le rôle de cette séquence NES dans sa localisation nucléaire. Il serait également intéressant de développer un modèle murin avec CSF-1R fluorescent (couplé à la GFP par exemple) ou de transduire des cellules CD34⁺ ou des monocytes avec une telle construction afin de pouvoir suivre en temps réel la localisation de CSF-1R entre la membrane et le noyau.

CSF-1 possède également un NES putatif (séquence LQELSLRL correspondant aux résidus 112 à 119 avec un score de 0,6 obtenu avec le logiciel NetNES). Ce NES est présent dans les séquences des isoformes sécrétées et de la protéine recombinante. Il serait donc intéressant d'évaluer si cette séquence régule également l'export nucléaire de CSF-1R lorsque les deux protéines interagissent dans le noyau.

Si la localisation nucléaire de CSF-1R semble régulée par un mécanisme dépendant de CRM1, la fonctionnalité de la séquence NES reste à démontrer dans un modèle cellulaire adapté.

3.1.3 Sous quelle forme CSF-1R est-il présent au niveau nucléaire ?

3.1.3.1 CSF-1R est-il présent sous forme de fragment de clivage dans le noyau des monocytes ?

CSF-1R est détecté au niveau du noyau des monocytes et des macrophages humains sous forme d'holorécepteur, comme dans les macrophages murins et les cellules épithéliales humaines.

Il a été rapporté que, dans les macrophages exposés aux esters de phorbol, CSF-1R était clivé et que le fragment généré migrait dans le noyau⁶⁴. Nous n'avons détecté que le récepteur sous forme entière et un fragment C-terminal d'environ 28kDa dans le noyau des monocytes humains. L'absence des fragments de plus grande taille décrits précédemment est peut être liée à la faible activité de clivage de CSF-1R dans les cellules traitées par CSF-1 comparée aux esters de phorbol, ou à l'instabilité de cet ICD, le rendant difficile à étudier. Le fragment de 28kDa pourrait correspondre à un clivage de l'ICD mais aucun fragment de cette taille n'a été décrit auparavant.

La forme nucléaire majoritaire de CSF-1R, présente sur la chromatine, reste la forme entière et l'importance du mécanisme impliquant un clivage du récepteur semble bien moindre.

3.1.3.2 CSF-1R nucléaire, monomère ou dimère ?

Certains RTKs sont sous forme dimérique dans le noyau. Par exemple, ERBB2 et ERBB3 forment un hétérodimère sur le promoteur de la cycline D1³⁹³. Chez la souris, CSF-1 induit la phosphorylation du récepteur au niveau nucléaire. Dans les cellules humaines, CSF-1 induit la dimérisation et la phosphorylation du récepteur à la membrane, qui semblent nécessaires à la localisation nucléaire de CSF-1R. Enfin, nous avons observé une phosphorylation de CSF-1R nucléaire sur les tyrosines 708 et 723. Pour autant, nous n'avons pas détecté de dimère du récepteur dans le noyau : seule sa conformation monomérique a été observée. Cependant, nous ne pouvons pas exclure formellement la présence de dimères du fait de la faible sensibilité de la technique utilisée et de la quantité réduite de la protéine au niveau nucléaire.

3.1.4 Quelle voie de transport nucléaire peut emprunter CSF-1R?

Nos données suggèrent que CSF-1R est transporté vers le noyau depuis la membrane plasmique après interaction avec CSF-1 qui est co-transféré avec le récepteur. Cette translocation est probablement effectuée via les mêmes voies de transport que celles décrites pour les autres RTKs via l'appareil de Golgi et le RE. Nous n'avons pas pu montrer l'implication des protéines RAB5A et SEC61B dans ce transport à l'aide de siRNA. L'efficacité des siRNA n'étant cependant pas totale, nous ne pouvons exclure que les protéines résiduelles soient suffisantes pour médier le transport nucléaire de CSF-1R.

La présence de la forme immature de 130kDa de CSF-1R dans le noyau laisse supposer qu'il existe un autre mécanisme d'adressage du récepteur vers ce compartiment. Cette forme, partiellement glycosylée, n'est pas présente à la membrane mais dans le RE et l'appareil de Golgi. Il est possible que cette forme soit réacheminée vers le noyau depuis ces compartiments en réponse à CSF-1 puisqu'elle est également phosphorylée après exposition des cellules à cette cytokine¹⁶⁵.

Pour approfondir la connaissance de ces mécanismes, il est possible d'utiliser plusieurs composés bloquant le transport à différentes étapes : le dynasore inhibe l'endocytose clathrine-dépendante, la dansylcadavérine bloque le transport vésiculaire, la brefeldine A inhibe le transport rétrograde entre l'appareil de Golgi et le RE et le cyclohexane-bismethylamine la liaison de COP-I à la membrane²⁷. L'utilisation de digitonine permet de déterminer si le transport rétrograde utilise la voie INTERNET ou la voie INFS. La perméabilisation induite par ce détergent détache les transporteurs nucléaires solubles de l'enveloppe nucléaire, ce qui compromet l'import nucléaire des protéines cytoplasmiques et bloque le transport de FGF-R1 mais pas de l'EGF-R qui transite par la membrane du RE²².

Le transport de CSF-1R et des RTKs de la membrane plasmique vers le noyau soulève plusieurs autres questions :

1) Qu'est-ce qui gouverne le choix entre recyclage à la membrane, dégradation et transport rétrograde ?

Le blocage de la forme membranaire par un anticorps favorise le transport rétrograde des RTKs mais que se passe t-il en conditions physiologiques ? La concentration en ligand pourrait jouer un rôle : une concentration élevée favorise la dégradation de CSF-1R au détriment de son recyclage à la membrane¹⁶⁶.

2) Quels signaux sont utilisés pour ce transport rétrograde ?

Beaucoup de RTKs possèdent un NLS ou interagissent avec une protéine en possédant un. Cette séquence est-elle à elle seule suffisante pour acheminer le récepteur depuis la membrane plasmique ? Pour les protéines de la famille EGF-R, le NLS est situé dans la région intracytoplasmique, ce qui permet son exposition au niveau du cytosol tout au long du transport. Cela est cohérent avec le fait que les protéines nucléaires solubles sont synthétisées dans le cytoplasme où se trouvent l'importine-β et la machinerie de reconnaissance de ces signaux. Toutefois ce NLS est présent lorsque la protéine est synthétisée sans que celle-ci soit acheminée vers le noyau depuis le RE (à l'exception de FGF-R1 qui est, lui, dépourvu de NLS). Il est possible que la présence du peptide signal permette d'annuler l'effet du NLS au moment de la synthèse ou que la conformation du récepteur ne permette pas son interaction avec l'importine-β avant son activation à la membrane. Dans le cas où le ligand possède le NLS, comment se fait la reconnaissance de cette séquence et l'interaction avec l'importine-β ? Lorsque le ligand est endocyté avec le récepteur, il se trouve dans la lumière de la vésicule puis de l'appareil de Golgi. Cela suppose des mécanismes de reconnaissance de ces signaux au niveau de l'endosome et de l'appareil de Golgi.

3) Sous quelle forme les RTKs sont-ils présents dans le noyau?

CSF-1R a été décrit au niveau de l'enveloppe nucléaire des macrophages murins. En fait, chez l'homme, et c'est vrai pour la plupart des autres RTKs, chez la souris également, les holorécepteurs sont au niveau du nucléoplasme. SEC61B est capable d'extraire des protéines de la membrane du RE et agit probablement de façon similaire avec les RTKs nucléaires. Leur région transmembranaire serait alors recouverte par des protéines chaperonnes. Les RTKs pourraient aussi être enchassés dans des microvésicules nucléoplasmiques, leur région intracellulaire restant exposée et accessible pour une interaction avec l'ADN et d'autres protéines. Ces microvésicules ont été décrites en cas d'infections par des virus³⁹⁴ mais pourraient aussi être utilisées par les RTKs nucléaires.

Un autre mécanisme de transport entre le compartiment endosomal et le noyau a été identifié pour une toxine bactérienne³⁹⁵. La toxine est transportée directement depuis l'endosome vers le noyau par une vésicule qui fusionne avec l'enveloppe nucléaire. La toxine est alors libérée dans l'espace intermembranaire et transloquée vers le nucléoplasme grâce à SEC61. Ce transport pourrait être utilisé par certains RTKs mais les mécanismes d'adressage et d'ancrage des vésicules sont mal connus.

Les observations s'accumulent en faveur d'un rôle physiologique des RTKs au niveau nucléaire, en complément de, ou en compensation de, voire en opposition à, leur signalisation canonique à la membrane. Leur translocation est induite par leur ligand, mais aussi par des anticorps bloquants, des molécules chimiothérapeutiques ou des rayonnements ionisants. Elle fait partie des mécanismes physiologiques de signalisation, y compris lorsque la liaison au ligand et la signalisation à la membrane sont rendues impossibles par un anticorps ou que le récepteur n'est plus présent à la surface du fait de son activation. Ces mécanismes d'action non canoniques des RTKs enrichissent les fonctions qu'ils exercent au sein de la cellule, permettant d'affiner la signalisation sans impliquer de protéines supplémentaires.

La présence de CSF-1R au niveau du noyau indique que les fonctions physiologiques de ce récepteur ne sont pas limitées à la membrane. De nombreuses questions persistent concernant la nature et l'importance de ces fonctions nucléaires. La réponse à ces questions impose de mieux comprendre comment s'effectue son transport vers le noyau.

3.1.5 L'IL-34 et le transport nucléaire de CSF-1R

L'autre ligand de CSF-1R, l'IL-34, bien que n'ayant aucune homologie de séquence avec CSF-1, est capable d'activer son récepteur d'une façon globalement similaire. L'IL-34 ne possède pas de NLS ni de NES putatif. Nos données montrent qu'une stimulation de 24h des monocytes par l'IL-34 induit un recrutement plus faible de CSF-1R dans le noyau comparé à CSF-1. Cette différence disparaît après 4 jours d'exposition des monocytes aux cytokines. Il serait intéressant de déterminer si l'IL-34 est également acheminée avec CSF-1R jusqu'au noyau et si le recrutement du récepteur sur la chromatine y est identique. Les macrophages différenciés avec l'IL-34 sont légèrement différents de ceux obtenus avec CSF-1¹³¹. Il est possible qu'une régulation différentielle de CSF-1R nucléaire et de ses gènes cibles contribue à ces variations transcriptionnelles.

CSF-1 et IL-34, deux ligands pour un même récepteur et une répartition spatiotemporelle très différente. Une nouvelle question émerge : les effets de ces deux cytokines sur les fonctions nucléaires de CSF-1R sont-elles identiques ?

3.1.6 Comment CSF-2 participe t'il au transport nucléaire de CSF-1R?

CSF-1 induit la relocalisation de CSF-1R au niveau de la chromatine et il est transloqué avec son récepteur. De façon intéressante, la stimulation des monocytes avec CSF-2 modifie également la localisation de CSF-1R sur l'ADN, démontrant un recrutement cytokine-spécifique. Cependant, la translocation nucléaire du récepteur semble nécessiter son activation. Les monocytes stimulés *in vitro* par du CSF-2 produisent en réponse du CSF-1¹³⁴. Cette production autologue pourrait-elle expliquer le maintien de la quantité de CSF-1R nucléaire dans les macrophages différenciés par CSF-2?

L'effet du CSF-2 sur CSF-1R nucléaire passe t-il par CSF-1 ? Pour démontrer cette hypothèse, il serait intéressant d'inhiber l'effet du CSF-1 autologue à l'aide d'un siRNA et d'évaluer si la localisation nucléaire de CSF-1R est conservée dans ces cellules.

3.2 Fonctions nucléaires de CSF-1R

3.2.1 CSF-1R sur la chromatine

Dans le noyau des monocytes et des macrophages humains, nous démontrons que CSF-1R intervient dans la régulation de l'expression de certains gènes. Il pourrait donc participer à la différenciation des monocytes en macrophages, non seulement par ses fonctions canoniques de signalisation à la membrane, mais aussi par cette activité de co-régulateur transcriptionnel.

Plusieurs récepteurs de surface sont suspectés d'exercer des fonctions de régulation de la transcription. Des données de ChIP-seq ont été générées en précipitant IGF-1R³⁵ et EGF-R⁴⁹ dans des lignées cellulaires : IGF-1R est majoritairement dans les régions intergéniques, EGF-R au niveau des promoteurs-TSS sous forme phosphorylée avec l'ARN polymérase II, phospho-ERK 1/2 et phospho-MEK 1/2.

Dans les monocytes, CSF-1R a une localisation majoritairement intergénique et intronique. Dans les macrophages générés par culture de monocytes en présence de CSF-1, sa localisation est augmentée dans les régions exoniques et dans les promoteurs-TSS. CSF-1R colocalise donc surtout avec H3K4me1 dans les monocytes et H3K4me3 dans les macrophages générés en présence de CSF-1. CSF-1R est situé à distance des gènes (110kb en moyenne) dans les monocytes et plus proche des gènes (40kb) dans les macrophages générés en présence de CSF-1. Quelle que soit sa position, CSF-1R peut moduler la transcription : la régulation de l'expression des gènes peut se faire à distance, par exemple au niveau des enhancers³⁹⁶.

Les macrophages induits par CSF-2 ont une situation intermédiaire : CSF-1R colocalise principalement avec H3K4me1 comme dans les monocytes, mais il est en partie recruté au niveau des TSS comme dans les macrophages induits par CSF-1.

3.2.2 CSF-1R et les marques d'histone

Schématiquement, H3K4me1 marque les enhancers actifs^{386,387} et H3K4me3 marque les promoteurs fonctionnels. CSF-1R est au niveau des enhancers dans les monocytes, suggèrant qu'il régule l'expression de gènes de manière tissu-spécifique. Après une stimulation de quelques heures par CSF-1 et dans des cellules plus différenciées, CSF-1R est au niveau des promoteurs, suggérant qu'il contrôle l'expression de gènes activés lors de la différenciation et impliqués dans les fonctions des macrophages.

La colocalisation de CSF-1R et de marques d'histones suggère son recrutement au niveau de ces marques ou dans un complexe avec des histone méthyl-transférases (HMTs) qui méthylent l'histone H3. Il serait intéressant de voir si des inhibiteurs des HMTs diminuent le recrutement de CSF-1R sur l'ADN et si le blocage de l'expression de CSF-1R réduit la méthylation des histones au niveau des sites où il se trouve.

3.2.3 CSF-1R et facteurs de transcription

3.2.3.1 EGR1

Nous démontrons une interaction entre CSF-1R et EGR1 qui colocalisent au niveau de l'ADN dans les monocytes humains et dans les macrophages différenciés par CSF-2.

EGR1 est un facteur de transcription impliqué dans la monocytopoïèse et la polarisation des macrophages. Son expression est induite par PU.1 (et donc indirectement par CSF-1R) lors de la génération des monocytes et lors de la différenciation en macrophages induite par CSF-2³⁹⁷. EGR1 est en revanche réprimé lors de la différenciation en macrophages induite par le sérum²⁹⁸ et par CSF-1 d'après nos données de RNA-seq. EGR1 favorise l'expression de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire³⁹⁸. Il est induit par ELK1 en réponse au stress cellulaire³⁹⁹.

L'interaction d'EGR1 avec CSF-1R dans le noyau des monocytes pourrait permettre de limiter l'expression de certaines cibles de ce facteur de transcription et de réguler la réponse inflammatoire dans les monocytes non stimulés. L'étude des processus cellulaires contrôlés par les gènes comportant un motif de recrutement d'EGR1 suggère que CSF-1R régule négativement la migration, la différenciation et la réponse aux facteurs de croissance ainsi que les gènes impliqués dans le développement du système nerveux (ce qui pourrait être important dans le développement de la microglie). De façon similaire à CSF-1R, EGR1 est également recruté sur des motifs HOXA2, GATA3, HIF-1 β et C/EBP, suggérant une possible association des complexes CSF-1R-EGR1 avec ces autres facteurs de transcription sur la chromatine.

Dans les monocytes différenciés en macrophages sous l'effet du CSF-2, la localisation de CSF-1R change mais le récepteur régule les mêmes processus, à l'exception de la migration cellulaire. L'induction d'EGR1 lors de la différenciation par CSF-2 pourrait expliquer le maintien de cette interaction avec CSF-1R dans les macrophages.

EGR1 est un partenaire fort de CSF-1R dans le noyau des monocytes et leur interaction se maintient lorsque ces monocytes se différencient en macrophages sous l'effet de CSF-2. CSF-1R pourrait favoriser l'expression d'un phénotype inflammatoire dans ces cellules.

3.2.3.2 EGR2

CSF-1R est aussi recruté sur les motifs d'EGR2 dans les monocytes et les macrophages générés avec CSF-2. EGR2 est un régulateur de l'expression de CSF-1R, associé à une polarisation M2⁴⁰⁰.

Il faudra déterminer si CSF-1R a un effet positif ou négatif sur l'activité de ce facteur de transcription. Il est difficile de distinguer les interactions de CSF-1R avec EGR1 et EGR2 car leurs motifs de recrutement sont similaires.

3.2.3.3 ELK et YY1

Lors de la différenciation des monocytes en macrophages induite par CSF-1, l'interaction de CSF-1R avec la chromatine change plus nettement que sous CSF-2. CSF-1R est alors associé à ELK1 et YY1.

En réponse à l'activation de la voie MAPK, les protéines de la famille ELK (ELK1, ELK3 et ELK4) lient les éléments de réponse au sérum (SRE) en association avec SRF (serum response factor). EGR1 est une cible de ELK1 qui peut, selon son état de SUMOylation activer ou réprimer sa transcription^{399,401}. Il reste à déterminer si ELK1 participe à la diminution de l'expression d'EGR1 lors de la différenciation macrophagique induite par CSF-1. Les processus probablement régulés par CSF-1R au niveau de ces motifs comprennent la synthèse, les modifications et le catabolisme des protéines, la réponse au stress, le développement des réponses immunitaires innées et l'autophagie qui est nécessaire à la différenciation des monocytes en macrophages sous CSF-1⁴⁰². Ces données suggèrent que CSF-1R est impliqué dans la régulation de processus différents de ceux identifiés dans les monocytes et macrophages générés par CSF-2.

YY1 est un facteur de transcription capable d'activer ou de réprimer l'expression de ses gènes cibles via le recrutement d'HAT (histone acétyl-transférase) ou de HDAC (histone désacétylase). Dans les macrophages, il est impliqué dans l'induction de l'expression de gènes pro-inflammatoires en réponse au LPS³⁸⁹. Dans les lymphocytes en revanche, il active des gènes codant pour des cytokines de la réponse Th2⁴⁰³. De façon intéressante, YY1 est capable d'interagir avec GATA3 sur ces gènes, et GATA3 semble recruter CSF-1R à la fois dans les monocytes et les macrophages. Ces trois protéines pourraient former un complexe de régulation après activation des cellules par CSF-1.

Lors de la différenciation d'un monocyte en macrophage sous l'effet de CSF-1, CSF1-R change de partenaire dans le noyau. Son interaction avec ELK et YY1 ouvre la porte aux investigations cherchant à établir l'importance biologique de cet effet.

Nos expériences ont identifié d'autres séquences de recrutement de CSF-1R qui ne correspondent à aucun motif connu. Certains pourraient constituer des motifs alternatifs pour des facteurs de transcription déjà décrits, d'autres interagir avec des protéines moins étudiées. Quoiqu'il en soit, CSF-1R interagit avec divers partenaires dans le noyau pour participer à la régulation de l'expression des gènes, ce qui révèle un niveau de complexité supplémentaire dans l'exploration des effets biologiques de ce récepteur.

3.2.3.4 CSF-1R sur la chromatine : interaction directe ou indirecte ?

CSF-1R est recruté au niveau de la chromatine avec des facteurs de transcription qui varient selon les gènes cibles et le stade de différenciation. Le recrutement de CSF-1R sur de nombreux motifs différents suggère une interaction indirecte avec l'ADN via des facteurs de transcription plutôt qu'une liaison directe. La délétion d'un des facteurs de transcription avec lesquels interagit CSF-1R permettrait de démontrer cette hypothèse si cette délétion aboutit à l'abolition du recrutement du récepteur sur les motifs correspondants. Les motifs de recrutement identifiés lors de cette étude apportent des indications précieuses sur des interacteurs potentiels de CSF-1R, encore inconnus. La faible quantité de CSF-1R dans le noyau rend difficile la démonstration de ces interactions dans ce compartiment par immunoprécipitation. Des expériences de proximity-ligation assay pourraient valider ces interactions et leur localisation au sein de la cellule. Les facteurs de transcription n'étant pas exclusivement présents dans le noyau, leur liaison sur CSF-1R pourrait intervenir avant le transport du récepteur vers le noyau. C'est ce qui a été montré avec EGF-R qui interagit avec certains partenaires au niveau des endosomes⁴⁹. Ces facteurs de transcription pourraient alors participer au transport du récepteur vers le noyau.

3.2.3.5 Quel est le rôle de la phosphorylation de CSF-1R sur son activité au sein du noyau ?

La phosphorylation de CSF-1R nucléaire suggère que la kinase est active, comme la plupart des RTKs présents sous forme d'holorécepteur dans le noyau. L'utilisation d'inhibiteurs de l'activité kinase de CSF-1R n'a cependant pas d'effet sur l'expression des gènes qui semblent co-régulés par CSF-1R, suggérant que l'activité kinase du récepteur n'est pas impliquée dans cette fonction. CSF-1R agit donc probablement en recrutant des interacteurs au sein de complexes sur l'ADN.

Cependant, nous avons évalué l'expression d'un nombre limité de gènes cibles après traitement par les inhibiteurs. Cette expérience ne permet donc pas d'exclure complètement un rôle de l'activité kinase de CSF-1R sur la régulation d'autres gènes. D'autant que les inhibiteurs agissent sur la forme membranaire de CSF-1R, ce qui change aussi la signalisation intracellulaire et l'expression génique.

L'activité kinase de CSF-1R dans le noyau pourrait lui permettre de réguler d'autres fonctions, comme EGF-R qui régule la prolifération et la réparation de l'ADN. Ce type d'étude implique de déterminer les interacteurs nucléaires de CSF-1R, ce qui est difficile à faire dans des cellules primaires du fait de la faible quantité de récepteur dans ce compartiment. Ces expérimentations seraient possibles dans des lignées cellulaires par spectrométrie de masse ou par la méthode du double hybride, avec les limites liées à toute lignée, rarement représentative des cellules primaires³⁹⁰.

CSF-1R est au niveau du noyau des monocytes humains sous forme d'holorécepteur monomérique phosphorylé. Beaucoup d'incertitudes persistent concernant le rôle de sa phosphorylation, l'identité de ses partenaires et la diversité de ses fonctions.

3.2.3.6 CSF-1, CSF-2 et les interacteurs de CSF-1R sur l'ADN

CSF-1R ne se comporte pas de la même façon dans le noyau des monocytes traités par CSF-1 et dans celui des monocytes traités par CSF-2. L'état d'ouverture différentiel de la chromatine entre les deux types de macrophages pourrait expliquer ce phénomène, CSF-1R n'ayant pas accès aux mêmes gènes. L'expression et l'activité des facteurs de transcription varie aussi avec la différenciation et la polarisation cellulaire. Par exemple, l'expression d'EGR1 augmente en réponse au CSF-2 et diminue en réponse à CSF-1, d'où une absence de recrutement de CSF-1R sur les motifs EGR1 dans les macrophages différenciés par CSF-1.

3.2.4 CSF-1 modifie les patterns de gènes sur lesquels CSF-1R interagit

Dans les monocytes, les gènes situés à proximité des sites de recrutement de CSF-1R sur la chromatine sont impliqués dans la régulation de la morphogénèse et du développement. Dans les macrophages générés par exposition de ces monocytes à CSF-2, on retrouve des fonctions globalement similaires. Dans les macrophages générés par exposition de ces monocytes à CSF-1 en revanche, CSF-1R est au niveau de gènes de la phagocytose, de la signalisation des récepteurs Fc et du VEGF, de la réponse à l'hypoxie et au stress, de la régulation du catabolisme des protéines. CSF-1R a donc un rôle dans la définition du phénotype des macrophages générés par exposition à CSF-1, alors que son rôle semble limité dans la génération de macrophages par exposition à CSF-2.

Cette analyse est renforcée par le fait que, dès 6 heures d'exposition des monocytes à CSF-1, on détecte une relocalisation de la protéine au niveau des promoteurs et de la marque H3K4me3, avec une réduction de la distance moyenne au TSS (60kb) par rapport à celle mesurée dans les monocytes non stimulés. Certains des réseaux ciblés sont distincts de ceux observés dans les monocytes mais aussi de ceux observés dans les macrophages obtenus après 3 jours d'exposition à CSF-1. Les motifs de fixation sont également propres à cette étape de la différenciation (comme STAT5), indiquant une régulation dynamique de cette interaction au cours de la différenciation des monocytes en macrophages.

STAT5 est un facteur de transcription activé par la signalisation à la membrane de CSF-1R. De façon intéressante, il pourrait aussi interagir avec le récepteur dans le noyau, après activation de ce dernier par CSF-1. Il est envisageable que les deux protéines interagissent d'abord à la membrane puis soient co-transportées vers le noyau, STAT5 permettant alors l'acheminement de CSF-1R vers ce compartiment.

Lors de la différenciation en macrophages, les monocytes subissent de profonds changements d'expression des gènes, de l'épissage des pré-ARN messagers et de la synthèse des protéines. La présence de CSF-1R au niveau de gènes régulant ces processus après 6 heures de stimulation suggère que le récepteur pourrait participer à la différenciation des macrophages au niveau nucléaire.

3.2.5 Gènes cibles de CSF-1R

3.2.5.1 Polarisation et fonctions des macrophages

Dans les monocytes, CSF-1R est présent à proximité et dans les introns de gènes impliqués dans certaines fonctions macrophagiques M2 (*MMP2, FGF, IL4R, VEGFA*) et surtout M1 (*BPI*, protéines du complément, *CD40, CCL17, IL12R, MSR1, NOD2, NOS, TLR2, TLR4, KLF6* qui régule la migration et la réponse inflammatoire des macrophages⁴⁰⁴). Son rôle répresseur dans ces cellules suggère que CSF-1R pourrait empêcher l'expression de gènes de l'inflammation en l'absence de stimulation des monocytes. CSF-1R est aussi présent en amont du gène *PAX5* qui réprime l'expression de CSF-1R dans les lymphocytes B.

Dans les macrophages générés par CSF-1, on trouve, parmi les cibles de CSF-1R, de nombreux gènes impliqués dans la polarisation M2 (*STAT3, STAT6, SOCS1, KLF4, TGFB*,

VEGFA, IL10RA, MMP14) mais aussi dans la polarisation M1 (*STA5A, STA5B, SOCS3, CD40, IL17RA, IRF1, IRF5, TNF*). Le rôle plutôt activateur de CSF-1R dans ces macrophages suggère qu'il participerait à l'expression de ces facteurs pour favoriser leur polarisation M1 ou M2 selon les cytokines auxquelles ils seront exposés. Dans ce contexte, il serait intéressant de rechercher une interaction entre CSF-1R et NPM1 dès que les monocytes sont stimulés, puisque notre équipe a montré que ce régulateur transcriptionnel, clivé par les caspases lors de la différentiation sous CSF-1, était resynthétisé dans les macrophages stimulés par le LPS et régulait alors la transcription des gènes des cytokines¹⁶⁰.

Dans les macrophages générés par CSF-2, CSF-1R est plutôt localisé sur des gènes impliqués dans le développement de l'inflammation et de la réponse immunitaire (*BPI, NLRP1, NLRP2, NLRC3, IL18, CD40, CCL28, CCL17, IL6R*) mais aussi sur des gènes associés à la polarisation M2 et à l'inhibition de l'inflammation (*PDGFA, SOCS1, STAT3, TLR10, PDGFRA*).

Ces résultats soulignent le rôle ambivalent de CSF-1R au niveau du noyau. Il est possible qu'il régule différemment ces ensembles de gènes ou bien qu'il contribue à maintenir le potentiel de polarisation de ces macrophages.

3.2.5.2 Autorenouvellement

CSF-1R est retrouvé à proximité des gènes codant pour *MAFB* et *MAF* dans les monocytes et *MAF* dans les macrophages. Son rôle répresseur dans les monocytes pourrait favoriser l'activation des gènes d'autorenouvellement lors de leur différenciation en diminuant l'expression de ces deux facteurs de transcription. Après différenciation par CSF-1 en revanche, CSF-1R pourrait activer *MAF* pour limiter la prolifération des macrophages, en lien avec le fait que, chez l'homme, *in vitro*, ces cellules ne prolifèrent pas en réponse à CSF-1. Nous observons d'ailleurs une augmentation de l'expression de *MAF* par RNA-seq dans les macrophages différenciés par CSF-1. Nous n'avons en revanche pas identifié CSF-1R à proximité de SIRT1, un autre régulateur important de l'autorenouvellement des macrophages³²⁴.

3.2.5.3 Facteurs de transcription

CSF-1R est présent sur certains des gènes codant ses potentiels interacteurs comme *FOXA1, ELK3, GATA3, ELK4, YY1* et *ARNT*, indiquant qu'il pourrait participer à la régulation de leur expression. CSF-1R est aussi présent à proximité du gène *CFMS* dans les monocytes et les macrophages induits par CSF-1, pouvant ainsi contrôler sa propre expression.

Toutes ces données suggèrent une implication de CSF-1R nucléaire dans la régulation de l'expression de gènes participant à la différenciation, à la polarisation et aux fonctions des macrophages. Son rôle principalement co-répresseur semble évoluer vers un rôle co-activateur dans les monocytes exposés à CSF-1. Il est associé à différents facteurs qui peuvent avoir un rôle inhibiteur ou activateur de la transcription. L'ensemble suggère une fonction de co-régulateur transcriptionnel.

3.2.5.4 Contrôle du niveau d'expression de *PU.1*

PU.1 est un facteur de transcription clé de la différenciation myéloïde et monocytaire. Il régule l'expression de CSF-1R et il est également activé par la signalisation du récepteur.

Nous avons identifié *PU.1* comme une des cibles de CSF-1R et d'EGR1 dans les monocytes. L'utilisation de siRNA ciblant CSF-1R a montré un faible effet inhibiteur du récepteur sur l'expression de *PU.1* dans des monocytes non stimulés. Cette localisation au niveau du promoteur de *PU.1* disparait dans les macrophages. Ces observations suggèrent un rôle de contrôle du niveau d'expression de *PU.1* dans les monocytes par CSF-1R. CSF-1 et CSF-2 déplacent CSF-1R sur la chromatine, possiblement pour induire une expression plus forte du gène.

Le rôle de CSF-1R dans le contrôle de l'expression de *PU.1* dans des cellules plus immatures pour favoriser ou inhiber leur orientation vers le lignage myéloïde et monocytaire mérite d'être exploré.

3.2.6 Rôle des autres cytokines

CSF-2 et CSF-1 induisent une relocalisation de CSF-1R sur l'ADN. Il serait intéressant de déterminer si d'autres stimuli et cytokines induisent également une localisation spécifique de CSF-1R.

Dans cette étude, nous n'avons pas vu de différence quantitative de CSF-1R au niveau du noyau entre monocytes stimulés par CSF-1 (à 24h on observe une augmentation modeste par immunofluorescence, non observée par immunoempreinte, et qui n'est pas maintenue en fin de différenciation), CSF-2, IL-4 ou LPS.

Des ChIP-seq permettraient de déterminer si le LPS ou d'autres stimuli (IL-13, IL-10, IFN- γ ...) régulent la polarisation des cellules en modifiant la localisation de CSF-1R sur la chromatine. Cette étude semble d'autant plus pertinente que les macrophages présentent des signatures transcriptionnelles particulières selon le stimulus induisant leur polarisation²⁹⁷.

3.2.7 CSF-1R nucléaire et différenciation des ostéoclastes ?

CSF-1R est impliqué dans la différenciation des ostéoclastes lorsqu'il est associé à RANKL, à partir des monocytes ou d'un progéniteur médullaire. L'analyse des pathways effectuée sur les données de ChIP-seq dans les monocytes a montré que CSF-1R est localisé en partie sur des gènes participant à l'ossification et à la régulation de la différenciation des ostéoblastes.

Dans les macrophages, qu'ils soient générés par du CSF-1 ou du CSF-2, on n'observe plus cette localisation de CSF-1R à proximité de gènes régulant ces fonctions. De façon intéressante, l'absence de recrutement de CSF-1R sur les gènes impliqués dans l'ossification dans les macrophages correspond à la perte du potentiel de différenciation en ostéoclastes de ces cellules. Cela renforce l'hypothèse d'un rôle possible de CSF-1R nucléaire dans la différenciation des monocytes en ostéoclastes. Il serait pertinent de déterminer si RANKL est capable de modifier les gènes cibles de CSF-1R pour l'orienter d'avantage à proximité de gènes régulant les fonctions des ostéoclastes plutôt que vers les macrophages.

3.3 Rôle de CSF-1R nucléaire dans les autres cellules hématopoïétiques

3.3.1 CSF-1R nucléaire peut-il être impliqué dans la différenciation des progéniteurs myéloïdes ?

Des expériences préliminaires ont permis de détecter CSF-1R dans le noyau de cellules CD34⁺ humaines. L'analyse par imagerie en flux indique que CSF-1R serait présent dans le noyau des progéniteurs myéloïdes CMP et GMP. Cette étude doit être complétée et validée mais suggère un rôle de cette forme nucléaire dans la différenciation des progéniteurs.

Dans les monocytes et les macrophages, CSF-1R est présent au niveau du promoteur de *PU.1* mais aussi à proximité d'autres facteurs de transcription contrôlant la différenciation comme *PAX5, KLF4, MAFB, IRF8, FOS* et *JUN*. Il serait intéressant de déterminer la localisation sur la chromatine de CSF-1R dans les différents progéniteurs et sa capacité à contrôler leur expression pour favoriser ou non l'orientation de la différenciation vers la lignée monocytaire.

Dans les cellules souches murines, CSF-1 a un rôle instructeur pour orienter leur différenciation vers le lignage myéloïde via l'induction de *PU.1*. Dans ces cellules, CSF-1R n'est normalement pas ou peu exprimé à la membrane. Le rôle de CSF-1R nucléaire dans la réponse des cellules souches à CSF-1 mérite d'être exploré.

3.3.2 CSF-1R nucléaire peut-il être impliqué dans la génération des souspopulations monocytaires ?

Les monocytes sont classés en trois sous-populations qui présentent différents niveaux d'expression de CSF-1R. En lien avec l'expression globale du récepteur, il semble être en plus grande quantité dans le noyau des monocytes intermédiaires et non classiques. Cela suggère que son rôle nucléaire dans ces cellules pourrait être plus important que dans les monocytes classiques.

CSF-1 étant probablement impliqué dans la génération de ces sous-populations, il serait intéressant de déterminer si son récepteur est localisé différemment sur la chromatine et participerait à leur différenciation. Dans les monocytes classiques, nous avons observé que CSF-1R était présent sur certains gènes impliqués dans l'ossification. Cette signature disparait lors de la différenciation en macrophage. Nous avons alors émis l'hypothèse que cette localisation pouvait être liée aux capacités de différenciation des monocytes en ostéoclastes en réponse à CSF-1 et au RANKL. Il a été montré que les monocytes CD16⁺ sont incapables de donner naissance à des ostéoclastes (*in vitro*, en

condition physiologique). Il serait alors pertinent de vérifier si cette signature génique de CSF-1R disparait dans les monocytes intermédiaires et non classiques.

Plus généralement, ces deux populations semblent avoir un potentiel de différenciation plus restreint comparées aux monocytes classiques puisqu'elles ne peuvent se différencier en ostéoclastes ni en cellules dendritiques en réponse au CSF-2 et à l'IL-4⁴⁰⁵. Les monocytes CD16⁺ représentent donc bien des stades de différenciation plus avancés des monocytes classiques avec des capacités de différenciation plus limitées. En revanche, tous ces monocytes peuvent se différencier en macrophages en réponse au CSF-2 ou à CSF-1. Toutefois la production de cytokines et les capacités de phagocytose de ces macrophages diffèrent selon les monocytes d'origine.

Cela suggère que les trois sous-populations de monocytes peuvent donner naissance à des macrophages différents en réponse aux mêmes stimuli comme observé dans certaines pathologies chez la souris. L'expression différentielle de CSF-1R à leur surface et au niveau nucléaire pourrait expliquer ces différences.

3.4 Rôle de CSF-1R nucléaire en conditions pathologiques

Les macrophages sont impliqués dans de nombreuses pathologies humaines dans lesquelles leur rôle positif ou négatif dépend de leur polarisation. Il faudra déterminer si les observations effectuées sur les macrophages générés *in vitro* sont valables *in vivo*. Nous avons constaté que la répartition de CSF-1R sur l'ADN variait selon le stade de différenciation et les cytokines. Les macrophages tissulaires constituant des populations individuelles, il est possible que CSF-1R présente des localisations spécifiques à chacune d'entre elles. Toutefois, ces macrophages ne dérivant pas des monocytes sanguins, il est envisageable que CSF-1R ne présente pas la même localisation que dans les macrophages que nous avons générés *in vitro*.

3.4.1 LMMC

La LMMC se caractérise par une expansion des monocytes classiques²⁰⁹. CSF-1 induit chez l'homme une augmentation de la fraction des monocytes CD16⁺ (intermédiaires et non classiques), l'inactivation du récepteur ayant un effet inverse. L'accumulation de monocytes classiques dans la LMMC pourrait s'expliquer, au moins en partie, par la perte d'expression de CSF-1R. A l'exception d'un patient présentant une délétion du bras long du chromosome 5 comprenant *CFMS*⁴⁰⁶, il n'a pas été observé d'altération du gène dans la LMMC. Les données concernant la concentration plasmatique de CSF-1²⁵⁸ et l'augmentation de l'expression de CSF-1R à la surface des monocytes ²⁰⁹ sont controversées. Nous observons une très forte diminution de l'expression de CSF-1R dans les monocytes de nombreux patients atteints de LMMC. Notre équipe avait observé précédemment une diminution de son ARNm chez les patients présentant une réduction de l'expression de TIF-1 γ ³⁸⁵. La diminution de l'expression de *CFMS* pourrait également être liée aux mutations d'*AML-1*, aux perturbations épigénétiques et de l'épissage ainsi qu'à des modifications d'expression d'autres facteurs qui régulent son expression. Ces résultats doivent être confirmés sur un plus grand nombre de patients en vérifiant l'état de méthylation du promoteur de *CFMS*, l'expression de facteurs comme PU.1 ou les EGR dans les monocytes de LMMC⁴⁰⁷ et la réponse des monocytes de ces patients à CSF-1. L'activation constitutive de la voie Ras, en particulier lorsque CBL est muté, devrait modifier la signalisation en aval du récepteur, son internalisation, sa dégradation et son adressage au noyau, altérant la maturation des monocytes.

Chez les deux patients que nous avons pu analyser par ChIP-Seq, nous avons observé des modifications de l'interaction CSF-1R / chromatine. Le récepteur est localisé dans les régions intronique et intergénique mais à une distance plus faible du TSS (89 et 69kb dans les LMMC#1 et 6 respectivement contre 110kb dans les monocytes sains). Seuls 5% des pics CSF-1R sont communs avec ceux des monocytes du donneur sain contre 15% de pics communs entre deux donneurs sains. Par ailleurs certains pics observés avec les deux anticorps ciblant CSF-1R ne sont pas retrouvés chez les patients comme au niveau du promoteur de *PU.1* tandis que de nouveaux pics absents des monocytes contrôles sont détectés (*STAT6*). En revanche aucune modification significative des motifs de recrutement de CSF-1R n'est observée dans les monocytes de patients comparés aux monocytes contrôles.

Ces données suggèrent une altération de la localisation de CSF-1R sur la chromatine chez les patients atteints de LMMC, lorsque le récepteur y est encore présent en quantité suffisante pour être détecté. Il reste encore à évaluer si les fonctions de régulation de l'expression des gènes par CSF-1R nucléaire sont conservées chez ces patients dans les monocytes et lors de leur différenciation en macrophages. Une altération de l'expression globale et des fonctions nucléaires de CSF-1R pourrait participer au phénotype dysplasique observé dans les monocytes leucémiques.

Enfin, les monocytes peuvent s'accumuler dans le sang dans d'autres circonstances pathologiques, par exemple dans les monocytoses réactionnelles, et il serait intéressant d'explorer le rôle de CSF-1R nucléaire dans ces conditions.

3.4.2 Macrophages infiltrant les tumeurs

Même en l'absence de mutation affectant les monocytes et les macrophages, il est possible que CSF-1R soit relocalisé différemment sur l'ADN. A notre connaissance, la localisation nucléaire de CSF-1R n'a pas été observée dans les macrophages infiltrant les tumeurs, notamment dans les cancers du sein où CSF-1R a été identifié dans le noyau des cellules tumorales. D'autres études sont nécessaires afin de déterminer si CSF-1R nucléaire est présent ou non dans les TAMs. Sa signalisation, différentielle de celle induite par la forme membranaire, pourrait avoir un impact sur la génération de ces cellules.

De plus, des molécules ciblant CSF-1R sont actuellement en développement afin d'inhiber la différenciation et le recrutement des TAMs, mais aussi de favoriser leur polarisation vers un phénotype anti-tumoral. La forme nucléaire d'autres RTKs est souvent associée au développement de résistances aux thérapeutiques ciblées et aux anticorps monoclonaux. Dans le cas de CSF-1R, nous avons montré que l'utilisation d'inhibiteurs de son activité kinase diminuait sa localisation nucléaire. CSF-1R étant acheminé de la membrane vers le noyau en réponse à son ligand, il faudrait déterminer si les anticorps bloquants inhibent également ce transport en empêchant la liaison au ligand et l'activation du récepteur.

Nous avons mené ce type d'expérience mais sans pouvoir obtenir de résultat reproductible. Nos données actuelles suggèrent que les molécules ciblant l'activité kinase de CSF-1R pourraient également cibler sa forme nucléaire et donc inhiber le récepteur de façon globale dans les macrophages.

3.5 c-KIT peut-il être localisé dans le noyau ?

Parmi les membres de la famille PDGF-R, seuls CSF-1R et PDGF-R α ont été observés dans le noyau cellulaire. Les similarités de structure entre ces récepteurs laissent supposer que les autres membres de cette famille pourraient aussi être présents au niveau du noyau. c-KIT est le récepteur du SCF et est exprimé sur les cellules souches et les mastocytes ainsi que dans les cellules germinales et les mélanocytes. Son activation par SCF lui permet de réguler la prolifération des cellules souches et l'hématopoïèse, la gamétogénèse, la formation des mélanocytes, les fonctions et la survie des mastocytes.

Un fragment intracellulaire de c-Kit a été observé dans le noyau de lignées de spermatocytes murins⁴⁰⁸. c-KIT est également relocalisé dans le noyau d'une lignée leucémique mégacaryoblastique après la stimulation des cellules par le SCF et le CSF-2⁴⁰⁹. Ces données ont été obtenues uniquement par immunofluorescence et doivent encore être validées par d'autres techniques. Le rôle nucléaire de c-KIT reste inconnu, il pourrait interagir avec MAD2 (mitotic arrest-deficient), une protéine des points de contrôle mitotique.

Ces données suggèrent une potentielle localisation nucléaire de c-KIT, en particulier dans les cellules hématopoïétiques, qu'il serait pertinent de valider, et ce d'autant plus que de nombreux inhibiteurs de c-KIT sont utilisés actuellement en thérapeutique.

Finalement, la découverte de la localisation de CSF-1R dans le noyau des monocytes et des macrophages humains ainsi que sa capacité de régulation de l'expression génique incitent à poursuivre l'exploration de ses fonctions nucléaires et des mécanismes responsables de son adressage dans le noyau de ces cellules.

La potentielle implication de CSF-1R nucléaire dans la différenciation des macrophages doit favoriser l'étude de la localisation de ce récepteur *in vivo* et dans les autres tissus où il est exprimé, comme au cours du développement.

Plus généralement, les localisations atypiques des RTKs et leur contribution à leur signalisation devraient être plus largement étudiées tant en conditions physiologique que pathologique.

La localisation nucléaire des RTKs ou de leurs fragments de clivage constitue un mécanisme intéressant d'utilisation alternative des protéines, permettant de complexifier et d'affiner les mécanismes de régulation de la signalisation et de l'expression des gènes au sein de la cellule.

4 Bibliographie

- 1. Schlessinger, J. Receptor Tyrosine Kinases: Legacy of the First Two Decades. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**, a008912–a008912 (2014).
- 2. Schroeter, E. H., Kisslinger, J. A. & Kopan, R. Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature* **393**, 382–386 (1998).
- 3. Chen, M.-K. & Hung, M.-C. Proteolytic cleavage, trafficking, and functions of nuclear receptor tyrosine kinases. *FEBS J.* **282**, 3693–3721 (2015).
- 4. Offterdinger, M., Schöfer, C., Weipoltshammer, K. & Grunt, T. W. c-erbB-3: a nuclear protein in mammary epithelial cells. *J. Cell Biol.* **157**, 929–940 (2002).
- Feng, Y., Venema, V. J., Venema, R. C., Tsai, N. & Caldwell, R. B. VEGF Induces Nuclear Translocation of Flk-1/KDR, Endothelial Nitric Oxide Synthase, and Caveolin-1 in Vascular Endothelial Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 256, 192–197 (1999).
- 6. Cortes-Reynosa, P., Robledo, T. & Salazar, E. P. Epidermal Growth Factor Promotes Epidermal Growth Factor Receptor Nuclear Accumulation by a Pathway Dependent on Cytoskeleton Integrity in Human Breast Cancer Cells. *Arch. Med. Res.* **40**, 331–338 (2009).
- 7. Rio, C., Buxbaum, J. D., Peschon, J. J. & Corfas, G. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme is required for cleavage of erbB4/HER4. *J. Biol. Chem.* **275**, 10379–10387 (2000).
- 8. Ghosh, A. & Surolia, A. Gamma-secretase activating protein is a therapeutic target foralzheimer's disease: a path-breaking discovery finally pavingway towards therapeutic intervention. *Ann. Neurosci.* **18**, 2–3 (2011).
- 9. Selkoe, D. J. & Wolfe, M. S. Presenilin: Running with Scissors in the Membrane. *Cell* **131**, 215–221 (2007).
- 10. Ni, C.-Y. gamma -Secretase Cleavage and Nuclear Localization of ErbB-4 Receptor Tyrosine Kinase. *Science* **294**, 2179–2181 (2001).
- 11. Pozner-Moulis, S., Pappas, D. J. & Rimm, D. L. Met, the Hepatocyte Growth Factor Receptor, Localizes to the Nucleus in Cells at Low Density. *Cancer Res.* **66**, 7976–7982 (2006).
- 12. Piccione, E. C. *et al.* A novel epidermal growth factor receptor variant lacking multiple domains directly activates transcription and is overexpressed in tumors. *Oncogene* **31**, 2953–2967 (2012).
- 13. Scaltriti, M. *et al.* Expression of p95HER2, a Truncated Form of the HER2 Receptor, and Response to Anti-HER2 Therapies in Breast Cancer. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **99**, 628–638 (2007).
- 14. Johnston, C. L., Cox, H. C., Gomm, J. J. & Coombes, R. C. Fibroblast growth factor receptors (FGFRs) localize in different cellular compartments. A splice variant of FGFR-3 localizes to the nucleus. *J. Biol. Chem.* **270**, 30643–30650 (1995).
- 15. Coleman, S. J. *et al.* Nuclear translocation of FGFR1 and FGF2 in pancreatic stellate cells facilitates pancreatic cancer cell invasion. *EMBO Mol. Med.* **6**, 467–481 (2014).

- 16. Liccardi, G., Hartley, J. A. & Hochhauser, D. EGFR Nuclear Translocation Modulates DNA Repair following Cisplatin and Ionizing Radiation Treatment. *Cancer Res.* **71**, 1103–1114 (2011).
- 17. Liao, H.-J. & Carpenter, G. Cetuximab/C225-Induced Intracellular Trafficking of Epidermal Growth Factor Receptor. *Cancer Res.* **69**, 6179–6183 (2009).
- 18. Xu, Y. *et al.* Epstein-Barr Virus encoded LMP1 regulates cyclin D1 promoter activity by nuclear EGFR and STAT3 in CNE1 cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **32**, 90 (2013).
- 19. Elizalde, P. V., Cordo Russo, R. I., Chervo, M. F. & Schillaci, R. ErbB-2 nuclear function in breast cancer growth, metastasis and resistance to therapy. *Endocr. Relat. Cancer* **23**, T243–T257 (2016).
- 20. Brand, T. M. *et al.* Nuclear Epidermal Growth Factor Receptor Is a Functional Molecular Target in Triple-Negative Breast Cancer. *Mol. Cancer Ther.* **13**, 1356–1368 (2014).
- 21. Wang, Y.-N. *et al.* The translocon Sec61beta localized in the inner nuclear membrane transports membrane-embedded EGF receptor to the nucleus. *J. Biol. Chem.* **285**, 38720–38729 (2010).
- 22. Wang, Y.-N. *et al.* Membrane-bound Trafficking Regulates Nuclear Transport of Integral Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and ErbB-2. *J. Biol. Chem.* **287**, 16869–16879 (2012).
- 23. Stachowiak, M. K. *et al.* Integrative nuclear FGFR1 signaling (INFS) as a part of a universal?feed-forward-and-gate? signaling module that controls cell growth and differentiation. *J. Cell. Biochem.* **90**, 662–691 (2003).
- 24. Sannerud, R., Saraste, J. & Goud, B. Retrograde traffic in the biosynthetic-secretory route: pathways and machinery. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**, 438–445 (2003).
- 25. Sandvig, K., Bergan, J., Dyve, A.-B., Skotland, T. & Torgersen, M. L. Endocytosis and retrograde transport of Shiga toxin. *Toxicon* **56**, 1181–1185 (2010).
- 26. Mallard, F. *et al.* Early/recycling endosomes-to-TGN transport involves two SNARE complexes and a Rab6 isoform. *J. Cell Biol.* **156**, 653–664 (2002).
- 27. Chen, A., Hu, T., Mikoryak, C. & Draper, R. K. Retrograde transport of protein toxins under conditions of COPI dysfunction. *Biochim. Biophys. Acta* **1589**, 124–139 (2002).
- 28. Wang, Y.-N. *et al.* COPI-mediated retrograde trafficking from the Golgi to the ER regulates EGFR nuclear transport. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **399**, 498–504 (2010).
- 29. Reif, R. *et al.* Activated ErbB3 Translocates to the Nucleus via Clathrin-independent Endocytosis, Which Is Associated with Proliferating Cells. *J. Biol. Chem.* **291**, 3837–3847 (2016).
- 30. Dittmann, K., Mayer, C., Kehlbach, R. & Rodemann, H. P. Radiation-induced caveolin-1 associated EGFR internalization is linked with nuclear EGFR transport and activation of DNA-PK. *Mol. Cancer* **7**, 69 (2008).
- Koumakpayi, I. H., Le Page, C., Delvoye, N., Saad, F. & Mes-Masson, A.-M. Macropinocytosis inhibitors and Arf6 regulate ErbB3 nuclear localization in prostate cancer cells. *Mol. Carcinog.* 50, 901–912 (2011).

- 32. Giri, D. K. *et al.* Endosomal Transport of ErbB-2: Mechanism for Nuclear Entry of the Cell Surface Receptor. *Mol. Cell. Biol.* **25,** 11005–11018 (2005).
- 33. Hsu, S.-C. & Hung, M.-C. Characterization of a Novel Tripartite Nuclear Localization Sequence in the EGFR Family. *J. Biol. Chem.* **282**, 10432–10440 (2007).
- 34. Seol, K.-C. & Kim, S.-J. Nuclear matrix association of insulin receptor and IRS-1 by insulin in osteoblast-like UMR-106 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **306**, 898–904 (2003).
- 35. Sehat, B. *et al.* SUMOylation Mediates the Nuclear Translocation and Signaling of the IGF-1 Receptor. *Sci. Signal.* **3**, ra10-ra10 (2010).
- 36. Packham, S. *et al.* The Nucleus-Localized Epidermal Growth Factor Receptor Is SUMOylated. *Biochemistry (Mosc.)* **54**, 5157–5166 (2015).
- 37. Liao, H.-J. & Carpenter, G. Role of the Sec61 Translocon in EGF Receptor Trafficking to the Nucleus and Gene Expression. *Mol. Biol. Cell* **18**, 1064–1072 (2007).
- 38. Tsai, B., Ye, Y. & Rapoport, T. A. Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 246–255 (2002).
- 39. Reilly, J. F. & Maher, P. A. Importin beta-mediated nuclear import of fibroblast growth factor receptor: role in cell proliferation. *J. Cell Biol.* **152**, 1307–1312 (2001).
- 40. Hu, Y. *et al.* 90-kDa Ribosomal S6 Kinase Is a Direct Target for the Nuclear Fibroblast Growth Factor Receptor 1 (FGFR1): ROLE IN FGFR1 SIGNALING. *J. Biol. Chem.* **279**, 29325–29335 (2004).
- 41. Read, J. *et al.* Nuclear transportation of exogenous epidermal growth factor receptor and androgen receptor via extracellular vesicles. *Eur. J. Cancer* **70**, 62–74 (2017).
- 42. Weddell, J. C. & Imoukhuede, P. I. Integrative meta-modeling identifies endocytic vesicles, late endosome and the nucleus as the cellular compartments primarily directing RTK signaling. *Integr Biol* **9**, 464–484 (2017).
- 43. Williams, C. C. *et al.* The ERBB4/HER4 receptor tyrosine kinase regulates gene expression by functioning as a STAT5A nuclear chaperone. *J. Cell Biol.* **167**, 469–478 (2004).
- 44. Warsito, D., Sjöström, S., Andersson, S., Larsson, O. & Sehat, B. Nuclear IGF1R is a transcriptional co-activator of LEF1/TCF. *EMBO Rep.* **13**, 244–250 (2012).
- 45. Béguelin, W. *et al.* Progesterone receptor induces ErbB-2 nuclear translocation to promote breast cancer growth via a novel transcriptional effect: ErbB-2 function as a coactivator of Stat3. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 5456–5472 (2010).
- 46. Huo, L. *et al.* RNA helicase A is a DNA-binding partner for EGFR-mediated transcriptional activation in the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 16125–16130 (2010).
- 47. Díaz Flaqué, M. C. *et al.* Progesterone receptor assembly of a transcriptional complex along with activator protein 1, signal transducer and activator of transcription 3 and ErbB-2 governs breast cancer growth and predicts response to endocrine therapy. *Breast Cancer Res.* **15**, (2013).
- 48. Bitler, B. G., Goverdhan, A. & Schroeder, J. A. MUC1 regulates nuclear localization and function of the epidermal growth factor receptor. *J. Cell Sci.* **123**, 1716–1723 (2010).

- 49. Mikula, M. *et al.* Genome-wide co-localization of active EGFR and downstream ERK pathway kinases mirrors mitogen-inducible RNA polymerase 2 genomic occupancy. *Nucleic Acids Res.* gkw763 (2016). doi:10.1093/nar/gkw763
- 50. Paatero, I. *et al.* Interaction with ErbB4 Promotes Hypoxia-inducible Factor-1α Signaling. *J. Biol. Chem.* **287**, 9659–9671 (2012).
- 51. Li, X. *et al.* The Atypical Histone MacroH2A1.2 Interacts with HER-2 Protein in Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* **287**, 23171–23183 (2012).
- 52. Wang, S.-C. *et al.* Tyrosine phosphorylation controls PCNA function through protein stability. *Nat. Cell Biol.* **8**, 1359–1368 (2006).
- 53. Ortega, J. *et al.* Phosphorylation of PCNA by EGFR inhibits mismatch repair and promotes misincorporation during DNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 5667–5672 (2015).
- 54. Lee, H.-J. *et al.* Tyrosine 370 phosphorylation of ATM positively regulates DNA damage response. *Cell Res.* **25**, 225–236 (2015).
- 55. Chou, R.-H. *et al.* EGFR Modulates DNA Synthesis and Repair through Tyr Phosphorylation of Histone H4. *Dev. Cell* **30**, 224–237 (2014).
- 56. Li, L.-Y. *et al.* Nuclear ErbB2 Enhances Translation and Cell Growth by Activating Transcription of Ribosomal RNA Genes. *Cancer Res.* **71**, 4269–4279 (2011).
- 57. Mohd Nafi, S. N. *et al.* Nuclear HER4 mediates acquired resistance to trastuzumab and is associated with poor outcome in HER2 positive breast cancer. *Oncotarget* **5**, 59934–5949 (2014).
- 58. Schillaci, R. *et al.* Clinical relevance of ErbB-2/HER2 nuclear expression in breast cancer. *BMC Cancer* **12**, (2012).
- 59. Katunarić, M. *et al.* EGFR and cyclin D1 in nodular melanoma: correlation with pathohistological parameters and overall survival. *Melanoma Res.* **24**, 584–591 (2014).
- 60. Naresh, A. *et al.* The HER4/4ICD Estrogen Receptor Coactivator and BH3-Only Protein Is an Effector of Tamoxifen-Induced Apoptosis. *Cancer Res.* **68**, 6387–6395 (2008).
- 61. Chen, L., Acciani, T., Le Cras, T., Lutzko, C. & Perl, A.-K. T. Dynamic Regulation of Platelet-Derived Growth Factor Receptor α Expression in Alveolar Fibroblasts during Realveolarization. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **47**, 517–527 (2012).
- 62. Rovida, E., Paccagnini, A., Del Rosso, M., Peschon, J. & Dello Sbarba, P. TNF-alphaconverting enzyme cleaves the macrophage colony-stimulating factor receptor in macrophages undergoing activation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 **166**, 1583–1589 (2001).
- 63. Glenn, G. & van der Geer, P. CSF-1 and TPA stimulate independent pathways leading to lysosomal degradation or regulated intramembrane proteolysis of the CSF-1 receptor. *FEBS Lett.* **581**, 5377–5381 (2007).
- 64. Wilhelmsen, K. & van der Geer, P. Phorbol 12-myristate 13-acetate-induced release of the colony-stimulating factor 1 receptor cytoplasmic domain into the cytosol involves two separate cleavage events. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 454–464 (2004).

- 65. Glenn, G. & van der Geer, P. Toll-like receptors stimulate regulated intramembrane proteolysis of the CSF-1 receptor through Erk activation. *FEBS Lett.* **582**, 911–915 (2008).
- 66. Dello Sbarba, P. *et al.* Interleukin 2 down-modulates the macrophage colony-stimulating factor receptor in murine macrophages. *Cytokine* **8**, 488–494 (1996).
- 67. Dello Sbarba, P. *et al.* Interleukin-4 rapidly down-modulates the macrophage colonystimulating factor receptor in murine macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **60**, 644–650 (1996).
- 68. Qing, X. *et al.* iRhom2 regulates CSF1R cell surface expression and non-steady state myelopoiesis in mice. *Eur. J. Immunol.* **46**, 2737–2748 (2016).
- 69. Zwaenepoel, O. *et al.* Functional CSF-1 receptors are located at the nuclear envelope and activated via the p110 isoform of PI 3-kinase. *FASEB J.* **26**, 691–706 (2012).
- 70. Barbetti, V. *et al.* Chromatin-associated CSF-1R binds to the promoter of proliferationrelated genes in breast cancer cells. *Oncogene* **33**, 4359–4364 (2014).
- 71. Lin, S.-Y. *et al.* Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat. Cell Biol.* **3**, 802–808 (2001).
- 72. Gow, D. J., Sester, D. P. & Hume, D. A. CSF-1, IGF-1, and the control of postnatal growth and development. *J. Leukoc. Biol.* **88**, 475–481 (2010).
- 73. Mancini, A., Koch, A., Whetton, A. D. & Tamura, T. The M-CSF receptor substrate and interacting protein FMIP is governed in its subcellular localization by protein kinase C-mediated phosphorylation, and thereby potentiates M-CSF-mediated differentiation. *Oncogene* **23**, 6581–6589 (2004).
- 74. Pozzobon, T., Goldoni, G., Viola, A. & Molon, B. CXCR4 signaling in health and disease. *Immunol. Lett.* **177**, 6–15 (2016).
- 75. Pelekanos, R. A. *et al.* Intracellular trafficking and endocytosis of CXCR4 in fetal mesenchymal stem/stromal cells. *BMC Cell Biol.* **15**, 15 (2014).
- 76. Masuda, T. *et al.* Nuclear expression of chemokine receptor CXCR4 indicates poorer prognosis in gastric cancer. *Anticancer Res.* **34**, 6397–6403 (2014).
- 77. Joyal, J.-S. *et al.* Subcellular localization of coagulation factor II receptor-like 1 in neurons governs angiogenesis. *Nat. Med.* **20**, 1165–1173 (2014).
- 78. Wang, Z. E., Myles, G. M., Brandt, C. S., Lioubin, M. N. & Rohrschneider, L. Identification of the ligand-binding regions in the macrophage colony-stimulating factor receptor extracellular domain. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 5348–5359 (1993).
- 79. Chen, X., Liu, H., Focia, P. J., Shim, A. H.-R. & He, X. Structure of macrophage colony stimulating factor bound to FMS: Diverse signaling assemblies of class III receptor tyrosine kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 18267–18272 (2008).
- 80. Yu, W. *et al.* Macrophage Proliferation Is Regulated through CSF-1 Receptor Tyrosines 544, 559, and 807. *J. Biol. Chem.* **287**, 13694–13704 (2012).
- 81. Carlberg, K. & Rohrschneider, L. The effect of activating mutations on dimerization, tyrosine phosphorylation and internalization of the macrophage colony stimulating factor receptor. *Mol. Biol. Cell* **5**, 81–95 (1994).
- Woolford, J., McAuliffe, A. & Rohrschneider, L. R. Activation of the feline c-fms protooncogene: multiple alterations are required to generate a fully transformed phenotype. *Cell* 55, 965–977 (1988).
- 83. Fischer, J., Rossetti, S. & Sacchi, N. CSF1R (colony stimulating factor 1 receptor, formerly McDonough feline sarcoma viral (v-fms) oncogene homolog). *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.* (2011). doi:10.4267/2042/44403
- 84. Sherr, C. J. *et al.* The c-fms proto-oncogene product is related to the receptor for the mononuclear phagocyte growth factor, CSF-1. *Cell* **41**, 665–676 (1985).
- 85. Rettenmier, C. W. *et al.* Synthesis of membrane-bound colony-stimulating factor 1 (CSF-1) and downmodulation of CSF-1 receptors in NIH 3T3 cells transformed by cotransfection of the human CSF-1 and c-fms (CSF-1 receptor) genes. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 2378–2387 (1987).
- 86. Li, W. & Stanley, E. R. Role of dimerization and modification of the CSF-1 receptor in its activation and internalization during the CSF-1 response. *EMBO J.* **10**, 277–288 (1991).
- 87. Elegheert, J. *et al.* Extracellular complexes of the hematopoietic human and mouse CSF-1 receptor are driven by common assembly principles. *Struct. Lond. Engl. 1993* **19**, 1762–1772 (2011).
- 88. Groffen, J. *et al.* Chromosomal localization of the human c-fms oncogene. *Nucleic Acids Res.* **11**, 6331–6339 (1983).
- 89. Stanley, E. R. & Chitu, V. CSF-1 receptor signaling in myeloid cells. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**, (2014).
- 90. Sauter, K. A. *et al.* The function of the conserved regulatory element within the second intron of the mammalian Csf1r locus. *PloS One* **8**, e54935 (2013).
- 91. Jin, P. *et al.* Novel splice variants derived from the receptor tyrosine kinase superfamily are potential therapeutics for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **10**, R73 (2008).
- 92. Krysinska, H. *et al.* A two-step, PU.1-dependent mechanism for developmentally regulated chromatin remodeling and transcription of the c-fms gene. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 878–887 (2007).
- 93. Zhang, D. E. *et al.* Identification of a region which directs the monocytic activity of the colony-stimulating factor 1 (macrophage colony-stimulating factor) receptor promoter and binds PEBP2/CBF (AML1). *Mol. Cell. Biol.* **14**, 8085–8095 (1994).
- 94. Flick, M. B., Sapi, E. & Kacinski, B. M. Hormonal regulation of the c-fms proto-oncogene in breast cancer cells is mediated by a composite glucocorticoid response element. *J. Cell. Biochem.* **85**, 10–23 (2002).
- 95. Dai, X.-M. Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood* **99**, 111–120 (2002).
- 96. Begg, S. K. *et al.* Delayed hematopoietic development in osteopetrotic (op/op) mice. *J. Exp. Med.* **177**, 237–242 (1993).
- 97. Stanley, E. R., Berg, K. L., Einstein, D. B., Lee, P. S. & Yeung, Y. G. The biology and action of colony stimulating factor-1. *Stem Cells Dayt. Ohio* **12 Suppl 1**, 15–24; discussion 25 (1994).

- 98. Lin, H. *et al.* Discovery of a Cytokine and Its Receptor by Functional Screening of the Extracellular Proteome. *Science* **320**, 807–811 (2008).
- 99. Niida, S. *et al.* Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colonystimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption. *J. Exp. Med.* **190**, 293–298 (1999).
- 100. Myint, Y. Y. *et al.* Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 correct osteopetrosis in mice with osteopetrosis mutation. *Am. J. Pathol.* **154**, 553–566 (1999).
- 101. Stanley, E. *et al.* Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-deficient mice show no major perturbation of hematopoiesis but develop a characteristic pulmonary pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 5592–5596 (1994).
- 102. MacDonald, K. P. A. *et al.* An antibody against the colony-stimulating factor 1 receptor depletes the resident subset of monocytes and tissue- and tumor-associated macrophages but does not inhibit inflammation. *Blood* **116**, 3955–3963 (2010).
- 103. Chang, H. R., Kim, H. J., Xu, X. & Ferrante, A. W. Macrophage and adipocyte IGF1 maintain adipose tissue homeostasis during metabolic stresses. *Obes. Silver Spring Md* **24**, 172–183 (2016).
- 104. Nandi, S. *et al.* The CSF-1 receptor ligands IL-34 and CSF-1 exhibit distinct developmental brain expression patterns and regulate neural progenitor cell maintenance and maturation. *Dev. Biol.* **367**, 100–113 (2012).
- 105. Bhatnagar, P., Papaioannou, V. E. & Biggers, J. D. CSF-1 and mouse preimplantation development in vitro. *Dev. Camb. Engl.* **121**, 1333–1339 (1995).
- 106. Huynh, D. *et al.* Colony stimulating factor-1 dependence of paneth cell development in the mouse small intestine. *Gastroenterology* **137**, 136–144, 144.e1–3 (2009).
- 107. Mossadegh-Keller, N. *et al.* M-CSF instructs myeloid lineage fate in single haematopoietic stem cells. *Nature* **497**, 239–243 (2013).
- 108. Rieger, M. A., Hoppe, P. S., Smejkal, B. M., Eitelhuber, A. C. & Schroeder, T. Hematopoietic cytokines can instruct lineage choice. *Science* **325**, 217–218 (2009).
- 109. Endele, M. *et al.* CSF-1-induced Src signaling can instruct monocytic lineage choice. *Blood* **129**, 1691–1701 (2017).
- 110. Pawlak, G., Grasset, M. F., Arnaud, S., Blanchet, J. P. & Mouchiroud, G. Receptor for macrophage colony-stimulating factor transduces a signal decreasing erythroid potential in the multipotent hematopoietic EML cell line. *Exp. Hematol.* **28**, 1164–1173 (2000).
- 111. Tussiwand, R. & Gautier, E. L. Transcriptional Regulation of Mononuclear Phagocyte Development. *Front. Immunol.* **6**, (2015).
- 112. Riepsaame, J. *et al.* MicroRNA-Mediated Down-Regulation of M-CSF Receptor Contributes to Maturation of Mouse Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Front. Immunol.* **4**, (2013).
- 113. MacDonald, K. P. A. *et al.* The colony-stimulating factor 1 receptor is expressed on dendritic cells during differentiation and regulates their expansion. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **175**, 1399–1405 (2005).

- 114. Rebe, C. *et al.* Caspase-8 prevents sustained activation of NF- B in monocytes undergoing macrophagic differentiation. *Blood* **109**, 1442–1450 (2007).
- 115. Bigley, V. *et al.* The human syndrome of dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency. *J. Exp. Med.* **208**, 227–234 (2011).
- 116. Tushinski, R. J. *et al.* Survival of mononuclear phagocytes depends on a lineage-specific growth factor that the differentiated cells selectively destroy. *Cell* **28**, 71–81 (1982).
- 117. Dovas, A. *et al.* Regulation of podosome dynamics by WASp phosphorylation: implication in matrix degradation and chemotaxis in macrophages. *J. Cell Sci.* **122**, 3873–3882 (2009).
- 118. Pixley, F. J., Lee, P. S., Condeelis, J. S. & Stanley, E. R. Protein tyrosine phosphatase phi regulates paxillin tyrosine phosphorylation and mediates colony-stimulating factor 1-induced morphological changes in macrophages. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 1795–1809 (2001).
- 119. Lagasse, E. & Weissman, I. L. Enforced expression of Bcl-2 in monocytes rescues macrophages and partially reverses osteopetrosis in op/op mice. *Cell* **89**, 1021–1031 (1997).
- 120. Smith, A. M. *et al.* M-CSF increases proliferation and phagocytosis while modulating receptor and transcription factor expression in adult human microglia. *J. Neuroinflammation* **10**, 85 (2013).
- 121. Pixley, F. J. & Stanley, E. R. CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action. *Trends Cell Biol.* **14**, 628–638 (2004).
- 122. Ma, X. *et al.* Structural basis for the dual recognition of helical cytokines IL-34 and CSF-1 by CSF-1R. *Struct. Lond. Engl. 1993* **20**, 676–687 (2012).
- 123. Nandi, S. *et al.* Receptor-type protein-tyrosine phosphatase ζ is a functional receptor for interleukin-34. *J. Biol. Chem.* **288**, 21972–21986 (2013).
- 124. Liu, H. *et al.* The mechanism of shared but distinct CSF-1R signaling by the non-homologous cytokines IL-34 and CSF-1. *Biochim. Biophys. Acta* **1824**, 938–945 (2012).
- 125. Segaliny, A. I. *et al.* Syndecan-1 regulates the biological activities of interleukin-34. *Biochim. Biophys. Acta* **1853**, 1010–1021 (2015).
- 126. Ségaliny, A. I. *et al.* IL-34 and M-CSF form a novel heteromeric cytokine and regulate the M-CSF receptor activation and localization. *Cytokine* **76**, 170–181 (2015).
- 127. Wei, S. *et al.* Functional overlap but differential expression of CSF-1 and IL-34 in their CSF-1 receptor-mediated regulation of myeloid cells. *J. Leukoc. Biol.* **88**, 495–505 (2010).
- 128. Foucher, E. D. *et al.* IL-34 Induces the Differentiation of Human Monocytes into Immunosuppressive Macrophages. Antagonistic Effects of GM-CSF and IFNγ. *PLoS ONE* **8**, e56045 (2013).
- 129. Chen, Z., Buki, K., Vääräniemi, J., Gu, G. & Väänänen, H. K. The critical role of IL-34 in osteoclastogenesis. *PloS One* **6**, e18689 (2011).
- 130. Chihara, T. *et al.* IL-34 and M-CSF share the receptor Fms but are not identical in biological activity and signal activation. *Cell Death Differ.* **17**, 1917–1927 (2010).

- 131. Barve, R. A. *et al.* Transcriptional profiling and pathway analysis of CSF-1 and IL-34 effects on human monocyte differentiation. *Cytokine* **63**, 10–17 (2013).
- 132. Mitchell, A. J., Roediger, B. & Weninger, W. Monocyte homeostasis and the plasticity of inflammatory monocytes. *Cell. Immunol.* **291**, 22–31 (2014).
- 133. Cheers, C. *et al.* Production of colony-stimulating factors (CSFs) during infection: separate determinations of macrophage-, granulocyte-, granulocyte-macrophage-, and multi-CSFs. *Infect. Immun.* **56**, 247–251 (1988).
- 134. Horiguchi, J., Warren, M. K. & Kufe, D. Expression of the macrophage-specific colonystimulating factor in human monocytes treated with granulocyte-macrophage colonystimulating factor. *Blood* **69**, 1259–1261 (1987).
- Wang, Y. *et al.* Nonredundant roles of keratinocyte-derived IL-34 and neutrophil-derived CSF1 in Langerhans cell renewal in the steady state and during inflammation. *Eur. J. Immunol.* 46, 552–559 (2016).
- 136. Barreda, D. Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. *Dev. Comp. Immunol.* **28**, 509–554 (2004).
- 137. Ryan, G. R. *et al.* Rescue of the colony-stimulating factor 1 (CSF-1)-nullizygous mouse (Csf1(op)/Csf1(op)) phenotype with a CSF-1 transgene and identification of sites of local CSF-1 synthesis. *Blood* **98**, 74–84 (2001).
- 138. Jin, S. *et al.* Interleukin-34 restores blood-brain barrier integrity by upregulating tight junction proteins in endothelial cells. *PloS One* **9**, e115981 (2014).
- 139. Wang, Y. *et al.* IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. *Nat. Immunol.* **13**, 753–760 (2012).
- 140. Luo, J. *et al.* Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) signaling in injured neurons facilitates protection and survival. *J. Exp. Med.* **210**, 157–172 (2013).
- 141. Baccarini, M., Li, W., Dello Sbarba, P. & Stanley, E. R. Increased phosphorylation of the colony stimulating factor-1 receptor following transmembrane signaling. *Receptor* **1**, 243–259 (1991).
- 142. Bian, Y. *et al.* An enzyme assisted RP-RPLC approach for in-depth analysis of human liver phosphoproteome. *J. Proteomics* **96**, 253–262 (2014).
- 143. Oppermann, F. S. *et al.* Large-scale proteomics analysis of the human kinome. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **8**, 1751–1764 (2009).
- 144. Rohde, C. M. A Juxtamembrane Tyrosine in the Colony Stimulating Factor-1 Receptor Regulates Ligand-induced Src Association, Receptor Kinase Function, and Down-regulation. *J. Biol. Chem.* **279**, 43448–43461 (2004).
- 145. Yu, W. *et al.* CSF-1 receptor structure/function in MacCsf1r-/- macrophages: regulation of proliferation, differentiation, and morphology. *J. Leukoc. Biol.* **84**, 852–863 (2008).
- 146. Courtneidge, S. A. *et al.* Activation of Src family kinases by colony stimulating factor-1, and their association with its receptor. *EMBO J.* **12**, 943–950 (1993).

- 147. van der Geer, P. & Hunter, T. Mutation of Tyr697, a GRB2-binding site, and Tyr721, a PI 3-kinase binding site, abrogates signal transduction by the murine CSF-1 receptor expressed in Rat-2 fibroblasts. *EMBO J.* **12**, 5161–5172 (1993).
- 148. Lioubin, M. N., Myles, G. M., Carlberg, K., Bowtell, D. & Rohrschneider, L. R. Shc, Grb2, Sos1, and a 150-kilodalton tyrosine-phosphorylated protein form complexes with Fms in hematopoietic cells. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 5682–5691 (1994).
- 149. Choudhury, G. G. *et al.* Human colony stimulating factor-1 receptor activates the C-raf-1 proto-oncogene kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **172**, 154–159 (1990).
- 150. Foltz, I. N., Lee, J. C., Young, P. R. & Schrader, J. W. Hemopoietic growth factors with the exception of interleukin-4 activate the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* **272**, 3296–3301 (1997).
- 151. Novak, U., Nice, E., Hamilton, J. A. & Paradiso, L. Requirement for Y706 of the murine (or Y708 of the human) CSF-1 receptor for STAT1 activation in response to CSF-1. *Oncogene* **13**, 2607–2613 (1996).
- 152. Novak, U. *et al.* Colony-stimulating factor 1-induced STAT1 and STAT3 activation is accompanied by phosphorylation of Tyk2 in macrophages and Tyk2 and JAK1 in fibroblasts. *Blood* **86**, 2948–2956 (1995).
- 153. Novak, U., Mui, A., Miyajima, A. & Paradiso, L. Formation of STAT5-containing DNA binding complexes in response to colony-stimulating factor-1 and platelet-derived growth factor. *J. Biol. Chem.* **271**, 18350–18354 (1996).
- 154. Reedijk, M. *et al.* Tyr721 regulates specific binding of the CSF-1 receptor kinase insert to PI 3'-kinase SH2 domains: a model for SH2-mediated receptor-target interactions. *EMBO J.* **11**, 1365–1372 (1992).
- 155. Bhatt, N. Y. *et al.* Macrophage-colony-stimulating factor-induced activation of extracellular-regulated kinase involves phosphatidylinositol 3-kinase and reactive oxygen species in human monocytes. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 **169**, 6427–6434 (2002).
- 156. Wang, Y. *et al.* The Role of the NADPH Oxidase Complex, p38 MAPK, and Akt in Regulating Human Monocyte/Macrophage Survival. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **36**, 68–77 (2006).
- 157. Chang, M. *et al.* Phosphatidylinostitol-3 kinase and phospholipase C enhance CSF-1dependent macrophage survival by controlling glucose uptake. *Cell. Signal.* **21**, 1361–1369 (2009).
- 158. Caescu, C. I. *et al.* Colony stimulating factor-1 receptor signaling networks inhibit mouse macrophage inflammatory responses by induction of microRNA-21. *Blood* **125**, e1-13 (2015).
- 159. Jacquel, A. *et al.* Colony-stimulating factor-1-induced oscillations in phosphatidylinositol-3 kinase/AKT are required for caspase activation in monocytes undergoing differentiation into macrophages. *Blood* **114**, 3633–3641 (2009).
- 160. Guery, L. *et al.* Fine-tuning nucleophosmin in macrophage differentiation and activation. *Blood* **118**, 4694–4704 (2011).
- 161. Zermati, Y. *et al.* Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J. Exp. Med.* **193**, 247–254 (2001).

- 162. Solier, S., Fontenay, M., Vainchenker, W., Droin, N. & Solary, E. Non-apoptotic functions of caspases in myeloid cell differentiation. *Cell Death Differ.* **24**, 1337–1347 (2017).
- 163. Fowles, L. F. *et al.* Persistent activation of mitogen-activated protein kinases p42 and p44 and ets-2 phosphorylation in response to colony-stimulating factor 1/c-fms signaling. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 5148–5156 (1998).
- 164. Huynh, J., Kwa, M. Q., Cook, A. D., Hamilton, J. A. & Scholz, G. M. CSF-1 receptor signalling from endosomes mediates the sustained activation of Erk1/2 and Akt in macrophages. *Cell. Signal.* **24**, 1753–1761 (2012).
- 165. Kanagasundaram, V., Jaworowski, A., Byrne, R. & Hamilton, J. A. Separation and characterization of the activated pool of colony-stimulating factor 1 receptor forming distinct multimeric complexes with signalling molecules in macrophages. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 4079–4092 (1999).
- 166. Lou, J., Low-Nam, S. T., Kerkvliet, J. G. & Hoppe, A. D. Delivery of CSF-1R to the lumen of macropinosomes promotes its destruction in macrophages. *J. Cell Sci.* **127**, 5228–5239 (2014).
- 167. Guilbert, L. J. & Stanley, E. R. The interaction of 125I-colony-stimulating factor-1 with bone marrow-derived macrophages. *J. Biol. Chem.* **261**, 4024–4032 (1986).
- 168. Wang, Y., Yeung, Y. G., Langdon, W. Y. & Stanley, E. R. c-Cbl is transiently tyrosinephosphorylated, ubiquitinated, and membrane-targeted following CSF-1 stimulation of macrophages. *J. Biol. Chem.* **271**, 17–20 (1996).
- 169. Lee, P. S. *et al.* The Cbl protooncoprotein stimulates CSF-1 receptor multiubiquitination and endocytosis, and attenuates macrophage proliferation. *EMBO J.* **18**, 3616–3628 (1999).
- 170. Chen, H. E., Chang, S., Trub, T. & Neel, B. G. Regulation of colony-stimulating factor 1 receptor signaling by the SH2 domain-containing tyrosine phosphatase SHPTP1. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 3685–3697 (1996).
- 171. Yeung, Y. G., Berg, K. L., Pixley, F. J., Angeletti, R. H. & Stanley, E. R. Protein tyrosine phosphatase-1C is rapidly phosphorylated in tyrosine in macrophages in response to colony stimulating factor-1. *J. Biol. Chem.* **267**, 23447–23450 (1992).
- 172. Baran, C. P. *et al.* The inositol 5'-phosphatase SHIP-1 and the Src kinase Lyn negatively regulate macrophage colony-stimulating factor-induced Akt activity. *J. Biol. Chem.* **278**, 38628–38636 (2003).
- 173. Wang, Y. *et al.* SHIP2 is recruited to the cell membrane upon macrophage colonystimulating factor (M-CSF) stimulation and regulates M-CSF-induced signaling. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 **173**, 6820–6830 (2004).
- 174. Rademakers, R. *et al.* Mutations in the colony stimulating factor 1 receptor (CSF1R) gene cause hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids. *Nat. Genet.* **44**, 200–205 (2011).
- 175. Pridans, C., Sauter, K. A., Baer, K., Kissel, H. & Hume, D. A. CSF1R mutations in hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids are loss of function. *Sci. Rep.* **3**, 3013 (2013).

- 176. Ueda, S. *et al.* A novel A792D mutation in the CSF1R gene causes hereditary diffuse leukoencephalopathy with axonal spheroids characterized by slow progression. *eNeurologicalSci* **1**, 7–9 (2015).
- 177. Lin, E. Y., Nguyen, A. V., Russell, R. G. & Pollard, J. W. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J. Exp. Med.* **193**, 727–740 (2001).
- 178. Cassier, P. A. *et al.* CSF1R inhibition with emactuzumab in locally advanced diffuse-type tenosynovial giant cell tumours of the soft tissue: a dose-escalation and dose-expansion phase 1 study. *Lancet Oncol.* **16**, 949–956 (2015).
- 179. Komohara, Y., Ohnishi, K., Kuratsu, J. & Takeya, M. Possible involvement of the M2 antiinflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas. *J. Pathol.* **216**, 15–24 (2008).
- 180. Coniglio, S. J. *et al.* Microglial stimulation of glioblastoma invasion involves epidermal growth factor receptor (EGFR) and colony stimulating factor 1 receptor (CSF-1R) signaling. *Mol. Med. Camb. Mass* **18**, 519–527 (2012).
- 181. Kascinski, B. Expression of CSF-1 and its receptor CSF-1R in non-hematopoietic neoplasms. *Cancer Treat. Res.* **107**, 285–292 (2002).
- 182. Sousa, S. *et al.* Human breast cancer cells educate macrophages toward the M2 activation status. *Breast Cancer Res. BCR* **17**, 101 (2015).
- 183. DeNardo, D. G. *et al.* Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer Discov.* **1**, 54–67 (2011).
- 184. Reddy, V. A. *et al.* Granulocyte inducer C/EBPalpha inactivates the myeloid master regulator PU.1: possible role in lineage commitment decisions. *Blood* **100**, 483–490 (2002).
- 185. Pietras, E. M. *et al.* Functionally Distinct Subsets of Lineage-Biased Multipotent Progenitors Control Blood Production in Normal and Regenerative Conditions. *Cell Stem Cell* 17, 35–46 (2015).
- 186. Yamamoto, R. *et al.* Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells. *Cell* **154**, 1112–1126 (2013).
- 187. Sun, J. et al. Clonal dynamics of native haematopoiesis. Nature 514, 322–327 (2014).
- 188. Fogg, D. K. A Clonogenic Bone Marrow Progenitor Specific for Macrophages and Dendritic Cells. *Science* **311**, 83–87 (2006).
- 189. Geissmann, F. *et al.* Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. *Science* **327**, 656–661 (2010).
- 190. Friedman, A. D. Transcriptional control of granulocyte and monocyte development. *Oncogene* **26**, 6816–6828 (2007).
- 191. Hettinger, J. *et al.* Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nat. Immunol.* **14**, 821–830 (2013).
- 192. Patel, A. A. *et al.* The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. *J. Exp. Med.* **214**, 1913–1923 (2017).

- 193. Liu, H. *et al.* Serine phosphorylation of STAT3 is essential for Mcl-1 expression and macrophage survival. *Blood* **102**, 344–352 (2003).
- 194. Lin, Y.-F., Lee, H.-M., Leu, S.-J. & Tsai, Y.-H. The essentiality of PKCalpha and PKCbetal translocation for CD14+monocyte differentiation towards macrophages and dendritic cells, respectively. *J. Cell. Biochem.* **102**, 429–441 (2007).
- 195. Kiener, P. A. *et al.* Differential induction of apoptosis by Fas-Fas ligand interactions in human monocytes and macrophages. *J. Exp. Med.* **185**, 1511–1516 (1997).
- 196. Mangan, D. F., Welch, G. R. & Wahl, S. M. Lipopolysaccharide, tumor necrosis factor-alpha, and IL-1 beta prevent programmed cell death (apoptosis) in human peripheral blood monocytes. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 **146**, 1541–1546 (1991).
- 197. Peters, W. *et al.* CCR2-dependent trafficking of F4/80dim macrophages and CD11cdim/intermediate dendritic cells is crucial for T cell recruitment to lungs infected with Mycobacterium tuberculosis. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 **172**, 7647–7653 (2004).
- 198. Serbina, N. V., Jia, T., Hohl, T. M. & Pamer, E. G. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu. Rev. Immunol.* **26**, 421–452 (2008).
- 199. Gonzalez-Mejia, M. E. & Doseff, A. I. Regulation of monocytes and macrophages cell fate. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **14**, 2413–2431 (2009).
- 200. Wynn, T. A., Chawla, A. & Pollard, J. W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* **496**, 445–455 (2013).
- 201. Randolph, G. J., Inaba, K., Robbiani, D. F., Steinman, R. M. & Muller, W. A. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity* **11**, 753–761 (1999).
- 202. Jakubzick, C. *et al.* Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steadystate tissues and transport antigen to lymph nodes. *Immunity* **39**, 599–610 (2013).
- 203. Schaer, C. A., Vallelian, F., Imhof, A., Schoedon, G. & Schaer, D. J. CD163-expressing monocytes constitute an endotoxin-sensitive Hb clearance compartment within the vascular system. *J. Leukoc. Biol.* **82**, 106–110 (2007).
- 204. Passlick, B., Flieger, D. & Ziegler-Heitbrock, H. W. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* **74**, 2527–2534 (1989).
- 205. Buechler, C. *et al.* Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *J. Leukoc. Biol.* **67**, 97–103 (2000).
- 206. Wong, K. L. *et al.* Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* **118**, e16–e31 (2011).
- 207. Skrzeczyńska-Moncznik, J. *et al.* Peripheral Blood CD14 high CD16+ Monocytes are Main Producers of IL-10. *Scand. J. Immunol.* **67**, 152–159 (2008).
- 208. Wong, K. L. *et al.* The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol. Res.* **53**, 41–57 (2012).
- 209. Selimoglu-Buet, D. *et al.* Characteristic repartition of monocyte subsets as a diagnostic signature of chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* **125**, 3618–3626 (2015).

- 210. Hofer, T. P. *et al.* slan-defined subsets of CD16-positive monocytes: impact of granulomatous inflammation and M-CSF receptor mutation. *Blood* **126**, 2601–2610 (2015).
- 211. Villani, A.-C. *et al.* Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science* **356**, (2017).
- 212. Gren, S. T. *et al.* A Single-Cell Gene-Expression Profile Reveals Inter-Cellular Heterogeneity within Human Monocyte Subsets. *PloS One* **10**, e0144351 (2015).
- 213. Nahrendorf, M. *et al.* The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J. Exp. Med.* **204**, 3037–3047 (2007).
- 214. Serbina, N. V. & Pamer, E. G. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat. Immunol.* **7**, 311–317 (2006).
- 215. Auffray, C. *et al.* Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* **317**, 666–670 (2007).
- 216. Landsman, L., Varol, C. & Jung, S. Distinct differentiation potential of blood monocyte subsets in the lung. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 **178**, 2000–2007 (2007).
- 217. Hanna, R. N. *et al.* The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and the survival of Ly6C- monocytes. *Nat. Immunol.* **12**, 778–785 (2011).
- 218. Gamrekelashvili, J. *et al.* Regulation of monocyte cell fate by blood vessels mediated by Notch signalling. *Nat. Commun.* **7**, 12597 (2016).
- 219. Zhao, C. *et al.* The CD14(+/low)CD16(+) monocyte subset is more susceptible to spontaneous and oxidant-induced apoptosis than the CD14(+)CD16(-) subset. *Cell Death Dis.* 1, e95 (2010).
- 220. Cros, J. *et al.* Human CD14dim Monocytes Patrol and Sense Nucleic Acids and Viruses via TLR7 and TLR8 Receptors. *Immunity* **33**, 375–386 (2010).
- 221. Zawada, A. M. *et al.* SuperSAGE evidence for CD14++CD16+ monocytes as a third monocyte subset. *Blood* **118**, e50–e61 (2011).
- 222. Murdoch, C., Tazzyman, S., Webster, S. & Lewis, C. E. Expression of Tie-2 by human monocytes and their responses to angiopoietin-2. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 **178**, 7405–7411 (2007).
- 223. Skrzeczyńska, J., Kobylarz, K., Hartwich, Z., Zembala, M. & Pryjma, J. CD14+CD16+ monocytes in the course of sepsis in neonates and small children: monitoring and functional studies. *Scand. J. Immunol.* **55**, 629–638 (2002).
- 224. Castaño, D., García, L. F. & Rojas, M. Increased frequency and cell death of CD16+ monocytes with Mycobacterium tuberculosis infection. *Tuberc. Edinb. Scotl.* **91**, 348–360 (2011).
- 225. Zhang, J.-Y. *et al.* Hyper-activated pro-inflammatory CD16 monocytes correlate with the severity of liver injury and fibrosis in patients with chronic hepatitis B. *PloS One* **6**, e17484 (2011).

- 226. Han, J. *et al.* CD14(high)CD16(+) rather than CD14(low)CD16(+) monocytes correlate with disease progression in chronic HIV-infected patients. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1999 **52**, 553–559 (2009).
- 227. Feng, A.-L. *et al.* CD16+ monocytes in breast cancer patients: expanded by monocyte chemoattractant protein-1 and may be useful for early diagnosis. *Clin. Exp. Immunol.* **164**, 57–65 (2011).
- 228. Schauer, D. *et al.* Intermediate monocytes but not TIE2-expressing monocytes are a sensitive diagnostic indicator for colorectal cancer. *PloS One* **7**, e44450 (2012).
- 229. Heron, M. *et al.* Increased expression of CD16, CD69, and very late antigen-1 on blood monocytes in active sarcoidosis. *Chest* **134**, 1001–1008 (2008).
- 230. Grip, O., Bredberg, A., Lindgren, S. & Henriksson, G. Increased subpopulations of CD16(+) and CD56(+) blood monocytes in patients with active Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **13**, 566–572 (2007).
- 231. Chiu, Y. G. *et al.* CD16 (FcRgammaIII) as a potential marker of osteoclast precursors in psoriatic arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **12**, R14 (2010).
- 232. Moniuszko, M., Bodzenta-Lukaszyk, A., Kowal, K., Lenczewska, D. & Dabrowska, M. Enhanced frequencies of CD14++CD16+, but not CD14+CD16+, peripheral blood monocytes in severe asthmatic patients. *Clin. Immunol. Orlando Fla* **130**, 338–346 (2009).
- 233. Rossol, M., Kraus, S., Pierer, M., Baerwald, C. & Wagner, U. The CD14(bright) CD16+ monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population. *Arthritis Rheum.* **64**, 671–677 (2012).
- 234. Dayyani, F. *et al.* Mechanism of glucocorticoid-induced depletion of human CD14+CD16+ monocytes. *J. Leukoc. Biol.* **74**, 33–39 (2003).
- 235. Frankenberger, M. *et al.* A defect of CD16-positive monocytes can occur without disease. *Immunobiology* **218**, 169–174 (2013).
- 236. Munn, D. H. *et al.* Recombinant human macrophage colony-stimulating factor in nonhuman primates: selective expansion of a CD16+ monocyte subset with phenotypic similarity to primate natural killer cells. *Blood* **88**, 1215–1224 (1996).
- 237. West, S. D. *et al.* Transforming Growth Factor-β, Macrophage Colony-Stimulating Factor and C-Reactive Protein Levels Correlate with CD14highCD16+ Monocyte Induction and Activation in Trauma Patients. *PLoS ONE* **7**, e52406 (2012).
- 238. Dutertre, C.-A. *et al.* Pivotal role of M-DC8⁺ monocytes from viremic HIV-infected patients in TNFα overproduction in response to microbial products. *Blood* **120**, 2259–2268 (2012).
- 239. Tamura, A. *et al.* C/EBPβ is required for survival of Ly6C– monocytes. *Blood* **130**, 1809–1818 (2017).
- 240. Saleh, M. N. *et al.* CD16+ monocytes in patients with cancer: spontaneous elevation and pharmacologic induction by recombinant human macrophage colony-stimulating factor. *Blood* **85**, 2910–2917 (1995).

- 241. Weiner, L. M. *et al.* Phase I trial of recombinant macrophage colony-stimulating factor and recombinant gamma-interferon: toxicity, monocytosis, and clinical effects. *Cancer Res.* **54**, 4084–4090 (1994).
- 242. Srour, S. A. *et al.* Incidence and patient survival of myeloproliferative neoplasms and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms in the United States, 2001-12. *Br. J. Haematol.* **174**, 382–396 (2016).
- 243. Arber, D. A. *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* **127**, 2391–2405 (2016).
- 244. Itzykson, R., Duchmann, M., Lucas, N. & Solary, E. CMML: Clinical and molecular aspects. *Int. J. Hematol.* **105**, 711–719 (2017).
- 245. Itzykson, R., Itzkson, R., Fenaux, P. & Solary, E. Chronic myelomonocytic leukemia: myelodysplastic or myeloproliferative? *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **26**, 387–400 (2013).
- 246. Merlevede, J. *et al.* Mutation allele burden remains unchanged in chronic myelomonocytic leukaemia responding to hypomethylating agents. *Nat. Commun.* **7**, 10767 (2016).
- 247. Itzykson, R. *et al.* Prognostic score including gene mutations in chronic myelomonocytic leukemia. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **31**, 2428–2436 (2013).
- 248. Elena, C. *et al.* Integrating clinical features and genetic lesions in the risk assessment of patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* **128**, 1408–1417 (2016).
- 249. Fenaux, P. *et al.* Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol.* **10**, 223–232 (2009).
- 250. Braun, T. *et al.* Molecular predictors of response to decitabine in advanced chronic myelomonocytic leukemia: a phase 2 trial. *Blood* **118**, 3824–3831 (2011).
- 251. Ko, M. *et al.* Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature* **468**, 839–843 (2010).
- 252. Nakajima, H. & Kunimoto, H. TET2 as an epigenetic master regulator for normal and malignant hematopoiesis. *Cancer Sci.* **105**, 1093–1099 (2014).
- 253. Figueroa, M. E. *et al.* Leukemic IDH1 and IDH2 Mutations Result in a Hypermethylation Phenotype, Disrupt TET2 Function, and Impair Hematopoietic Differentiation. *Cancer Cell* **18**, 553–567 (2010).
- 254. Meldi, K. *et al.* Specific molecular signatures predict decitabine response in chronic myelomonocytic leukemia. *J. Clin. Invest.* **125**, 1857–1872 (2015).
- 255. Padron, E. *et al.* GM-CSF-dependent pSTAT5 sensitivity is a feature with therapeutic potential in chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* **121**, 5068–5077 (2013).
- 256. Pronier, E. *et al.* Inhibition of TET2-mediated conversion of 5-methylcytosine to 5hydroxymethylcytosine disturbs erythroid and granulomonocytic differentiation of human hematopoietic progenitors. *Blood* **118**, 2551–2555 (2011).

- 257. Droin, N. *et al.* Alpha-defensins secreted by dysplastic granulocytes inhibit the differentiation of monocytes in chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* **115**, 78–88 (2009).
- 258. Niyongere, S. *et al.* Comprehensive Inflammatory Cytokine Profiling Identifies IL-8/CXCL8 As Elevated, Associated with Proliferative Features, and Independently Prognostic in Chronic Myelomonocytic Leukemia (CMML). in **128 no. 22 109**, (Blood, 2016).
- 259. Breton, G. [Origin and development of human dendritic cells]. *Med. Sci. MS* **31**, 725–727 (2015).
- 260. Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* **179**, 1109–1118 (1994).
- 261. Bogunovic, M. *et al.* Origin of the lamina propria dendritic cell network. *Immunity* **31**, 513–525 (2009).
- 262. Serbina, N. V., Salazar-Mather, T. P., Biron, C. A., Kuziel, W. A. & Pamer, E. G. TNF/iNOSproducing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity* **19**, 59–70 (2003).
- 263. Fuller, K. *et al.* Macrophage colony-stimulating factor stimulates survival and chemotactic behavior in isolated osteoclasts. *J. Exp. Med.* **178**, 1733–1744 (1993).
- 264. Sakai, H. *et al.* Activated c-Fms recruits Vav and Rac during CSF-1-induced cytoskeletal remodeling and spreading in osteoclasts. *Bone* **39**, 1290–1301 (2006).
- 265. Komano, Y., Nanki, T., Hayashida, K., Taniguchi, K. & Miyasaka, N. Identification of a human peripheral blood monocyte subset that differentiates into osteoclasts. *Arthritis Res. Ther.* **8**, R152 (2006).
- 266. Bertrand, J. Y. *et al.* Three pathways to mature macrophages in the early mouse yolk sac. *Blood* **106**, 3004–3011 (2005).
- 267. Goldmann, T. *et al.* Origin, fate and dynamics of macrophages at central nervous system interfaces. *Nat. Immunol.* **17**, 797–805 (2016).
- 268. Chitu, V. & Stanley, E. R. Regulation of Embryonic and Postnatal Development by the CSF-1 Receptor. *Curr. Top. Dev. Biol.* **123**, 229–275 (2017).
- 269. Gomez Perdiguero, E. *et al.* Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* **518**, 547–551 (2015).
- 270. Kierdorf, K. *et al.* Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8dependent pathways. *Nat. Neurosci.* **16**, 273–280 (2013).
- 271. Rao, S. *et al.* Obligatory participation of macrophages in an angiopoietin 2-mediated cell death switch. *Dev. Camb. Engl.* **134**, 4449–4458 (2007).
- 272. Fantin, A. *et al.* Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood* **116**, 829–840 (2010).

- 273. Erblich, B., Zhu, L., Etgen, A. M., Dobrenis, K. & Pollard, J. W. Absence of colony stimulation factor-1 receptor results in loss of microglia, disrupted brain development and olfactory deficits. *PloS One* **6**, e26317 (2011).
- 274. Gyorki, D. E., Asselin-Labat, M.-L., van Rooijen, N., Lindeman, G. J. & Visvader, J. E. Resident macrophages influence stem cell activity in the mammary gland. *Breast Cancer Res. BCR* **11**, R62 (2009).
- 275. Chow, A. *et al.* Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. *J. Exp. Med.* **208**, 261–271 (2011).
- 276. Murai, M. *et al.* Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nat. Immunol.* **10**, 1178–1184 (2009).
- 277. Murray, P. J. & Wynn, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 723–737 (2011).
- 278. Knutson, M. & Wessling-Resnick, M. Iron metabolism in the reticuloendothelial system. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **38**, 61–88 (2003).
- 279. Lumeng, C. N., Bodzin, J. L. & Saltiel, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J. Clin. Invest.* **117**, 175–184 (2007).
- 280. Junt, T. *et al.* Subcapsular sinus macrophages in lymph nodes clear lymph-borne viruses and present them to antiviral B cells. *Nature* **450**, 110–114 (2007).
- 281. Anthony, R. M. *et al.* Memory T(H)2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites. *Nat. Med.* **12**, 955–960 (2006).
- 282. Brugger, W., Kreutz, M. & Andreesen, R. Macrophage colony-stimulating factor is required for human monocyte survival and acts as a cofactor for their terminal differentiation to macrophages in vitro. *J. Leukoc. Biol.* **49**, 483–488 (1991).
- 283. Kruger, M., Van de Winkel, J. G., De Wit, T. P., Coorevits, L. & Ceuppens, J. L. Granulocytemacrophage colony-stimulating factor down-regulates CD14 expression on monocytes. *Immunology* **89**, 89–95 (1996).
- 284. Rey-Giraud, F., Hafner, M. & Ries, C. H. In vitro generation of monocyte-derived macrophages under serum-free conditions improves their tumor promoting functions. *PloS One* **7**, e42656 (2012).
- 285. Fleetwood, A. J., Lawrence, T., Hamilton, J. A. & Cook, A. D. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 **178**, 5245–5252 (2007).
- 286. Pace, J. L., Russell, S. W., Torres, B. A., Johnson, H. M. & Gray, P. W. Recombinant mouse gamma interferon induces the priming step in macrophage activation for tumor cell killing. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 **130**, 2011–2013 (1983).
- 287. Hao, N.-B. *et al.* Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, 948098 (2012).

- 288. Liao, X. *et al.* Krüppel-like factor 4 regulates macrophage polarization. *J. Clin. Invest.* **121**, 2736–2749 (2011).
- 289. Hunter, M. *et al.* Survival of monocytes and macrophages and their role in health and disease. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **14**, 4079–4102 (2009).
- 290. Mosser, D. M. & Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 958–969 (2008).
- 291. Arnold, L. *et al.* Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J. Exp. Med.* **204**, 1057–1069 (2007).
- 292. Italiani, P. & Boraschi, D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front. Immunol.* **5**, 514 (2014).
- 293. Edwards, J. P., Zhang, X., Frauwirth, K. A. & Mosser, D. M. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J. Leukoc. Biol.* **80**, 1298–1307 (2006).
- 294. Balkwill, F. R. & Mantovani, A. Cancer-related inflammation: common themes and therapeutic opportunities. *Semin. Cancer Biol.* **22**, 33–40 (2012).
- 295. Wu, Y. & Zheng, L. Dynamic education of macrophages in different areas of human tumors. *Cancer Microenviron. Off. J. Int. Cancer Microenviron. Soc.* **5**, 195–201 (2012).
- 296. Gautier, E. L. *et al.* Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat. Immunol.* **13**, 1118–1128 (2012).
- 297. Xue, J. *et al.* Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity* **40**, 274–288 (2014).
- 298. Liu, H., Shi, B., Huang, C.-C., Eksarko, P. & Pope, R. M. Transcriptional diversity during monocyte to macrophage differentiation. *Immunol. Lett.* **117**, 70–80 (2008).
- 299. Mabbott, N. A., Baillie, J. K., Brown, H., Freeman, T. C. & Hume, D. A. An expression atlas of human primary cells: inference of gene function from coexpression networks. *BMC Genomics* 14, 632 (2013).
- 300. Martinez, F. O., Gordon, S., Locati, M. & Mantovani, A. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 **177**, 7303–7311 (2006).
- 301. Wang, N., Liang, H. & Zen, K. Molecular mechanisms that influence the macrophage m1m2 polarization balance. *Front. Immunol.* **5**, 614 (2014).
- 302. Krausgruber, T. *et al.* IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nat. Immunol.* **12**, 231–238 (2011).
- 303. Rius, J. *et al.* NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. *Nature* **453**, 807–811 (2008).

- 304. Liu, Y. *et al.* Unique expression of suppressor of cytokine signaling 3 is essential for classical macrophage activation in rodents in vitro and in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 **180,** 6270–6278 (2008).
- 305. Pello, O. M. *et al.* Role of c-MYC in alternative activation of human macrophages and tumor-associated macrophage biology. *Blood* **119**, 411–421 (2012).
- 306. Porta, C. *et al.* Tolerance and M2 (alternative) macrophage polarization are related processes orchestrated by p50 nuclear factor kappaB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 14978–14983 (2009).
- 307. Donnelly, R. P., Dickensheets, H. & Finbloom, D. S. The interleukin-10 signal transduction pathway and regulation of gene expression in mononuclear phagocytes. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* **19**, 563–573 (1999).
- 308. Zhou, H. *et al.* Identification of the microRNA networks contributing to macrophage differentiation and function. *Oncotarget* **7**, 28806–28820 (2016).
- 309. Martinez-Nunez, R. T., Louafi, F. & Sanchez-Elsner, T. The interleukin 13 (IL-13) pathway in human macrophages is modulated by microRNA-155 via direct targeting of interleukin 13 receptor alpha1 (IL13Ralpha1). *J. Biol. Chem.* **286**, 1786–1794 (2011).
- 310. Cai, X. *et al.* Re-polarization of tumor-associated macrophages to pro-inflammatory M1 macrophages by microRNA-155. *J. Mol. Cell Biol.* **4**, 341–343 (2012).
- 311. Lin, J. *et al.* Transcriptome-Wide Analysis Reveals Modulation of Human Macrophage Inflammatory Phenotype Through Alternative Splicing. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **36**, 1434–1447 (2016).
- 312. Yona, S. *et al.* Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* **38**, 79–91 (2013).
- 313. Murphy, J., Summer, R., Wilson, A. A., Kotton, D. N. & Fine, A. The prolonged life-span of alveolar macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **38**, 380–385 (2008).
- 314. Tamoutounour, S. *et al.* Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin. *Immunity* **39**, 925–938 (2013).
- 315. Bain, C. C. *et al.* Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nat. Immunol.* **15**, 929–937 (2014).
- 316. Molawi, K. *et al.* Progressive replacement of embryo-derived cardiac macrophages with age. *J. Exp. Med.* **211**, 2151–2158 (2014).
- 317. Franklin, R. A. *et al.* The cellular and molecular origin of tumor-associated macrophages. *Science* **344**, 921–925 (2014).
- 318. Moore, K. J., Sheedy, F. J. & Fisher, E. A. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 709–721 (2013).
- 319. Haniffa, M. *et al.* Differential rates of replacement of human dermal dendritic cells and macrophages during hematopoietic stem cell transplantation. *J. Exp. Med.* **206**, 371–385 (2009).

- 320. Sheng, J., Ruedl, C. & Karjalainen, K. Most Tissue-Resident Macrophages Except Microglia Are Derived from Fetal Hematopoietic Stem Cells. *Immunity* **43**, 382–393 (2015).
- 321. Schulz, C. *et al.* A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* **336**, 86–90 (2012).
- 322. Soucie, E. L. *et al.* Lineage-specific enhancers activate self-renewal genes in macrophages and embryonic stem cells. *Science* **351**, aad5510 (2016).
- 323. Aziz, A., Soucie, E., Sarrazin, S. & Sieweke, M. H. MafB/c-Maf deficiency enables self-renewal of differentiated functional macrophages. *Science* **326**, 867–871 (2009).
- 324. Imperatore, F. *et al.* SIRT1 regulates macrophage self-renewal. *EMBO J.* **36**, 2353–2372 (2017).
- 325. Jenkins, S. J. *et al.* Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science* **332**, 1284–1288 (2011).
- 326. Malyshev, I. & Malyshev, Y. Current Concept and Update of the Macrophage Plasticity Concept: Intracellular Mechanisms of Reprogramming and M3 Macrophage 'Switch' Phenotype. *BioMed Res. Int.* **2015**, 341308 (2015).
- 327. Eguchi, K. *et al.* Saturated fatty acid and TLR signaling link β cell dysfunction and islet inflammation. *Cell Metab.* **15**, 518–533 (2012).
- 328. Leblond, A.-L. *et al.* Systemic and Cardiac Depletion of M2 Macrophage through CSF-1R Signaling Inhibition Alters Cardiac Function Post Myocardial Infarction. *PloS One* **10**, e0137515 (2015).
- 329. Munitz, A., Brandt, E. B., Mingler, M., Finkelman, F. D. & Rothenberg, M. E. Distinct roles for IL-13 and IL-4 via IL-13 receptor alpha1 and the type II IL-4 receptor in asthma pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 7240–7245 (2008).
- 330. Kamada, N. *et al.* Unique CD14 intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN-gamma axis. *J. Clin. Invest.* **118**, 2269–2280 (2008).
- 331. Platt, A. M., Bain, C. C., Bordon, Y., Sester, D. P. & Mowat, A. M. An independent subset of TLR expressing CCR2-dependent macrophages promotes colonic inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 **184**, 6843–6854 (2010).
- 332. Yao, Z. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha increases circulating osteoclast precursor numbers by promoting their proliferation and differentiation in the bone marrow through upregulation of c-Fms expression. *J. Biol. Chem.* **281**, 11846–11855 (2006).
- 333. Paniagua, R. T. *et al.* c-Fms-mediated differentiation and priming of monocyte lineage cells play a central role in autoimmune arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **12**, R32 (2010).
- 334. Chemel, M. *et al.* Interleukin 34 expression is associated with synovitis severity in rheumatoid arthritis patients. *Ann. Rheum. Dis.* **71**, 150–154 (2012).
- 335. Ponomarev, E. D., Veremeyko, T., Barteneva, N., Krichevsky, A. M. & Weiner, H. L. MicroRNA-124 promotes microglia quiescence and suppresses EAE by deactivating macrophages via the C/EBP-α-PU.1 pathway. *Nat. Med.* **17**, 64–70 (2011).

- 336. Gelderman, K. A. *et al.* Macrophages suppress T cell responses and arthritis development in mice by producing reactive oxygen species. *J. Clin. Invest.* **117**, 3020–3028 (2007).
- 337. Zhu, B. *et al.* Plasticity of Ly-6C(hi) myeloid cells in T cell regulation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 **187**, 2418–2432 (2011).
- 338. Wynn, T. A. & Barron, L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Semin. Liver Dis.* **30**, 245–257 (2010).
- 339. Eubank, T. D. *et al.* GM-CSF induces expression of soluble VEGF receptor-1 from human monocytes and inhibits angiogenesis in mice. *Immunity* **21**, 831–842 (2004).
- 340. Thomas, J. A. *et al.* Macrophage therapy for murine liver fibrosis recruits host effector cells improving fibrosis, regeneration, and function. *Hepatol. Baltim. Md* **53**, 2003–2015 (2011).
- 341. Wilson, M. S. *et al.* Bleomycin and IL-1beta-mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent. *J. Exp. Med.* **207**, 535–552 (2010).
- 342. Satoh, T. *et al.* Identification of an atypical monocyte and committed progenitor involved in fibrosis. *Nature* **541**, 96–101 (2017).
- 343. Duffield, J. S. *et al.* Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J. Clin. Invest.* **115**, 56–65 (2005).
- 344. Zhang, Q. *et al.* Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature. *PloS One* **7**, e50946 (2012).
- 345. Komohara, Y. *et al.* Macrophage infiltration and its prognostic relevance in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Sci.* **102**, 1424–1431 (2011).
- 346. Steidl, C. *et al.* Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **362**, 875–885 (2010).
- 347. Pyonteck, S. M. *et al.* Deficiency of the macrophage growth factor CSF-1 disrupts pancreatic neuroendocrine tumor development. *Oncogene* **31**, 1459–1467 (2012).
- 348. Ong, S.-M. *et al.* Macrophages in human colorectal cancer are pro-inflammatory and prime T cells towards an anti-tumour type-1 inflammatory response. *Eur. J. Immunol.* **42**, 89–100 (2012).
- 349. Bingle, L., Lewis, C. E., Corke, K. P., Reed, M. W. R. & Brown, N. J. Macrophages promote angiogenesis in human breast tumour spheroids in vivo. *Br. J. Cancer* **94**, 101–107 (2006).
- 350. Hotchkiss, K. A. *et al.* Mechanisms by which tumor cells and monocytes expressing the angiogenic factor thymidine phosphorylase mediate human endothelial cell migration. *Cancer Res.* **63**, 527–533 (2003).
- 351. Giraudo, E., Inoue, M. & Hanahan, D. An amino-bisphosphonate targets MMP-9expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis. *J. Clin. Invest.* **114**, 623–633 (2004).
- 352. Tsutsui, S. *et al.* Macrophage infiltration and its prognostic implications in breast cancer: the relationship with VEGF expression and microvessel density. *Oncol. Rep.* **14**, 425–431 (2005).

- 353. Lin, E. Y. *et al.* Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. *Cancer Res.* **66**, 11238–11246 (2006).
- 354. Koide, N., Nishio, A., Sato, T., Sugiyama, A. & Miyagawa, S. Significance of macrophage chemoattractant protein-1 expression and macrophage infiltration in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Am. J. Gastroenterol.* **99**, 1667–1674 (2004).
- 355. Nishie, A. *et al.* Macrophage infiltration and heme oxygenase-1 expression correlate with angiogenesis in human gliomas. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **5**, 1107–1113 (1999).
- 356. Solinas, G., Germano, G., Mantovani, A. & Allavena, P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J. Leukoc. Biol.* **86**, 1065–1073 (2009).
- 357. Gottlieb, C. E., Mills, A. M., Cross, J. V. & Ring, K. L. Tumor-associated macrophage expression of PD-L1 in implants of high grade serous ovarian carcinoma: A comparison of matched primary and metastatic tumors. *Gynecol. Oncol.* **144**, 607–612 (2017).
- 358. Zhu, Y. *et al.* CSF1/CSF1R blockade reprograms tumor-infiltrating macrophages and improves response to T-cell checkpoint immunotherapy in pancreatic cancer models. *Cancer Res.* **74**, 5057–5069 (2014).
- 359. Prima, V., Kaliberova, L. N., Kaliberov, S., Curiel, D. T. & Kusmartsev, S. COX2/mPGES1/PGE2 pathway regulates PD-L1 expression in tumor-associated macrophages and myeloid-derived suppressor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 1117–1122 (2017).
- 360. Pahler, J. C. *et al.* Plasticity in tumor-promoting inflammation: impairment of macrophage recruitment evokes a compensatory neutrophil response. *Neoplasia N. Y. N* **10**, 329–340 (2008).
- Mitchem, J. B. *et al.* Targeting tumor-infiltrating macrophages decreases tumor-initiating cells, relieves immunosuppression, and improves chemotherapeutic responses. *Cancer Res.* 73, 1128–1141 (2013).
- 362. Duluc, D. *et al.* Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood* **110**, 4319–4330 (2007).
- 363. Gordon, S. R. *et al.* PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity. *Nature* **545**, 495–499 (2017).
- 364. Martín-Moreno, A. M. *et al.* CSF1R Protein Expression in Reactive Lymphoid Tissues and Lymphoma: Its Relevance in Classical Hodgkin Lymphoma. *PloS One* **10**, e0125203 (2015).
- 365. Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C. & Mantovani, A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* **30**, 1073–1081 (2009).
- 366. Satoh, T. *et al.* Macrophages transduced with an adenoviral vector expressing interleukin 12 suppress tumor growth and metastasis in a preclinical metastatic prostate cancer model. *Cancer Res.* **63**, 7853–7860 (2003).
- 367. Ries, C. H., Hoves, S., Cannarile, M. A. & Rüttinger, D. CSF-1/CSF-1R targeting agents in clinical development for cancer therapy. *Curr. Opin. Pharmacol.* **23**, 45–51 (2015).

- 368. Paulus, P., Stanley, E. R., Schäfer, R., Abraham, D. & Aharinejad, S. Colony-stimulating factor-1 antibody reverses chemoresistance in human MCF-7 breast cancer xenografts. *Cancer Res.* **66**, 4349–4356 (2006).
- 369. Aharinejad, S., Sioud, M., Lucas, T. & Abraham, D. Target validation using RNA interference in solid tumors. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **361**, 227–238 (2007).
- 370. Xu, J. *et al.* CSF1R signaling blockade stanches tumor-infiltrating myeloid cells and improves the efficacy of radiotherapy in prostate cancer. *Cancer Res.* **73**, 2782–2794 (2013).
- 371. Ryder, M. *et al.* Genetic and pharmacological targeting of CSF-1/CSF-1R inhibits tumorassociated macrophages and impairs BRAF-induced thyroid cancer progression. *PloS One* **8**, e54302 (2013).
- 372. Priceman, S. J. *et al.* Targeting distinct tumor-infiltrating myeloid cells by inhibiting CSF-1 receptor: combating tumor evasion of antiangiogenic therapy. *Blood* **115**, 1461–1471 (2010).
- 373. Pyonteck, S. M. *et al.* CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nat. Med.* **19**, 1264–1272 (2013).
- 374. Manthey, C. L. *et al.* JNJ-28312141, a novel orally active colony-stimulating factor-1 receptor/FMS-related receptor tyrosine kinase-3 receptor tyrosine kinase inhibitor with potential utility in solid tumors, bone metastases, and acute myeloid leukemia. *Mol. Cancer Ther.* **8**, 3151–3161 (2009).
- 375. Mok, S. *et al.* Inhibition of CSF-1 receptor improves the antitumor efficacy of adoptive cell transfer immunotherapy. *Cancer Res.* **74**, 153–161 (2014).
- 376. Van Overmeire, E. *et al.* M-CSF and GM-CSF Receptor Signaling Differentially Regulate Monocyte Maturation and Macrophage Polarization in the Tumor Microenvironment. *Cancer Res.* **76**, 35–42 (2016).
- 377. Quail, D. F. *et al.* The tumor microenvironment underlies acquired resistance to CSF-1R inhibition in gliomas. *Science* **352**, aad3018 (2016).
- 378. von Tresckow, B. *et al.* An Open-Label, Multicenter, Phase I/II Study of JNJ-40346527, a CSF-1R Inhibitor, in Patients with Relapsed or Refractory Hodgkin Lymphoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **21**, 1843–1850 (2015).
- 379. Carpenter, G. & Liao, H.-J. Receptor Tyrosine Kinases in the Nucleus. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, a008979–a008979 (2013).
- 380. Gomes, D. A. *et al.* c-Met Must Translocate to the Nucleus to Initiate Calcium Signals. *J. Biol. Chem.* **283**, 4344–4351 (2008).
- 381. Lee, T.-H. *et al.* Vascular Endothelial Growth Factor Mediates Intracrine Survival in Human Breast Carcinoma Cells through Internally Expressed VEGFR1/FLT1. *PLoS Med.* **4**, e186 (2007).
- 382. Matteucci, E., Bendinelli, P. & Desiderio, M. A. Nuclear localization of active HGF receptor Met in aggressive MDA-MB231 breast carcinoma cells. *Carcinogenesis* **30**, 937–945 (2009).
- 383. Li, C., Iida, M., Dunn, E. F., Ghia, A. J. & Wheeler, D. L. Nuclear EGFR contributes to acquired resistance to cetuximab. *Oncogene* **28**, 3801–3813 (2009).

- 384. Guilbert, L. J. & Stanley, E. R. Specific interaction of murine colony-stimulating factor with mononuclear phagocytic cells. *J. Cell Biol.* **85**, 153–159 (1980).
- 385. Aucagne, R. *et al.* Transcription intermediary factor 1γ is a tumor suppressor in mouse and human chronic myelomonocytic leukemia. *J. Clin. Invest.* **121**, 2361–2370 (2011).
- 386. Pham, T.-H. *et al.* Dynamic epigenetic enhancer signatures reveal key transcription factors associated with monocytic differentiation states. *Blood* **119**, e161-171 (2012).
- 387. Saeed, S. *et al.* Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity. *Science* **345**, 1251086 (2014).
- 388. Xie, L. MKL1/2 and ELK4 co-regulate distinct serum response factor (SRF) transcription programs in macrophages. *BMC Genomics* **15**, 301 (2014).
- 389. Joo, M. *et al.* Yin Yang 1 enhances cyclooxygenase-2 gene expression in macrophages. *AJP Lung Cell. Mol. Physiol.* **292**, L1219–L1226 (2007).
- 390. Bober, J. *et al.* Identification of new FGF1 binding partners-Implications for its intracellular function. *IUBMB Life* **68**, 242–251 (2016).
- 391. Scholl, S. M. *et al.* Anti-colony-stimulating factor-1 antibody staining in primary breast adenocarcinomas correlates with marked inflammatory cell infiltrates and prognosis. *J. Natl. Cancer Inst.* **86**, 120–126 (1994).
- 392. la Cour, T. *et al.* Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng. Des. Sel.* **17**, 527–536 (2004).
- 393. Cordo Russo, R. I. *et al.* Targeting ErbB-2 nuclear localization and function inhibits breast cancer growth and overcomes trastuzumab resistance. *Oncogene* **34**, 3413–3428 (2015).
- 394. Hong, T., Summers, M. D. & Braunagel, S. C. N-terminal sequences from Autographa californica nuclear polyhedrosis virus envelope proteins ODV-E66 and ODV-E25 are sufficient to direct reporter proteins to the nuclear envelope, intranuclear microvesicles and the envelope of occlusion derived virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 4050–4055 (1997).
- 395. Chaumet, A. *et al.* Nuclear envelope-associated endosomes deliver surface proteins to the nucleus. *Nat. Commun.* **6**, 8218 (2015).
- 396. Spitz, F. Gene regulation at a distance: From remote enhancers to 3D regulatory ensembles. *Semin. Cell Dev. Biol.* **57**, 57–67 (2016).
- 397. Lee, H. J., Mignacca, R. C. & Sakamoto, K. M. Transcriptional activation of egr-1 by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor but not interleukin 3 requires phosphorylation of cAMP response element-binding protein (CREB) on serine 133. *J. Biol. Chem.* **270**, 15979–15983 (1995).
- 398. Kenzel, S. *et al.* Role of p38 and early growth response factor 1 in the macrophage response to group B streptococcus. *Infect. Immun.* **77**, 2474–2481 (2009).
- 399. Ogura, M. & Kitamura, M. Oxidant stress incites spreading of macrophages via extracellular signal-regulated kinases and p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 **161**, 3569–3574 (1998).

- 400. Jablonski, K. A. *et al.* Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages. *PloS One* **10**, e0145342 (2015).
- 401. Demir, O. & Aksan Kurnaz, I. Wildtype Elk-1, but not a SUMOylation mutant, represses egr-1 expression in SH-SY5Y neuroblastomas. *Neurosci. Lett.* **437**, 20–24 (2008).
- 402. Obba, S. *et al.* The PRKAA1/AMPKα1 pathway triggers autophagy during CSF1-induced human monocyte differentiation and is a potential target in CMML. *Autophagy* **11**, 1114–1129 (2015).
- 403. Hwang, S. S. *et al.* Transcription factor YY1 is essential for regulation of the Th2 cytokine locus and for Th2 cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 276–281 (2013).
- 404. Kim, G.-D. *et al.* Kruppel-like Factor 6 Promotes Macrophage-mediated Inflammation by Suppressing B Cell Leukemia/Lymphoma 6 Expression. *J. Biol. Chem.* **291**, 21271–21282 (2016).
- 405. Boyette, L. B. *et al.* Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets. *PloS One* **12**, e0176460 (2017).
- 406. Platzbecker, U. *et al.* Lenalidomide as induction therapy before allogeneic stem cell transplantation in a patient with proliferative CMML-2 and del(5q) not involving the EGR1 locus. *Leukemia* **21**, 2384–2385 (2007).
- 407. Lagrange, B. *et al.* A role for miR-142-3p in colony-stimulating factor 1-induced monocyte differentiation into macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* **1833**, 1936–1946 (2013).
- 408. Zhang, L. *et al.* c-kit expression profile and regulatory factors during spermatogonial stem cell differentiation. *BMC Dev. Biol.* **13**, 38 (2013).
- 409. Ito, S. *et al.* Mad2 is required for optimal hematopoiesis: Mad2 associates with c-Kit in M07e cells. *Blood* **109**, 1923–1930 (2007).



Titre : Fonctions nucléaires du récepteur de CSF-1 dans les monocytes humains Mots clés : CSF-1R, Monocyte, Macrophage, Récepteur à activité tyrosine kinase nucléaire, Polarisation macrophagique, M-CSFR

exprimé à la surface des monocytes, des macrophages et de leurs progéniteurs. Son ligand, CSF-1, oriente les cellules souches hématopoïétiques vers le lignage myéloïde et permet la différenciation des monocytes en macrophages. Une localisation nucléaire de CSF-1R a été décrite dans certaines lignées tumorales, dans des tumeurs mammaires primitives et dans les macrophages murins. Dans le noyau de ces cellules, CSF-1R régulerait la phosphorylation de protéines nucléaires et l'expression de gènes de la prolifération. Nous avons identifié une localisation nucléaire de CSF-1R dans les monocytes primaires humains par différentes approches et différents anticorps. La forme nucléaire de CSF-1R correspond à la protéine entière monomérique qui est transportée depuis la membrane plasmique vers le noyau, de manière rétrograde, après activation par son ligand et avec celui-ci. L'utilisation d'inhibiteurs de l'activité kinase de CSF-1R diminue la quantité de récepteur dans le novau. En revanche le blocage des mécanismes d'export nucléaire dépendant de CRM-1 par la leptomycine B conduit à l'accumulation de la protéine dans ce compartiment. Dans les monocytes, CSF-1R est localisé sur la chromatine, dans les régions intergéniques et introniques et colocalise avec la marque H3K4me1 présente au niveau des enhancers activés. CSF-1R est situé à proximité de gènes régulant la morphogénèse, le développement du système nerveux, l'ossification et la différenciation cellulaire. Le récepteur est présent sur le promoteur du gène PU.1, facteur de transcription clé dans la différenciation myéloïde et la

Résumé : CSF-1R (colony-stimulating factor 1 receptor) est un génération des monocytes, ainsi que sur d'autres gènes impliqués dans la récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase différenciation, la polarisation, la survie et les fonctions des macrophages. Au niveau de la chromatine, CSF-1R interagit avec des facteurs de transcription comme EGR1 sur lequel il exerce un effet co-répresseur. Cette localisation nucléaire de CSF-1R est conservée lorsque les monocytes se différencient en macrophages en réponse à CSF-1. CSF-1R nucléaire est alors relocalisé vers les régions promotrices et exoniques où il colocalise avec la marque H3K4me3. Il est présent à proximité de gènes régulant la vascularisation, la phagocytose, le métabolisme, la réponse au stress et à l'hypoxie. Il interagit avec les facteurs de transcription ELK1 et YY1, et joue un rôle co-activateur. Lorsque les monocytes sont différenciés en macrophages par une autre cytokine, CSF-2, CSF-1R reste dans le noyau des cellules mais sa localisation sur la chromatine et ses interacteurs diffèrent de ceux des monocytes et des macrophages générés par CSF-1, démontrant un régulation différentielle de CSF-1R nucléaire selon le stade de différenciation et les signaux environnementaux. Dans des monocytes de patients atteints de leucémie myélomonocytaire chronique, l'expression et la localisation sur l'ADN de CSF-1R sont modifiées, indiquant une dérégulation des fonctions nucléaires du récepteur en condition pathologique. CSF-1R est donc localisé dans le noyau des monocytes et des macrophages où il exerce un rôle de régulation de l'expression des gènes dont PU.1. Des résultats préliminaires suggèrent une localisation nucléaire du récepteur dans certaines populations de progéniteurs myéloïdes où il pourrait participer à la régulation de la différenciation. De nombreux inhibiteurs de CSF-1R sont en développement afin de cibler les macrophages infiltrant les tumeurs. Nos résultats démontrent que certains inhibiteurs ont la capacité de cibler la forme membranaire et la forme nucléaire du récepteur et donc d'inhiber l'ensemble des activités de CSF-1R dans les cellules, renforçant l'activité potentielle de ces traitements.

Title : CSF-1 receptor nuclear functions in human monocytes Keywords : CSF-1R, Monocyte, Macrophage, Nuclear tyrosine kinase receptor, Macrophage polarization, M-CSFR

Abstract : CSF-1R (colony-stimulating factor 1 receptor) is a macrophage functions, differentiation, polarization and survival. At the hematopoietic stem cells to direct their differentiation into the in cancer cell lines, primary breast tumors and murine macrophages. In the cell nucleus, CSF-1R was suggested to regulate nuclear protein phosphorylation and gene expression. We demonstrate that a small part of CSF-1R is in the nucleus of technical approaches. Nuclear CSF-1R corresponds to full length monomeric receptor. After activation by its ligand, CSF-1, CSF-1R is translocated from the cell surface to the nucleus activity inhibitors impaired this process while inhibitor of effect. In monocytes, CSF-1R is localized on chromatin, mainly on intergenic and intronic regions. It colocalizes with system development, ossification and cell differentiation. CSFdifferentiation. CSF-1R is also present on genes implicated in

transmembrane receptor with a tyrosine kinase activity. It is chromatin level, CSF-1R interacts with different transcription factors like expressed at the cell surface of monocytes, macrophages and EGR1 and exerts a co-repressive role to decrease or limit gene expression. their progenitors. Its ligand, CSF-1, has an instructive role on CSF-1R nuclear localization persists in macrophages generated by monocyte exposure to CSF-1. It entails CSF-1R relocalization on promoter-TSS and myeloid lineage. CSF-1R is also able to differentiate monocytes exonic regions where it colocalizes with H3K4me3 mark. The receptor is into macrophages. A nuclear location was described for CSF-1R close to genes regulating vascularization, phagocytosis, metabolism, stress and hypoxia responses. CSF-1R interacts with ELK1 and YY1 to promote gene expression. When monocytes are differentiated into macrophages with CSF-2, CSF-1R also remains in the nucleus. However, its chromatin localization and interactions change compared to monocytes and CSF-1 primary human monocytes, using different antibodies and differentiated macrophages. This indicates that nuclear CSF-1R is differentially regulated, depending on the cytokine that triggers cell differentiation. In monocytes isolated from chronic myelomonocytic leukemia patients, CSF-1R expression and chromatin localization are through a retrograde transport, together with CSF-1. Kinase modified, indicating a deregulated CSF-1R nuclear function under pathological state. All together, we showed that CSF-1R is localized in the CRM1-dependant nuclear export (leptomycin B) can revert this nucleus of human monocytes and macrophages where it regulates gene expression including PU.1. Preliminary results suggest CSF-1R nuclear location in myeloid progenitor subsets where the receptor could directly H3K4me1 mark which signs active enhancers. The receptor is regulate the expression of myeloid differentiation genes. Targeting CSF-1R is present near genes involved in morphogenesis, nervous currently tested as a therapeutic strategy to impair tumor infiltrating macrophages. Our results show that CSF-1R inhibitors are able to target 1R is also located on PU.1 promoter, which is a master both membrane and nuclear forms and thus inhibit all CSF-1R activities in transcription factor involved in myeloid cell and monocyte the cells, enhancing the potential therapeutic effects of these molecules.