



HAL
open science

Etude de la dynamique des phagocytes mononucléés au cours du processus inflammatoire

Pauline Hamon

► **To cite this version:**

Pauline Hamon. Etude de la dynamique des phagocytes mononucléés au cours du processus inflammatoire. Immunologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066435 . tel-01898078

HAL Id: tel-01898078

<https://theses.hal.science/tel-01898078>

Submitted on 18 Oct 2018

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

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

Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale ED515 : Complexité du vivant

Thèse de doctorat
Spécialité : Immunologie

**Etude de la dynamique des phagocytes
mononucléés au cours du processus
inflammatoire**

Présentée par

Pauline Hamon

Dirigée par le **Dr Alexandre Boissonnas**

CIMI-Paris Inserm U1135, Equipe 6 : Chimiokines dans les pathologies inflammatoires

Présentée et soutenue publiquement le 16 octobre 2017

Devant le jury composé de :

Dr Alexandre Boissonnas : Directeur de thèse
Dr Florence Niedergang : Rapporteur
Dr Jo van Ginderachter : Rapporteur
Dr Françoise Bachelerie : Examineur
Dr Benoît Salomon : Président

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord les membres de mon jury, qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'évaluer mes travaux de recherches. Je vous remercie de l'intérêt que vous y avez porté.

Je remercie aussi la Ligue contre le cancer et tous ses donateurs, pour m'avoir fait confiance et avoir financé ma thèse, parce que c'est aussi grâce à vous si la recherche avance.

Je tiens à remercier Christophe Combadière, notre super chef d'équipe et directeur du CIMI. Merci pour ton accueil, pour ta capacité à être à l'écoute des gens et pour tes bons conseils. Merci pour l'intérêt sincère que tu nous portes. Merci aussi à Philippe, pour toutes ces discussions et pour nous faire partager tes connaissances.

J'écris maintenant des remerciements tout particuliers, qui me tiennent vraiment à cœur. J'adresse un grand et sincère merci à Alex, Dr Alexandre Boissonnas, mon directeur de thèse, notre papa du labo (et c'est toi qui le dit). J'ai pour toi une gratitude immense et un profond respect, teinté d'admiration. Merci de m'avoir fait confiance, depuis ce tout premier entretien il y a 4 ans. Merci d'avoir cru en moi pour que nous puissions vivre cette tortueuse et formidable aventure que représente la thèse. Merci pour ta patience, tes conseils et ta disponibilité. Je n'aurais pas pu rêver meilleure expérience et meilleure formation que celles que tu m'as données. Je te souhaite d'avoir encore plein de thésards avec qui tu vas t'éclater à faire de la recherche !!

Pilou !! Toi, tu es un peu mon frangin de thèse, on a grandi dans la recherche ensemble. Entre chamailleries et franches rigolades, on ne s'est jamais ennuyé. Merci pour tous ces bons moments partagés. Camille, toi aussi t'es un peu notre petite sœur de thèse. C'est toujours un plaisir de discuter et d'échanger avec toi, de partager, tout simplement. Tu peux tout entendre et tu peux aussi tout dire, surtout ce que je ne veux pas entendre (je suis traumatisée à vie, particulièrement quand tu t'y mets avec Alex)! Je parle de papa, de frère et de sœur, parce que oui, vu le temps qu'on y passe, le labo devient un peu comme une famille et la famille pour moi, vous le savez, c'est important. Et donc il manque la maman, partie vers de nouveaux horizons. Merci Patricia pour tout ce que tu m'as appris dans ce laboratoire, merci pour tes conseils en tout genre. Merci pour ta bonne humeur, tes sourires et tes massages que tu n'offrais qu'à nous.

Merci à tous les autres membres de l'équipe, passés et présents. Merci à Mathieu et Fab, pour votre accueil et votre gentillesse. Je n'oublierai jamais tous les moments passés à l'animalerie ou au bif avec vous et je suis ravie de continuer à vous voir même si vous n'êtes plus au labo. Merci Aïda, notre nouvelle post-doc, tu as remis un peu d'ordre dans les labos ! Merci à Sara, fille de Thor et ma toute première stagiaire, on a passé de supers bons moments.

L'équipe c'est bien, mais ce n'est pas tout. Il y en a du monde autour. Merci à toutes les équipes du 6^{ème} et du 5^{ème}, c'est un plaisir d'avoir évolué avec vous.

Merci à l'équipe de Béhazine, merci à Jess, Clément, les copains de galère, on l'a vécue ensemble cette thèse. Merci à Olivia et Angèle. Merci tout particulièrement à Hélène et Mélo, la vie de labo avec vous, ça déchire !! Vous me manquez les poufs.

Un peu dans le désordre, mais je tiens à remercier Simon, Jordane, Marie, Raph, Mathias, Emilie, Romain, Sandrine, Stéphanie, James, Karim...

Parce que la vie de labo, ça ne dépend pas seulement des petits rats de laboratoire et des chefs en orbite, mais aussi des justiciers de l'ombre. Pour cela, je tiens à remercier Pascale et Marie-Ange, ça a été un plaisir de vous connaître et de pouvoir venir vous embêter n'importe quand pour vous demander n'importe quoi ! Je remercie aussi Saddi, toujours prête à passer un coup de téléphone pour me sauver la mise et toujours plein de sourires à revendre. Merci à toute l'équipe des gestionnaires.

Au labo, on fait parfois des rencontres qui se passent tellement bien que ça sort des locaux et ça se poursuit sans soucis en dehors. Un gros merci à Nora, la pouf parmi les poufs. Nono, c'est un vrai plaisir d'être ton amie et de passer tout ce temps avec toi. Merci pour tout ce que tu m'as fait découvrir (non, je ne parle pas que des plats arabes). On a beaucoup partagé toutes les deux, des moments de folies, on a fait les montagnes russes des sentiments (oui je sais que tu détestes ça). Et n'oublie pas, tu lui fais deux bisous.

On nous a qualifié de coup de foudre amical et je crois toujours que c'est on ne peut plus vrai. Parce que tu me connais mieux que personne, parce que tu es mon code, ma confidente et mon amie. Esther, merci pour tout ce que tu as changé en moi, merci de m'avoir sauvée.

Sans transition (oui Alex, même dans les remerciements), je veux remercier ma famille, ceux qui me soutiennent depuis le début, merci pour vos attentions et vos encouragements. Papa, Maman, vous m'avez tout donné, vous m'avez toujours soutenue dans tous les choix que j'ai pu faire. Cette thèse, c'est aussi un peu la vôtre. Gurvan, mon frerot, je sais que je pourrais toujours compter sur toi, merci. Et c'est réciproque.

Merci à tous les autres, mes grands-parents, Dadi et Dadou (merci particulier à Germaine et au bureau qui m'ont bien sauvé la mise). Merci aux Plessis, Titine, Topine et Romain parce que sans vos rires, ça n'aurait pas été pareil.

Merci à ma filleule, Louise, qui me redonne de l'espoir.

RESUME

Contrairement au dogme original décrit par van Furth sur le système des phagocytes mononucléés (MP), il est maintenant suggéré que les monocytes ne représentent plus uniquement des précurseurs de macrophages mais qu'ils exercent des fonctions immunologiques en tant que tel. Non seulement les monocytes sont capables de circuler dans les tissus sans se différencier en macrophages mais la plupart des macrophages tissulaires ont en réalité une origine embryonnaire. Je me suis intéressée à l'activité migratoire et aux fonctions effectrices des monocytes et des macrophages grâce à l'utilisation de l'imagerie intravitale. Cette approche nous a permis d'appréhender la dynamique des MP entre le réseau vasculaire et le parenchyme tissulaire. De cette façon nous avons pu mettre en évidence le rôle de CX3CR1 dans le contrôle du déploiement monocyttaire dans un modèle d'inflammation aiguë.

En parallèle, dans un modèle de métastases pulmonaires, nous avons démontré que les monocytes ne contribuent qu'à une partie des macrophages associés aux tumeurs (TAM) et que l'autre partie dérive de la prolifération des macrophages interstitiels du poumon. Ces différentes sous-populations de TAM semblent avoir des contributions différentes dans le développement tumoral et la réponse à la chimiothérapie.

Mon travail a permis de mieux appréhender la biologie des monocytes au-delà de leur fonction comme simples précurseurs de macrophages et apportent des concepts nouveaux sur l'origine des TAM. Ces travaux ouvrent de nouvelles perspectives dans la compréhension des mécanismes biologiques gouvernés par les MP et dans la régulation la réponse inflammatoire.

ABSTRACT

Contrariwise to the original dogma established by van Furth on the Mononuclear Phagocyte System (MPs), it is now suggested that monocyte fate and functions should not be restricted to macrophage precursors. Experimental evidences show that monocytes can circulate in tissues without differentiating and most of the tissue associated macrophages have embryonic origin. My thesis work focused on migratory activity and effective functions of monocytes and macrophages based on intravital imaging technology. This approach represent a unique tool to study the dynamic of MPs between the vasculature and tissue parenchyma. Our work provided new insights in the role of CX3CR1 in the monocyte deployment during acute inflammatory response.

In a model of pulmonary metastases, we also demonstrated that monocytes represent only one part of tumor associated macrophages (TAMs) and the other part is constituted by lung interstitial macrophages. These different subsets of TAMs seem to contribute differently in tumor development and response to chemotherapy.

Overall my work provides new insights about monocyte biology beyond their macrophage precursor fate and presents new concepts on the origin of TAMs. It also adds new perspectives in the understanding of biological mechanism regulated by MPs and in the control of the inflammatory response.

REMERCIEMENTS.....	1
RESUME.....	5
ABSTRACT	7
ABREVIATIONS.....	14
AVANT-PROPOS	16
INTRODUCTION.....	20
<u>Les phagocytes, acteurs de l'immunité innée.....</u>	<u>20</u>
Caractéristiques des phagocytes professionnels	20
<i>Les monocytes</i>	<i>20</i>
<i>Les cellules dendritiques.....</i>	<i>24</i>
<i>Les macrophages.....</i>	<i>25</i>
Fonctions des phagocytes mononucléés.....	31
<i>La phagocytose</i>	<i>31</i>
<i>Cytotoxicité des phagocytes mononucléés</i>	<i>32</i>
<i>Production de cytokines.....</i>	<i>33</i>
<i>La présentation antigénique.....</i>	<i>34</i>
<u>Le réseau chimiokinique dans la migration des phagocytes mononucléés</u>	<u>36</u>
Principe de la migration des leucocytes.....	37
<i>Les différents types de migration</i>	<i>37</i>
<i>Mobilisation des leucocytes et recrutement dans les tissus</i>	<i>39</i>
Les chimiokines et leurs récepteurs.....	42
<i>Conformation des chimiokines.....</i>	<i>42</i>

<i>Les récepteurs de chimiokines</i>	<i>45</i>
Fonctions associées aux chimiokines	47
<i>Les chimiokines dans la surveillance immunitaire</i>	<i>47</i>
<i>Les chimiokines dans la prolifération et la survie des leucocytes</i>	<i>49</i>
<i>Rôle des chimiokines dans l'angiogenèse</i>	<i>49</i>
Les principaux couples de chimiokines impliqués dans la mobilisation des monocytes	52
<i>CCR2/CCL2</i>	<i>52</i>
<i>CX3CR1/CX3CL1</i>	<i>53</i>
Les antagonistes des chimiokines	55
<u>Les phagocytes mononucléés dans le cancer</u>	<u>59</u>
L'inflammation et le système immunitaire dans le cancer	59
<i>Inflammation et Cancer.....</i>	<i>59</i>
<i>Les concepts d'immunosurveillance et d'immunoediting</i>	<i>63</i>
Les macrophages dans le cancer	69
<i>Le rôle des monocytes</i>	<i>70</i>
<i>Rôle des macrophages dans la réponse anti-tumorale</i>	<i>71</i>
<i>Le rôle pro-tumoral des macrophages</i>	<i>73</i>
<i>Implication des macrophages dans l'invasion des cellules tumorales et les métastases</i>	<i>76</i>
Implication des phagocytes mononucléés dans les thérapies anti-cancéreuses	79
<i>Les différentes thérapies anti-cancéreuses</i>	<i>79</i>

<i>Les effets secondaires des thérapies conventionnelles sur les phagocytes mononucléés.....</i>	82
<i>Les anticorps monoclonaux associés aux macrophages pour détruire la tumeur.....</i>	85
<i>Les couples CCL2/CCR2 et CX3CL1/CX3CR1 comme cibles des thérapies anti-tumorales.....</i>	88
OBJECTIFS DE LA THESE	94
RESULTATS	96
<u>Travaux principaux.....</u>	<u>96</u>
Article 1 : “Tracking mouse bone marrow monocytes <i>in vivo</i>”	98
<i>Contexte de l’étude.....</i>	98
<i>Principaux résultats</i>	99
<i>Conclusion et perspectives.....</i>	100
Article 2 : “CX3CR1-dependant endothelial margination modulates Ly6C^{high} monocyte systemic deployment upon inflammation in mice”	103
<i>Contexte de l’étude.....</i>	103
<i>Principaux résultats</i>	104
<i>Conclusion et perspectives.....</i>	106
Article 3 : “Implication of resident and recruited macrophages in lung metastasis development and response to cancer therapies”	109
<i>Contexte de l’étude.....</i>	109
<i>Principaux résultats</i>	110
<i>Conclusion et perspectives.....</i>	114

<u>Travaux annexes.....</u>	<u>117</u>
<u>Travaux collaboratifs.....</u>	<u>121</u>
DISCUSSION	123
BIBLIOGRAPHIE	132

ABREVIATIONS

ADCC : Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps	EMP : Progéniteur érythro-myéloïde
ADCP : Phagocytose cellulaire dépendante des anticorps	IFN : Interféron
APC : Cellule présentatrice d'antigène	IL : Interleukine
CCL2 : C-C chemokine ligand 2	LFA-1 : Antigène associé aux fonctions lymphocytaires 1
CCR2 : C-C chemokine receptor 2	LLC : Leucémie lymphoïde chronique
CLP : Ligature et piqûre du caecum	LPS : Lipopolysaccharide
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité	MAMP : Motif moléculaire associé aux microbes
CP : Cyclophosphamide	MDSC : Cellule myéloïde suppressive
CSF : Facteur de stimulation formant des colonies	MP : Phagocyte mononucléé
CTL : Lymphocyte T cytotoxique	MTC : Cytotoxicité générée par les macrophages
CX3CL1 : C-X3-C chemokine ligand 1	NK : Cellule « Natural Killer »
CX3CR1 : C-X3-C chemokine receptor 1	PRR : Récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires
DAMP : Motif moléculaire associé aux dégâts cellulaires	SHG : Génération de seconde harmonique
DC : Cellule dendritique	SLO : Organes lymphoïdes secondaires
dLN : Ganglion lymphatique drainant	TAM : Macrophage associé aux tumeurs
ECFP : Protéine fluorescente cyan améliorée	TGF : Facteur de croissance transformant
EGFP : Protéine fluorescente verte améliorée	TLR : Récepteur de type Toll
ECM : Matrice extracellulaire	TME : Microenvironnement tumoral
	TNF : Facteur de nécrose tumorale
	Treg : Lymphocyte T régulateur
	VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

AVANT-PROPOS

Le système immunitaire est composé d'un grand nombre de cellules spécialisées interagissant ensemble dans le but de protéger l'organisme contre les infections par les bactéries, les champignons, les parasites ou les virus, contre le développement tumoral et de participer à la réparation tissulaire. La réponse immunitaire nécessite un trafic permanent des leucocytes entre les tissus via le sang et la lymphe. Cette dynamique finement régulée permet d'apporter la bonne cellule, au bon endroit et au bon moment.

Les monocytes et les macrophages sont des cellules de l'immunité innée, intervenant dans les premières étapes de la réponse immune. Ils ont été découverts grâce à leur capacité à phagocyter des grosses particules et font partie du système des phagocytes mononucléés dont la définition a été proposée par Van Furth dans les années 1970. Ils ont un rôle de surveillance dans le sang et les tissus et peuvent détecter des ruptures de l'équilibre homéostatique. En cas de pénétration d'un organisme étranger, ces cellules sont capables de limiter très rapidement l'infiltration des microbes voire même de les éradiquer. A plus long terme, les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques participent à la mise en place de l'immunité adaptatrice en transportant et en présentant des peptides antigéniques issus des microbes phagocytés aux lymphocytes.

Les monocytes ont longtemps été considérés comme des cellules sensés se différencier rapidement en macrophages ou en cellules dendritiques. Des données récentes remettent en question ce dogme et proposent qu'en condition homéostatique, ces monocytes sont capables de surveiller les tissus sans se différencier. En dehors de leur fonction de progéniteurs de macrophages ou de DC inflammatoires au cours de la réponse inflammatoire, le rôle de ces « monocytes tissulaires » est encore peu connu. Durant ma thèse, j'ai cherché à caractériser

leurs fonctions propres dans un contexte de réponse inflammatoire aiguë ou chronique au cours du développement tumoral.

En effet, l'inflammation est un des marqueurs du cancer. Le développement d'une tumeur n'est pas le simple fait de la prolifération non contrôlée de cellules anormales mais fait intervenir des cellules du microenvironnement dont les cellules immunitaires et en particulier les phagocytes mononucléés. Les macrophages associés aux tumeurs (TAM), décrit comme provenant de la différenciation monocyttaire, représentent la population immune la plus dense sur le site tumoral et possèdent une dualité fonctionnelle pouvant faire d'eux à la fois des acteurs anti- ou pro-tumoraux, concept reconnu comme « paradoxe macrophagique ». Depuis la démonstration que la plupart des macrophages tissulaires ont une origine embryonnaire, l'ontogénie des TAM est complètement remise en question. Ainsi, je considère que l'étude de leur origine représente une évolution conceptuelle capitale dans la compréhension de ce paradoxe et surtout dans la compréhension des mécanismes de résistance aux thérapies.

L'étude de la dynamique du système des phagocytes mononucléés m'a conduit à m'intéresser au réseau des chimiokines et de leurs récepteurs. En effet, les cellules présentes sur le site inflammatoire, telles que les macrophages résidents ou les cellules endothéliales vont participer au recrutement des leucocytes en produisant notamment des chimiokines. Ces molécules sont indispensables pour mobiliser les cellules immunitaires et permettre leur pénétration dans les tissus. Les chimiokines ne sont pas produites uniquement en conditions inflammatoires, elles coordonnent la mobilisation des leucocytes exprimant des récepteurs associés dans tout l'organisme en conditions physiologiques et pathologiques. Elles participent à leur activation et peuvent être des éléments clés dans la mise en place de fonctions effectrices. CCL2 et CX3CL1 sont les principales chimiokines qui régulent le recrutement, ainsi que la survie et la prolifération des monocytes et des macrophages en les

activant via les récepteurs CCR2 et CX3CR1 respectivement. Ainsi ces récepteurs représentent des éléments clés dans la régulation de la biologie des monocytes, c'est pourquoi mon travail de thèse a traité en partie sur le rôle de ces récepteurs dans les mécanismes de mobilisation des phagocytes mononucléés au cours de la réponse inflammatoire.

Pour introduire mon travail de thèse, je vais tout d'abord exposer les fonctions des phagocytes mononucléés et leur rôle prépondérant lors de la mise en place de la réponse inflammatoire. Puis, je présenterai les protagonistes de cette mobilité que sont les chimiokines, quelles sont leurs caractéristiques et en quoi il est primordial d'améliorer notre compréhension du réseau de chimiokines pour mieux appréhender leur impact sur les leucocytes. Enfin, pendant le développement tumoral, nous avons étudié les différents rôles des macrophages associés aux tumeurs et quels pouvaient être les avantages à les désigner comme cibles thérapeutiques.

Dans l'ensemble, mon travail de thèse est basé sur l'étude à la fois spatiale et temporelle de la mobilisation des phagocytes mononucléés et permet d'avoir une vision plus intégrée de leur biologie et de leur implication dans divers contextes physiopathologiques.

INTRODUCTION

Les phagocytes, acteurs de l'immunité innée

Les cellules du système des phagocytes mononucléés, décrites par van Furth sur la base de leur activité phagocytaire et de leur mobilité, regroupent les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques et l'ensemble des précurseurs (van Furth et al., 1972). Elles ont des fonctions primordiales dans le maintien de l'homéostasie tissulaire et dans la réponse inflammatoire. Les monocytes sont à l'origine décrits comme une population dynamique présents principalement dans le sang et ayant la capacité de se différencier en macrophages. Ces derniers sont des cellules très plastiques, résidants dans les tissus où ils exercent des fonctions adaptées à leur environnement. Cette partie de mon introduction présentera les données récentes sur l'origine, les fonctions et la distribution dans l'organisme de ces cellules afin d'appréhender leur importance dans les contextes inflammatoires ou cancéreux.

Caractéristiques des phagocytes professionnels

Les monocytes

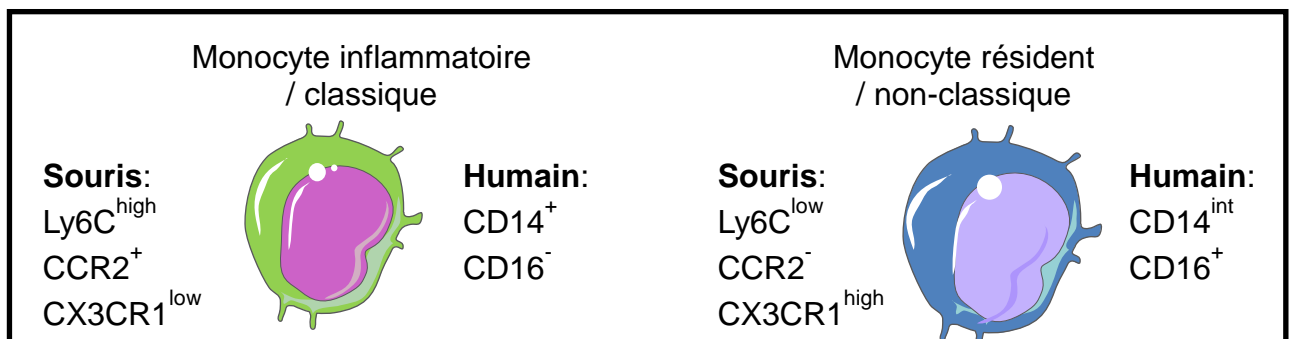


Figure 1: Phénotypes des sous-populations de monocytes chez l'homme et la souris. Les monocytes inflammatoires chez la souris ou classiques chez l'homme sont distingués des monocytes résidents (souris) ou non-classiques (homme) par l'expression différentielle de certains marqueurs.

Les monocytes sont issus des cellules souches hématopoïétiques présentes dans la moelle osseuse. Il existe deux principales sous-populations de monocytes équivalentes chez l'homme et la souris que l'on distingue par leur profil d'expression de marqueurs membranaires tels que les récepteurs de chimiokines CCR2 et CX3CR1 (**Figure 1**) (Auffray et al., 2009).

Les monocytes humains

Chez l'homme, les monocytes classiques représentent plus de 90% des monocytes circulants. Ils font environ 18,5µm de diamètre et sont caractérisés comme étant CD14⁺ (corécepteur du lipopolysaccharide (LPS)) et CD16⁻ (Récepteur Fcγ III). Ce sont d'importantes cellules phagocytaires avec une bonne capacité à développer une réponse cellulaire cytotoxique dépendante des anticorps (ADCC) mais de faibles productrices de cytokines pro-inflammatoires (Connor et al., 1990); (Passlick et al., 1989).

Les monocytes non-classiques sont de plus petite taille, 13,8µm et sont CD14^{int}CD16⁺. Ces cellules expriment plus le complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMHII) ce qui en font des cellules dendritiques efficaces quand ils se différencient (Kruzic et al., 2005). Randolph *et al.* ont proposé un modèle de migration transendothéliale où les monocytes non-classiques sont les plus susceptibles de se différencier en DC, induisant ensuite une meilleure prolifération des lymphocytes T (Randolph et al., 2002). Ce sont d'importants producteurs de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNFα, l'IL-6 ou l'IL-8 (Belge et al., 2002); (Thaler et al., 2016). Ces monocytes ont aussi été appelés monocytes inflammatoires en raison de l'augmentation de leur nombre dans le sang de patients en conditions inflammatoires telles que la septicémie et le cancer (Mukherjee et al., 2015); (Saleh et al., 1995). Cette nomination tend à disparaître car elle induit une confusion avec les monocytes inflammatoires présents chez la souris qui correspondent aux cellules équivalentes des monocytes classiques.

Il existe une troisième sous-population monocyttaire chez l'humain, les monocytes intermédiaires qui sont CD14⁺ CD16⁺. Cette population auparavant considérée comme non-classique correspondrait aux cellules en transition depuis les monocytes classiques vers les monocytes non-classiques (Patel et al., 2017). Ces monocytes ont été isolés et présentent des fonctions différentes des autres sous-populations. L'analyse transcriptomique des monocytes intermédiaires par Zawada *et al.* a permis de révéler des marqueurs spécifiques impliqués dans la présentation antigénique (CD74, HLA-DR, IFI30, CSTB), l'activation des monocytes et l'inflammation (TGFβ1, AIF1, PTPN6) et dans l'angiogenèse (TIE2, CD105) (Zawada et al., 2011).

Les monocytes murins

Chez la souris, les monocytes inflammatoires sont des cellules de 8 à 12µm de diamètre qui représentent environ 50% des monocytes circulants. Ce sont des cellules à courte durée de vie (demi-vie d'environ 20h) qui sont définies comme Ly6C^{high} CCR2⁺ CX3CR1^{low}. Ils sont recrutés dans les tissus en condition homéostatique ou lors de la réponse inflammatoire où ils sont rapidement mobilisés de façon dépendante du CCR2. Il a longtemps été considéré que dans ces deux conditions, les monocytes se différenciaient ensuite en macrophages ou en cellules dendritiques. Cependant, certaines études récentes ont montré que les monocytes pouvaient extravaser dans les tissus en condition homéostatique sans qu'il n'y ait de différenciation en macrophages ou en DC. Ces résultats suggèrent que les monocytes peuvent persister dans les tissus en tant que monocytes Ly6C^{high} CMHII⁺ et même participer au transport d'antigène jusqu'au ganglion lymphatique (Jakubzick et al., 2013).

Les monocytes dits résidents ou non-classiques sont des cellules de 10 à 14µm de diamètre caractérisées comme Ly6C^{low} CCR2⁻ CX3CR1^{high}. Ils ont une plus longue durée de vie que les monocytes inflammatoires (environ 48h) et sont connus pour résider et patrouiller dans les

vaisseaux en se déplaçant le long de l'endothélium vasculaire. Ils se lient à l'endothélium grâce au CX3CR1 et de façon dépendante de LFA-1 ce qui les a défini comme monocytes patrouilleurs (Auffray et al., 2007). Ils maintiennent ainsi un état de surveillance de l'organisme. Ils contribuent à l'homéostasie du système vasculaire en participant au renouvellement de la couche endothéliale et en nettoyant les vaisseaux (cellules mortes, lipides, débris...) (Carlin et al., 2013). Les monocytes Ly6C^{low} ont été décrits comme n'étant pas recrutés au stade précoce vers les sites inflammatoires (Geissmann et al., 2003) mais sont capables d'extravaser plus tard en réponse à une lésion tissulaire pour faciliter la guérison et la revascularisation du tissu (Nahrendorf et al., 2007). Les récentes découvertes sur l'origine et la fonction de cette population tendent à proposer qu'elle soit considérée comme les macrophages du sang. Il est maintenant largement proposé que les monocytes Ly6C^{low} sont issus exclusivement de la différenciation des monocytes (Yona et al., 2013) ; (Sunderkotter et al., 2004) et non pas d'une lignée monocyttaire indépendante (Geissmann et al., 2003).

S'ils ne sont pas recrutés dans les tissus, les monocytes inflammatoires peuvent retourner dans la moelle osseuse ou la rate pour se différencier en monocytes Ly6C^{low} (Yona et al., 2013). Cette différenciation se ferait en grande partie dans les niches vasculaires spécifiques où est exprimé le ligand Notch Delta-like 1 (DLL1) par les cellules endothéliales nécessaires à l'activation des récepteurs Notch 1 et 2 exprimés par les monocytes (Gamrekelashvili et al., 2016). La différenciation monocyttaire est dépendante du facteur de transcription Nr4a1 et son expression à haut niveau par les monocytes Ly6C^{low} en fait un marqueur spécifique de cette population au sein des lignées myéloïdes (Thomas et al., 2016).

Chez la souris, les monocytes intermédiaires ne sont pas beaucoup caractérisés et très peu d'études ont cherché à les décrire. Ils sont simplement considérés comme un état transitoire

dans la différenciation des monocytes inflammatoires en monocytes Ly6C^{low} (Sunderkotter et al., 2004).

Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont principalement connues pour leur fonction de présentatrices de l'antigène (APC). Les mécanismes d'apprêtement de l'antigène développés par les DC promeuvent considérablement la stimulation lymphocytaire par rapport à d'autres cellules comme les macrophages. De plus, elles regroupent tous les marqueurs utiles pour induire les signaux de co-stimulation nécessaires à l'activation des lymphocytes T. Ce sont des cellules migratoires qui après avoir capté un antigène, sont capables d'aller le présenter dans un tissu lymphoïde secondaire au niveau des zones des lymphocytes T et B notamment grâce à l'expression du récepteur de chimiokine CCR7.

Il existe de nombreuses sous-populations de cellules dendritiques avec des caractéristiques très différentes que ce soit au niveau phénotypique ou fonctionnel, qui a conduit à des classifications variées par de nombreuses équipes et pouvant parfois être contradictoires. Récemment, une nouvelle nomenclature sur la base du système des phagocytes mononucléés a été proposée (Guilliams et al., 2014). Il s'agit d'une classification en deux étapes. La première se rapporte à l'ontogénie des cellules, puis la seconde se base sur leurs fonctions, leur localisation et/ou leur phénotype. Les DC sont issus de précurseurs différents de ceux des macrophages et des monocytes. Il est ensuite possible de distinguer des sous-populations de DC. Les DC classiques ou conventionnels (cDC) peuvent être de deux types. Les cDC de type 1 (cDC1) sont CD8a⁺ et CD103⁺ alors que les cDC de type 2 (cDC2) sont CD11b⁺ et CD172a⁺. Il existe aussi les DC plasmacytoïdes (pDC) qui sont connus et largement décrits pour leur capacité à produire du TNF (Geissmann et al., 2010).

Les macrophages

Le terme de macrophages est apparu à la fin du 19^{ème} siècle par Elie Metchnikoff pour caractériser des cellules mobiles capables de phagocyter de grosses particules telles que les bactéries. Les macrophages sont de grosses cellules de plus de 50µm de diamètre, composés d'organites cellulaires comme les lysosomes et les vacuoles de phagocytoses plus développés que ceux des monocytes. Les macrophages sont une population très hétérogène et très plastique répondant efficacement aux modifications de leur environnement. Il apparaît maintenant que dans la majorité des tissus, les macrophages résidents en condition basale sont ceux issus de précurseurs embryonnaires. En condition inflammatoire s'ajoutent des macrophages issus de l'infiltration et de la différenciation des monocytes. Ces différences d'origine donnent un nouveau paramètre de complexité à l'étude des macrophages.

Polarisation des macrophages

Les macrophages présents dans les différents tissus en condition homéostatique sont connus sous des noms différents et possèdent des fonctions et des phénotypes spécifiques (Lavin and Merad, 2013). Par exemple, les macrophages alvéolaires maintiennent les fonctions pulmonaires en nettoyant les surfactants présents dans les alvéoles (Nakamura et al., 2013). Les macrophages de la pulpe rouge de la rate contribuent à l'homéostasie du fer en recyclant les érythrocytes (Kohyama et al., 2009). Les microglies participent aux fonctions cérébrales par l'élagage des synapses et le maintien des synapses efficaces (**Figure 2**) (Paolicelli et al., 2011).

La survie des macrophages dans les tissus dépend majoritairement du facteur stimulant la formation de colonies de macrophages (M-CSF) et du facteur stimulant la formation de colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF). Ce sont des facteurs de croissance connus pour réguler les populations myéloïdes matures dans les tissus. Ils sont impliqués dans

la survie, l'activation, la différenciation et la mobilisation de ces cellules. Le M-CSF est produit en condition homéostatique de façon constitutive alors que le GM-CSF est principalement produit par des leucocytes activés en réponse à une infection.

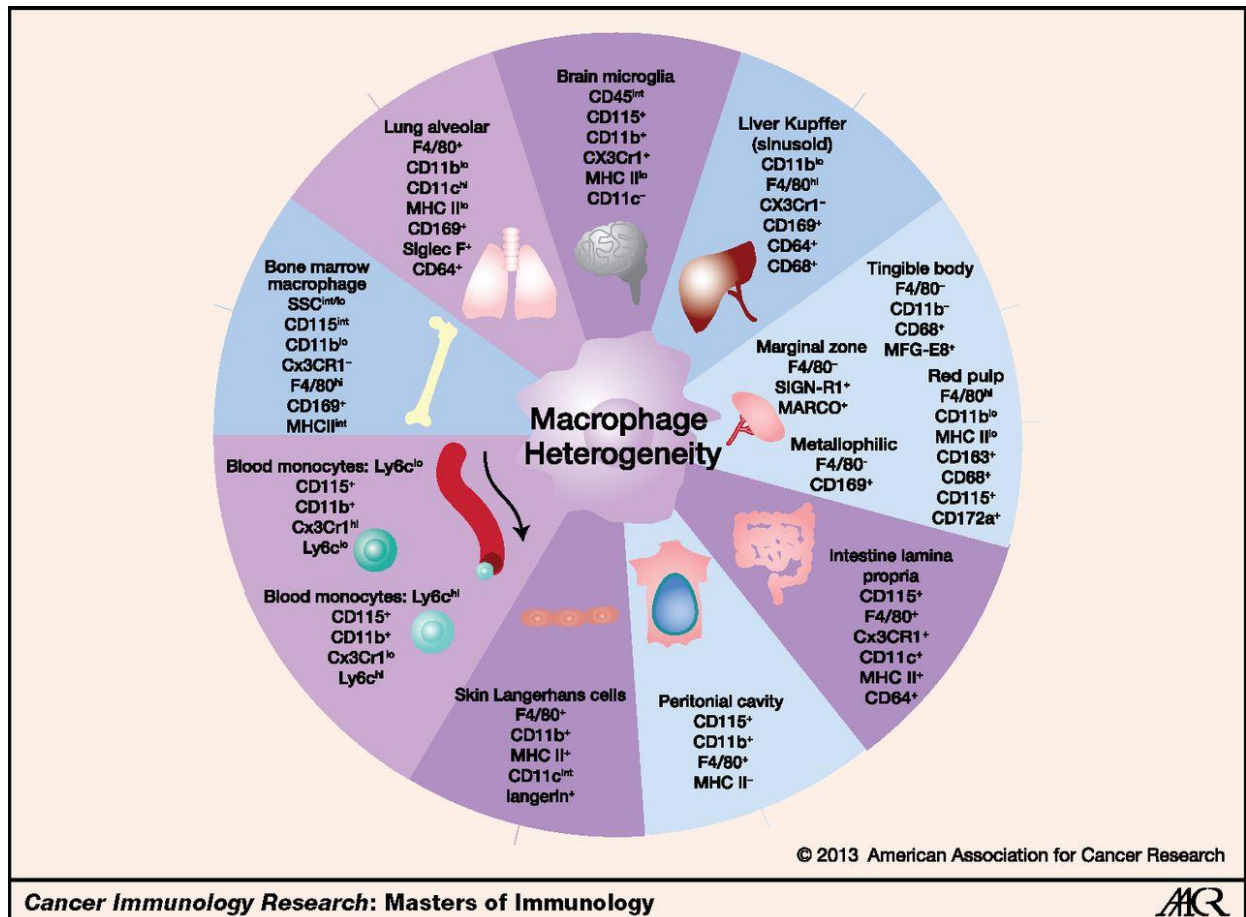


Figure 2 : Hétérogénéité des macrophages tissulaires.

En fonction des organes où ils résident, les macrophages expriment différents marqueurs et exercent des fonctions spécifiques. Cette figure rassemble les principaux marqueurs membranaires et leur niveau d'expression associés aux populations de macrophages tissulaires et aux monocytes. Le F4/80 est un très bon marqueur des macrophages du péritoine, du foie et de la peau alors que le CD169 est plutôt associé aux macrophages de la moelle osseuse et de la rate. Le CD64 est exprimé par les macrophages du poumon et de l'intestin. Le CX3CR1 est très utile pour identifier les microglies et différencier les sous-populations monocytaires. (Lavin and Merad, 2013)

La classification des macrophages qui a été la plus utilisée sépare ces cellules très hétérogènes en deux voies de polarisation distinctes. Cette classification est maintenant de plus en plus écartée mais il est tout de même important d'en présenter les caractéristiques afin de comprendre les biais entraînés par cette nomenclature. Elle est basée sur le modèle de polarisation des lymphocytes entre Th1 et Th2 comme l'ont montré les travaux de Stein *et al.*

(Stein et al., 1992). Le premier groupe concerne les macrophages de type M1 qui participent aux réponses de type Th1 contre les pathogènes et ont des propriétés anti-tumorales. Ils peuvent être activés par l'IFN- γ ou par la liaison d'un ligand à son TLR, ce qui augmente l'activité des facteurs de transcriptions $\text{NK}\kappa\text{B}$, STAT1 et IRF5 (Krausgruber et al., 2011), conduit à la production de cytokines inflammatoires et à l'amélioration de leur capacité cytotoxique. Plus précisément, ces macrophages sont caractérisés par un niveau élevé de CMHII, la production d'IL-12 et de $\text{TNF}\alpha$, la génération de ROS et de NO (oxyde nitrique) et leur capacité à tuer les pathogènes et les cellules (Martinez and Gordon, 2014).

L'autre voie de polarisation concerne les macrophages de type M2, aussi appelés macrophages alternatifs. Ils participent aux réponses de type Th2, incluant l'immunité humorale, l'angiogenèse, la réparation tissulaire, l'immunorégulation et le développement tumoral (Gordon, 2003). Sur ces observations, trois sous-populations de macrophages de type M2 ont été distinguées car elles possèdent des fonctions différentes et sont activées par différents signaux inducteurs nécessaires à leur différenciation (Mantovani et al., 2004).

Selon cette nomenclature, les macrophages M2a se différencient en réponse à l'IL-4 et l'IL-13 via les facteurs de transcription STAT3 et STAT6 et sont impliqués dans la réparation tissulaire en produisant de la fibronectin-1, du facteur XIII de coagulation et de l'IGF-1 (Insuline-like growth factor). Les macrophages M2b sont activés par des ligands de TLR comme le LPS, par l'IL-1 β et par la reconnaissance du fragment Fc des immunoglobulines. Ils sont producteurs d'IL-10, cytokine connue pour ses propriétés immunorégulatrices ainsi que d'IL-6 et de $\text{TNF}\alpha$ qui vont activer la réponse humorale. Les macrophages M2c sont issus de la stimulation avec de l'IL-10, du $\text{TGF}\beta$ ou des glucocorticoïdes et sont impliqués dans l'immunorégulation et la réparation tissulaire (Mantovani et al., 2004).

La capacité des macrophages à s'adapter à leur environnement est possible grâce à leur plasticité. En effet, grâce à des signaux spécifiques, les macrophages peuvent rapidement changer de phénotype, passant de M1 à M2 ou de M2 à M1 (Porcheray et al., 2005). Par exemple, le lipopolysaccharide (LPS) permet le changement phénotypique de M2 vers M1 (Zheng et al., 2013b) de même que la présentation d'antigène aux lymphocytes Th1 par les macrophages M2 dans un contexte tumoral (Heusinkveld et al., 2011). D'autre part, une inhibition de l'activation du facteur de transcription $\text{NK}\kappa\text{B}$ permet de modifier la polarisation des macrophages M1 vers des macrophages M2 (Wang et al., 2014).

Cependant, il est maintenant admis que cette classification binaire ne permet pas d'envisager dans son ensemble les nombreux rôles que peuvent avoir les macrophages. En effet, les phénotypes M1 et M2 représentent les deux extrêmes d'un continuum d'états fonctionnels des macrophages dépendant de leur environnement et qui semble parfois être oublié pour ne garder que deux états fonctionnels. Certains chercheurs experts dans la biologie des macrophages ont essayé de rétablir une terminologie et une nomenclature moins tranchées et plus globales en tenant compte des propriétés et des mécanismes de la polarisation des macrophages (Murray et al., 2014). D'autres ont utilisé des analyses transcriptomiques pour définir de nombreux états d'activation des macrophages et tenté de les comparer entre les espèces et entre différentes pathologies afin de parvenir à définir de grandes voies d'activation et de réponses macrophagiques (Xue et al., 2014). Les phénotypes M1/M2 semblent devoir être appréhendés de façon plus complexe puisque un macrophage avec un phénotype M1 peut être impliqué dans des fonctions de réparation et des macrophages de phénotype M2 peuvent avoir des fonctions pro-inflammatoires (Novak and Koh, 2013). J'essaierai de définir dans mon travail de thèse le rôle des macrophages en me basant sur leur phénotype ou leurs fonctions plutôt que de les classer strictement entre macrophages M1 ou M2.

Origines des macrophages

Depuis les années 1960, le dogme était que les macrophages tissulaires provenaient des monocytes circulants eux-mêmes issus des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse. Une des techniques utilisées pour cette démonstration était l'irradiation des souris pour provoquer une déplétion massive des cellules immunitaires et observer la reconstitution de ces cellules dans les tissus. Dans ce cas précis, ce sont les monocytes circulants provenant de l'hématopoïèse qui vont infiltrer les tissus pour reconstituer l'ensemble des macrophages (Goodman, 1964). D'autre part, le fait établi que les monocytes infiltraient les tissus en condition inflammatoire, où ils se différencient, était un autre argument pour confirmer l'origine de ces macrophages (van Furth and Cohn, 1968).

Depuis quelques années, plusieurs équipes ont démontré que les macrophages intégraient les tissus pendant le développement embryonnaire, bien avant la mise en place de l'hématopoïèse. Ces macrophages ont la capacité d'auto-renouvellement et persistent à l'âge adulte indépendamment des monocytes circulants (Hashimoto et al., 2013) ; (Yona et al., 2013). Ces études ont permis de soulever de nouvelles questions sur la nature et l'origine des macrophages. L'ensemble des progéniteurs embryonnaires a une grande plasticité. Ils peuvent coloniser un organe et constituer les macrophages tissulaires qui acquièrent alors les fonctions spécifiques associées à chaque tissu (van de Laar et al., 2016). Les progéniteurs érythro-myéloïdes (EMP) apparaissent très tôt dans le sac vitellin (entre 7.5 et 8.5 jours après le début de l'embryogenèse (E)). Ils sont décrits comme étant à l'origine des progéniteurs macrophagiques du sac vitellin et des monocytes du foie fœtal. Ces populations se différencient par l'acquisition de l'expression de c-Myb par les monocytes dans le foie fœtal (Hoeffel et al., 2015). Les macrophages du sac vitellin se développent sans passer par des étapes intermédiaires monocytaires entre E8.5 et E10.5. Les microglies du cerveau proviennent majoritairement de ces progéniteurs présents dans le sac vitellin des souris

(Ginhoux et al., 2010). Les monocytes du foie fœtal apparaissent plus tard entre E10.5 et E13.5 et sont à l'origine de la majorité des autres macrophages tissulaires (peau, foie, rein, ...) (**Figure 3**). En intégrant les tissus, les macrophages vont acquérir graduellement leurs fonctions en commençant à exprimer des récepteurs de cytokines, des récepteurs éboueurs ou de reconnaissance de pathogènes (Mass et al., 2016).

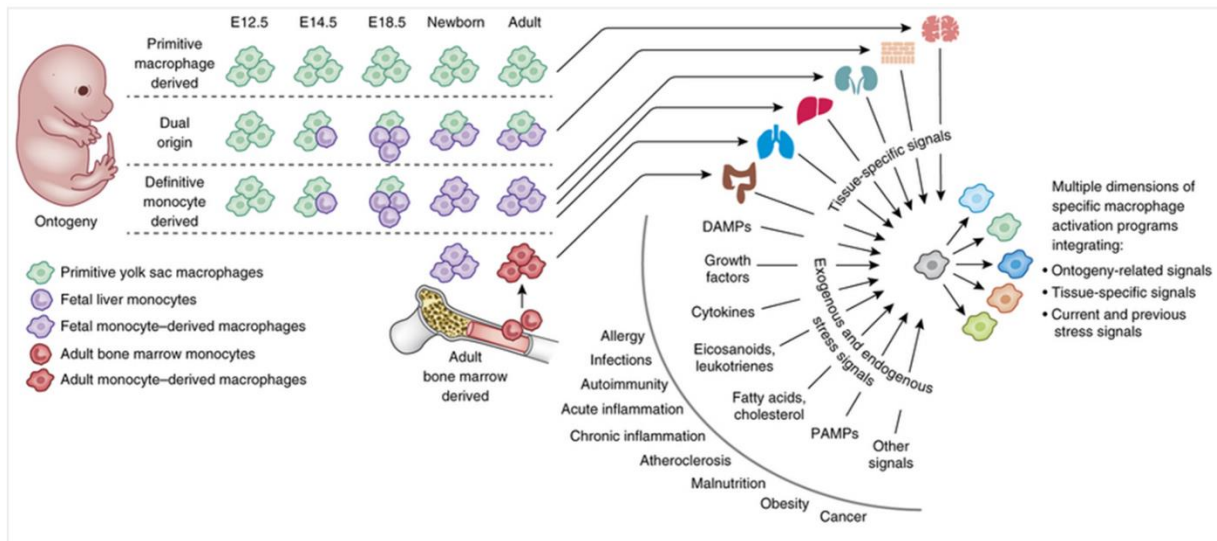


Figure 3 : Ontogénie des macrophages et impact de leur environnement sur leurs fonctions tissulaires.

L'activation et les fonctions des macrophages dépendent de leur ontogénie, du tissu dans lequel ils résident et des signaux de stress auxquels ils sont exposés. De façon intéressante, un même signal de stress exposé dans différents tissus ou à des macrophages d'origine différente peut conduire à des réponses fonctionnelles différentes. (Ginhoux and Guilliams, 2016)

L'origine des macrophages tissulaires entre ceux provenant du développement embryonnaire et ceux dérivés des monocytes issus de l'hématopoïèse adulte, ajoute une nouvelle complexité à l'étude de ces cellules et à la compréhension de leurs différents rôles dans des pathologies inflammatoires. Cette notion a un intérêt tout particulier dans le cas du cancer pour lequel le rôle des macrophages d'origine embryonnaire est totalement inconnu. C'est pourquoi il serait intéressant de rechercher si ces sous-types de macrophages ont des différences de fonctions ou d'interaction avec d'autres populations et s'ils répondent de la même manière à leur environnement.

Fonctions des phagocytes mononucléés

Les MP sont des cellules essentielles pour la défense de l'hôte contre de nombreux pathogènes. Ils sont parmi les premiers à détecter l'intrusion de microbes et à engager des fonctions immunes telles que l'élimination des pathogènes, la capture et la présentation d'antigène ou la rémission des dommages tissulaires que je vais maintenant présenter plus en détails.

La phagocytose

La phagocytose correspond à la capacité à internaliser une grosse particule (supérieure à 1µm de diamètre) que ce soit en condition homéostatique (destruction de cellules apoptotiques) ou en condition inflammatoire (destruction de micro-organismes ou de cellules infectées). Afin de reconnaître les microbes, les cellules myéloïdes expriment différents récepteurs reconnaissant des motifs moléculaires associés aux microbes (MAMP) (Didierlaurent et al., 2005). Ces récepteurs peuvent induire diverses réponses comme la production de cytokines pro-inflammatoires (récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR)) ou la phagocytose. Pour cette dernière, il y a deux catégories principales de récepteurs impliqués. Les récepteurs qui reconnaissent directement les microbes comprennent le récepteur du mannose, la dectine-1 ou les récepteurs éboueurs (MARCO, CD36) capables de reconnaître des microbes et des corps apoptotiques (Peiser and Gordon, 2001). Les macrophages résidents dans les zones T des ganglions lymphatiques sont capables d'efferocytose, c'est-à-dire qu'ils éliminent les cellules apoptotiques par phagocytose (Baratin et al., 2017). La seconde catégorie concerne les récepteurs qui reconnaissent les éléments opsonisés par diverses molécules comme les anticorps ou des composants du complément. Par exemple, le récepteur CR1g (Récepteur du complément de la superfamille des Ig) lie les fragments du complément

C3b et iC3b et permet l'opsonisation de particules et de pathogènes provenant de la circulation sanguine par les cellules de Kupffer (Helmy et al., 2006).

La phagocytose se poursuit par l'internalisation des éléments reconnus dans des vésicules appelées phagosomes. Les phagosomes vont ensuite fusionner avec des lysosomes pour former une vésicule destructrice, le phagolysosome, qui contient des peptides antimicrobiens, des enzymes de digestion et des composés oxygénés et azotés toxiques (Aderem and Underhill, 1999). Certains microbes ont évolué et développé des capacités pour échapper à la phagocytose. Ils se servent des étapes précoces de ce processus pour pénétrer dans la cellule et ont développé des mécanismes pour éviter les étapes suivantes en détruisant le phagosome (*Listeria monocytogenes*) ou en empêchant la fusion avec les lysosomes (*Mycobacterium tuberculosis* et *Salmonella*).

Cytotoxicité des phagocytes mononucléés

Les phagocytes activés peuvent produire la forme inducible de l'oxyde nitrique synthase (iNOS) et la NADPH oxydase. Cette production induite par des pathogènes virulents est dépendante de la voie des TLR-Myd88 et de l'IFN- γ , mais aussi du CCL2 pour les monocytes (Hackel et al., 2013). L'iNOS conduit à la production d'oxyde nitrique (NO) et la NADPH oxydase à la production d'espèce réactive de l'oxygène (ROS), très toxiques, qui vont participer à la destruction des organismes internalisés. Ils participent aussi à la production de nombreuses cytokines et à la survie cellulaire (Bogdan et al., 2000).

Les ROS et le NO sont impliqués dans la pathogenèse des douleurs aiguës et chroniques et sont des médiateurs de l'inflammation. Des souris déficientes en iNOS ou NADPH oxydases sont sensibles à un certain nombre de pathogènes, principalement intracellulaires (Bogdan et al., 2000). Le suivi de la production de ROS et de NO est un bon moyen pour vérifier la

qualité et la durée de la réponse innée à une infection dans des modèles murins. L'importance de leur production est encore sous-estimée chez l'homme mais pourrait être associée à l'efficacité d'une réponse ou à différents stades d'avancé d'une pathologie.

Production de cytokines

Les cytokines pro-inflammatoires

Le TNF, l'IL-1 et l'IL-6 sont les principales cytokines pro-inflammatoires produites par les phagocytes et jouant un rôle important dans l'induction de l'inflammation (Arango Duque and Descoteaux, 2014). Le TNF α , produit par les monocytes et les macrophages, stimule l'expression de molécules d'adhérence et la production de chimiokines par les cellules endothéliales et contribue au recrutement des leucocytes sur le site inflammatoire (Griffin et al., 2012). Il participe aussi à l'induction de la réponse adaptatrice et à la réparation tissulaire en induisant la production de facteurs de croissance. L'IL-1, sécrété après la reconnaissance de PAMP, participe avec le TNF α à l'adhérence des cellules à l'endothélium vasculaire. Il est aussi impliqué dans la prolifération et la différenciation des lymphocytes T CD4 (Ben-Sasson et al., 2009). C'est une cytokine importante dans l'induction de la fièvre car elle est capable d'activer les centres hypothalamiques qui contrôlent la température corporelle ce qui améliore l'efficacité de l'immunité adaptatrice. L'IL-6 favorise le recrutement des monocytes circulants et l'activation des cellules phagocytaires (Hurst et al., 2001).

L'activation par les TLR initie principalement la voie Myd88 puis NF κ B ce qui conduit à la production de cytokines inflammatoires (Parihar et al., 2010). Par exemple, les interférons sont connus pour induire la production de molécules antivirales et l'IL-12 et l'IL-18 sont des cytokines activatrices des NK (Haeberlein et al., 2010).

Les cytokines anti-inflammatoires

Les cytokines anti-inflammatoires sont très importantes dans l'immunorégulation de la réponse inflammatoire et dans le maintien de l'homéostasie. La reconnaissance et la phagocytose de cellules apoptotiques par les macrophages induit la production d'IL-10, de TGFβ et de prostaglandine 2 (PGE₂) permettant de maintenir un état homéostatique et de supprimer les risques d'auto-immunité (Makita et al., 2015).

L'intestin est un organe particulier pour l'induction de la tolérance envers les bactéries commensales. Une étude a montré que dans un modèle d'infection de souris par *Citrobacter rodentium*, la production d'IL-10 par les macrophages intestinaux induit une régulation autocrine qui permet de prévenir l'induction de réponse inflammatoire antibactérienne en limitant leur production d'IL-23 (Krause et al., 2015). Les macrophages interstitiels du poumon permettent la prévention de l'inflammation des voies aériennes en condition d'allergie en diminuant fortement les réponses Th2 par la libération d'IL-10 et de TGFβ (Bedoret et al., 2009).

La présentation antigénique

Si les DC sont connues comme étant les meilleures APC, les macrophages sont eux aussi capables d'activer l'immunité adaptatrice grâce à la présentation antigénique. En effet, après phagocytose, les macrophages peuvent ne détruire que partiellement les particules étrangères qui ont été captées afin de les présenter à leur surface. La présentation antigénique par les monocytes et les macrophages est très régulée et peut être modulée en contrôlant la synthèse et l'expression des molécules du CMHII. Par exemple, l'IL-10 est capable d'inhiber la production de CMHII et le mécanisme de présentation de l'antigène sur le CMHII (Mittal and Roche, 2015).

Les macrophages CD169⁺ présents dans les organes lymphoïdes secondaires sont capables d'activer les lymphocytes T CD8 des ganglions lymphatiques en leur présentant des antigènes associés à la mort cellulaire (Asano et al., 2011) et de transférer des antigènes aux cellules dendritiques CD8 α présentes dans la rate pour permettre la présentation croisée d'antigènes (Backer et al., 2010). Ces macrophages sont situés à des emplacements stratégiques pour acquérir l'antigène et optimiser la présentation aux lymphocytes (Martinez-Pomares and Gordon, 2012).

Depuis le début des années 1990, les monocytes sont eux aussi considérés comme des APC (Rigby et al., 1990) ; (Szabo et al., 1990). Dans le cas d'une infection par le virus de la grippe, les monocytes inflammatoires portant des antigènes viraux induisent une réponse immunitaire de type Th1 et la prolifération des lymphocytes CD4 spécifiques de l'antigène (Kim and Braciale, 2009). De même, dans le cas de certaines infections bactériennes comme *Leishmania major* ou *Salmonella enterica*, les monocytes induisent une réponse Th1 dépendante du TNF (Flores-Langarica et al., 2011) ; (Leon et al., 2007). Dans d'autres modèles comme l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), les infections par *L. monocytogenes* ou par *Plasmodium berghei*, les monocytes peuvent induire des lymphocytes Th17 (Yi et al., 2012). Les monocytes stimulés par du GM-CSF produisent plus de cytokines induisant la différenciation des lymphocytes en Th17 (IL-6, IL-1 β) que ne le font les cDC (Ko et al., 2014).

Des études se sont intéressées au recrutement direct des monocytes depuis le tissu inflammatoire jusqu'aux ganglions lymphatiques par les vaisseaux lymphatiques afférents grâce à l'expression de CCR7 et du CMHII (Tamoutounour et al., 2013). Les monocytes qui expriment le CD62L peuvent aussi entrer dans les ganglions par le sang via les veinules à endothélium épais (Leon and Ardavin, 2008). Les monocytes ont un rôle antimicrobien direct

sur le site et sont capables, en particulier pendant des infections de la peau ou des poumons, de prendre en charge des antigènes microbiens ou des bactéries vivantes afin de les transporter aux ganglions lymphatiques drainants (Samstein et al., 2013). Ils peuvent alors transférer l'antigène à des DC classiques ou se différencier en DC dérivés de monocytes (Randolph et al., 1999). Ces deux catégories de DC sont capables d'activer correctement les LT CD4 et CD8, ce qui suggère que les monocytes participent à la mise en place d'une réponse effectrice spécifique des LT (Cheong et al., 2010).

En conclusion, les phagocytes mononucléés sont des cellules qui interviennent très tôt dans la réponse inflammatoire ce qui en fait des éléments essentiels pour la mise en place d'une réponse immune de qualité. De nombreuses études tendent maintenant à montrer que le rôle des monocytes ne se limite pas à infiltrer les tissus pour se différencier, mais qu'ils ont bien une fonction en tant que tel et qui ne dépend pas de leur maturation en macrophages ou en cellules dendritiques (Jakubzick et al., 2013). D'autre part, l'avancé des recherches sur l'ontogénie des macrophages ouvre des perspectives intéressantes pour associer des fonctions macrophagiques et les réponses induites par l'environnement avec cette origine.

Le réseau chimiokinique dans la migration des phagocytes mononucléés

Comme nous l'avons vu, les phagocytes mononucléés s'organisent en un système extrêmement dynamique du point de vue spatio-temporel. Leur efficacité fonctionnelle repose sur les capacités migratoires des différents protagonistes entre les tissus lymphoïdes et non-lymphoïdes via la circulation lymphatique et sanguine et à travers le parenchyme tissulaire. Le réseau des chimiokines et de leurs récepteurs fait parti des éléments clés régulant ce trafic cellulaire à travers l'organisme. Les récepteurs de chimiokines représentent la plus grande famille de récepteurs à 7 domaines transmembranaires exprimés par les cellules immunitaires.

Ils lient les chimiokines qui sont de petites cytokines chimio-attractantes qui favorisent la migration cellulaire par chimiotactisme. La première chimiokine découverte a été l'interleukine 8 (IL-8) en 1987, qui, après production par les monocytes, exerçait une activité chimio-attractante sur les neutrophiles (Yoshimura et al., 1987).

Principe de la migration des leucocytes

Les différents types de migration

La migration des cellules en général peut dépendre de différents types de signaux. Ils sont soit issus d'une migration physique (durotaxie, mécanotaxie) qui dépendent de l'environnement direct ou d'une migration chimique (chimiotaxie) qui permet la mobilisation de cellules entre des tissus plus ou moins éloignés dans l'organisme.

La durotaxie est un type de migration cellulaire où les cellules suivent un gradient de rigidité qui provient de structures spécifiques de la matrice extracellulaire (ECM). La plupart des cellules ne peuvent pas survivre dans un milieu fluide et doivent donc s'ancrer à leur environnement. L'environnement mécanique peut être très différent en fonction des types cellulaires comme la peau, les muscles ou le cerveau et il joue un rôle très important dans l'adhésion ou la migration. La plupart des cellules migrent vers la partie la plus rigide comme peuvent le faire les cellules musculaires lisses vasculaires (Isenberg et al., 2009). Ce type de migration dépend de structures telles que le collagène ou l'élastine.

Le chimiotactisme des leucocytes a été décrit pour la première fois en 1888 par Leber dans un modèle d'irritation de la cornée chez le lapin (Leber, 1892). C'est le résultat d'une migration dirigée, souvent par un gradient de chimiokines solubles, permettant le recrutement de cellules sur un lieu spécifique. Il agit lors du recrutement des cellules depuis la lumière vasculaire puis lors de la migration interstitielle. Les chimiokines solubles permettent la

migration des leucocytes circulants dans tout l'organisme. L'IL-8 est le parfait exemple de molécule induisant du chimiotactisme. Il permet le recrutement rapide et dirigé des neutrophiles sur le site inflammatoire selon un gradient de concentration et en se fixant aux récepteurs CXCR1 ou CXCR2 exprimés par les neutrophiles (Mahalingam and Karupiah, 1999).

A la différence du chimiotactisme, la chimiokinèse décrit une migration aléatoire ne suivant pas de gradient de concentration. Les chimiokines vont augmenter la vitesse des cellules sans pour autant suivre un processus directionnel (**Figure 4**). La chimiokinèse et le chimiotactisme peuvent agir de façon synergique. Par exemple, l'IL-5 peut induire la chimiokinèse des éosinophiles alors que le CCL11 est responsable du chimiotactisme de ces mêmes cellules. La combinaison des deux permet un recrutement optimal des éosinophiles dans les tissus (Palframan et al., 1998)

L'haptotaxie est un mouvement cellulaire directionnel en réponse à des molécules adhérentes ou à des chimiokines liées à une surface (**Figure 4**). En 2013, Weber *et al.* ont réussi à mesurer et à imager *in vivo* la migration des DC dans les vaisseaux lymphatiques de la peau grâce au CCL21 immobilisé (Weber et al., 2013). La migration transendothéliale (qui permet la diapédèse des cellules) peut arriver en absence de gradient de chimiokines solubles s'il y a une forte concentration de chimiokines fixées sur la surface luminale des vaisseaux (Wei et al., 2003). *In vivo*, il est difficile d'imaginer que les chimiokines puissent être solubles dans les tissus. En effet, les chimiokines sont connues pour se coller aux protéoglycanes (GAG). Certaines études suggèrent que la liaison des chimiokines aux GAG est essentielle *in vivo* pour exercer leur fonction. Ainsi, le terme d'haptotactisme devrait être préférentiellement utilisé à celui de chimiotactisme (Prescott and Proudfoot, 2002).

La nérotaxie est proposée depuis les années 1930 et concerne des chimioattractants issus de cellules nécrotiques ou apoptotiques (**Figure 4**). Cette migration des leucocytes précède souvent la phagocytose des corps ou cellules détectées. Les molécules issues de cette mort cellulaire, qui sont encore peu connues, peuvent attirer les cellules, ce qui en fait un type de mobilisation important à considérer dans certaines physiopathologies (Debru, 1993).

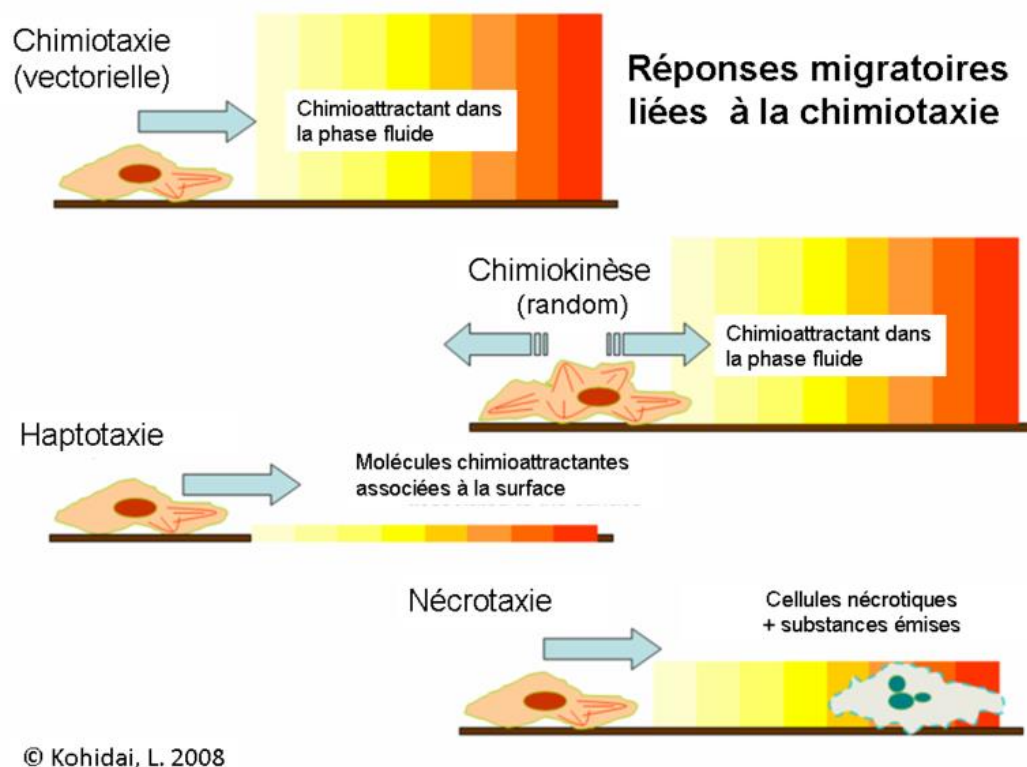


Figure 4 : Réponses migratoires liées à la chimiotaxie.

Cette figure regroupe les différents types de mobilisation qui peuvent être associés aux cellules immunitaires, que ce soit dans le sang ou dans un tissu. Le chimiotactisme représente une migration dirigée dans le sens d'un gradient de concentration croissant d'un chimioattractant soluble. La chimiokinèse correspond à une augmentation de la mobilité cellulaire sans directionnalité apparente. L'haptotaxie représente la migration interstitielle typique selon un gradient de concentration d'un chimioattractant lié à différentes molécules de la matrice extracellulaire. Enfin, la nérotaxie est dépendante de facteurs libérés pendant la nécrose cellulaire.

(Kohidai L. 2008)

Mobilisation des leucocytes et recrutement dans les tissus

Les leucocytes trafiquent principalement par le sang pour rejoindre les différents tissus.

L'intravasation est le mécanisme par lequel les cellules passent d'un tissu vers le sang ou la lymphe. Cela s'applique par exemple à la sortie des leucocytes des organes lymphoïdes

primaires après maturation. Les monocytes produits dans la moelle osseuse sont libérés dans la circulation sanguine grâce à l'expression du récepteur CCR2. En effet, les souris déficientes en CCR2 ont très peu de monocytes dans le sang dû à un défaut de sortie des monocytes de la moelle osseuse (Serbina and Pamer, 2006). Les DC entrent dans les vaisseaux lymphatiques par intravasation. La chimiokine CCL21 est particulièrement importante lors de ce processus (Vaatmeri et al., 2017). Elle permet d'initier l'interaction entre la DC et les cellules endothéliales lymphatiques, ce qui facilite la migration des cellules vers la lymphe.

Le recrutement tissulaire implique la migration cellulaire depuis la circulation vers le parenchyme tissulaire. Ce processus est appelé extravasation cellulaire et se déroule en plusieurs étapes.

Tout d'abord, les leucocytes circulant rapidement dans la lumière des vaisseaux sont ralentis par les E- et P-sélectines produites par les cellules endothéliales. Ces interactions transitoires conduisent la cellule à un roulement le long des parois vasculaires de plus en plus lent (**Figure 5**). Les premiers contacts avec l'endothélium ralentissent les leucocytes de 50 à 100 fois par rapport aux cellules circulantes pour atteindre une vitesse de 10-20mm/s puis le nombre et la force des interactions avec les sélectines augmentent et les cellules commencent à ramper lentement à une vitesse d'environ 5mm/s.

Les chimiokines produites dans le tissu peuvent être présentées par des protéoglycanes au niveau de la lumière vasculaire et participent à l'arrêt spécifique des cellules exprimant les récepteurs appropriés. La liaison entre récepteurs et chimiokines induit la production d'intégrines telles que CD11a ou ICAM-1 qui vont finaliser l'arrêt des leucocytes. De nombreuses chimiokines peuvent stimuler les leucocytes qui expriment le récepteur approprié et ainsi déclencher l'adhésion (Johnston and Butcher, 2002). Par exemple, le CCL2 va déclencher l'adhésion des monocytes via le CCR2 (Gerszten et al., 1999), l'IL-8 induit

l'adhésion de neutrophiles qui expriment CXCR1 et CXCR2 (DiVietro et al., 2001), les lymphocytes naïfs peuvent adhérer par la liaison du CCR7 à ses ligands CCL19 et CCL21 (Pachynski et al., 1998) alors que des lymphocytes mémoires vont adhérer en réponse aux ligands des récepteurs CXCR3 (CXCL10, CXCL9) , CCR4 (CCL17, CCL22) (Campbell et al., 1999), CCR6 (CCL20) (Campbell 1998 Science) ou CCR1 et CCR5 (CCL5) (Weber et al., 2001).

Ensuite, la cellule se met à ramper le long des parois lumineales toujours grâce aux fortes interactions avec les intégrines (Auffray et al., 2007). La dernière étape consiste à traverser la paroi endothéliale pour pénétrer le tissu : c'est la migration transendothéliale. Les chimiokines participent au déclenchement de cette transmigration en régulant l'affinité et l'activation des intégrines et ainsi l'adhérence des leucocytes (McGettrick et al., 2006) ; (Vaahomeri et al., 2017). La transmigration se fait via deux mécanismes différents. La transmigration paracellulaire est le processus par lequel la cellule va déstructurer provisoirement une jonction intercellulaire et se déformer afin de pouvoir traverser et atteindre le parenchyme tissulaire. Durant ce processus, différentes molécules interviennent telles que PECAM1, LFA1, ICAM1 ou CD99. Dans certains cas, la cellule peut s'engager dans la voie de transmigration transcellulaire et passer directement à travers une cellule endothéliale (**Figure 5**) (Carman, 2009).

Une fois que les cellules ont traversé l'endothélium, elles peuvent poursuivre leur migration dans le tissu en suivant un gradient de chimiokine interstitiel. Cette migration intratissulaire est souvent dirigée vers les cellules immunitaires déjà présentes qui produisent les chimiokines nécessaires. La diffusion de ces chimiokines peut toutefois être limitée par leur fixation à la matrice extracellulaire via les protéines GAG, ce qui augmente la concentration en chimiokines au niveau du site de production. Par exemple, les interactions entre les

chimiokines CXCL8 ou CXCL2 et les GAG sont importantes pour la migration des neutrophiles dans le tissu pulmonaire (Tanino et al., 2010).

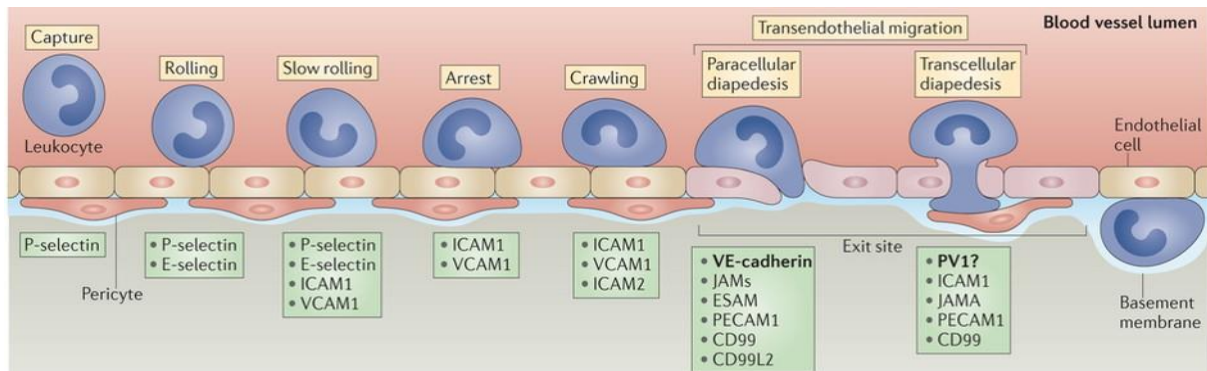


Figure 5 : Processus d'extravasation cellulaire.

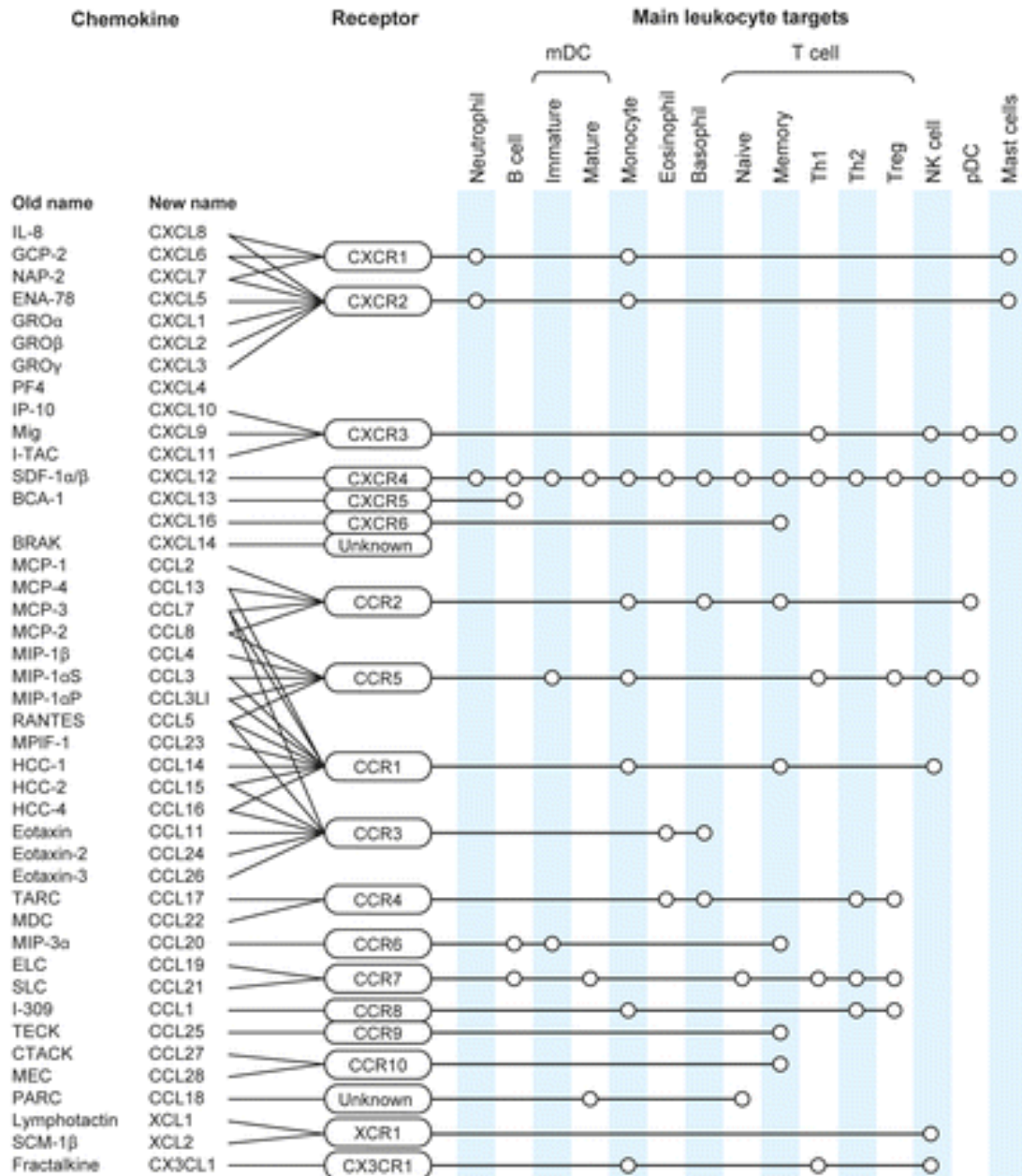
Que ce soit en conditions physiologique ou inflammatoire, les cellules immunes sont continuellement recrutées dans les tissus. Elles trafiquent par le sang et la lymphe et utilisent le processus d'extravasation pour infiltrer le tissu. Brièvement, les leucocytes commencent par rouler le long de la paroi endothéliale en interagissant grâce à des intégrines, puis ils s'arrêtent et entament le processus de diapédèse qui se traduit par une migration transendothéliale paracellulaire (au niveau des jonctions cellulaires) ou transcellulaire (à travers la cellule endothéliale). (Vestweber, 2015)

Les chimiokines et leurs récepteurs

Plus de 50 chimiokines et 20 récepteurs distincts ont été identifiés chez l'homme pour leur capacité à faire migrer des cellules dérivées de la moelle osseuse (Charo and Ransohoff, 2006) ; (Viola and Luster, 2008). La complexité du réseau et sa diversité m'ont conduit à présenter globalement son organisation, alors que j'ai approfondi l'étude des couples impliqués dans la migration des monocytes et des macrophages : CCL2/CCR2 et CX3CL1/CX3CL1.

Conformation des chimiokines

Ces protéines font entre 8 et 14KDa (70 à 127 acides aminés) et sont produites par de nombreuses cellules telles que les cellules immunitaires, endothéliales et épithéliales. Les chimiokines ont été classées en fonction de leur structure grâce à l'emplacement des cystéines conservées au niveau de leur région N-terminale et du nombre d'acides aminés qui les sépare (**Figure 6**) (Zlotnik and Yoshie, 2000).



Viola A, Luster AD. 2008. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 48:171-97

Figure 6 : Les chimiokines et leurs récepteurs.

Cette figure présente la nouvelle et ancienne nomenclature des chimiokines et leurs récepteurs associés. Elle indique aussi l'association des cellules immunitaires avec les différents couples chimiokiniques. Il est ainsi possible d'avoir un aperçu global de la redondance du réseau avec les chimiokines qui se lie à plusieurs récepteurs et les récepteurs qui lient plusieurs chimiokines.

(Viola and Luster, 2008)

Quatre familles de chimiokines ont ainsi été caractérisées : CCL, CXCL, CX3CL et les XCL, seule famille à ne pas comporter de signature peptidique spécifique (Gangur et al., 2002; Murphy et al., 2000). Les autres ont quatre cystéines conservées dont deux pouvant être adjacentes ou séparées par un ou trois acides aminés. Ces cystéines sont engagées dans deux

ponts disulfures, un entre le premier et le troisième résidu cystéine et l'autre entre le deuxième et le quatrième résidu cystéine (**Figure 7**). Cette conformation permet la formation de la structure tridimensionnelle.

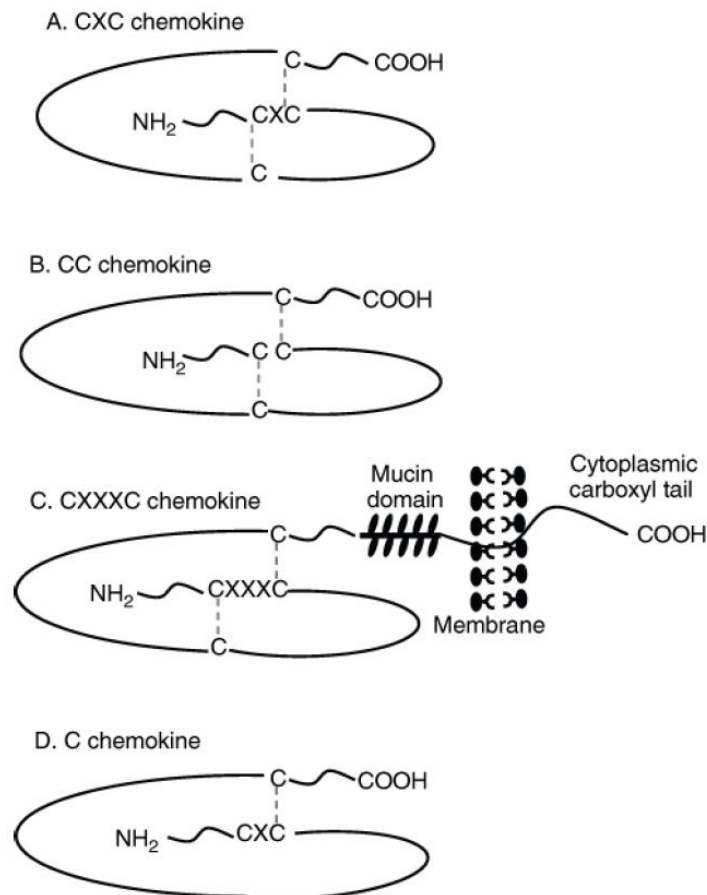


Figure 7 : Les quatre familles de chimiokines classées selon leur structure.

Cette figure permet de visualiser les différences structurelles entre chaque famille de chimiokines par la variation du nombre d'acides aminés présents entre les deux cystéines formant des ponts disulfures. (Deng and Standiford, 2011)

La famille des CXC-chimiokines comporte actuellement 17 membres chez l'homme, incluant l'IL-8. Ce groupe est subdivisé en deux catégories en fonction de la présence ou non d'un motif ELR (Glutamate-Leucine-Arginine) en amont du premier résidu cystéine. Les ELR⁺ CXC-chimiokines, principalement actives dans le recrutement des neutrophiles sur le site inflammatoire, sont aussi impliquées dans l'angiogenèse et la réparation tissulaire (Strieter et

al., 2004). Les ELR⁺ CXC-chimiokines agissent plutôt sur les lymphocytes et sont décrites comme angiostatiques (Rossi and Zlotnik, 2000).

Les CC-chimiokines, l'autre famille importante de chimiokines, comportent 27 membres chez l'homme. Elles sont majoritairement impliquées dans la mobilisation des monocytes en réponse à un stimulus inflammatoire.

Les chimiokines de type XC ne comportent que deux membres, XCL1 et XCL2. Elles n'ont que deux cystéines et donc un seul pont disulfure et sont impliqués dans la mobilisation des lymphocytes T (Kelner et al., 1994).

Il n'existe qu'une seule chimiokine dans la famille des CXXXC-chimiokines : le CX3CR1. Ce récepteur fera l'objet d'une présentation plus détaillée dans la suite de ce chapitre.

Les récepteurs de chimiokines

Les récepteurs de chimiokines sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires et peuvent être catégorisés en 2 groupes principaux qui sont très proches phylogénétiquement. Il y a un large sous-groupe (18 chez l'humain) de récepteurs couplés à des protéines G et un sous-groupe plus petit (4 chez l'humain) de récepteurs dont le signal ne passe pas par les protéines G et qui ont une faible activité chimiotactique. Ces derniers se nomment récepteurs de chimiokines atypiques (ACKR), ils ont des propriétés différentes et agissent plus comme des récepteurs « scavenger » (Bachelier et al., 2014).

Les récepteurs de chimiokines couplés à des protéines G ont ensuite été classifiés en fonction des familles de chimiokines auxquels ils se lient : CXCR, CCR, CX3CR, XCR. Ils font entre 340 et 370 acides aminés et sont composés d'un domaine N-terminal, de trois boucles extracellulaires, trois boucles intracellulaires et un domaine C-terminal. Les quatre domaines extracellulaires participent à la reconnaissance et à la liaison aux ligands alors que les domaines intracellulaires sont impliqués dans la transduction du signal (**Figure 8**). Le motif

DRY (Asp-Arg-Try) permet l'ancrage du récepteur à la membrane et la signalisation par les protéines G.

La liaison d'une chimiokine sur son récepteur induit l'activation de plusieurs voies conduisant à des fonctions biologiques diverses.

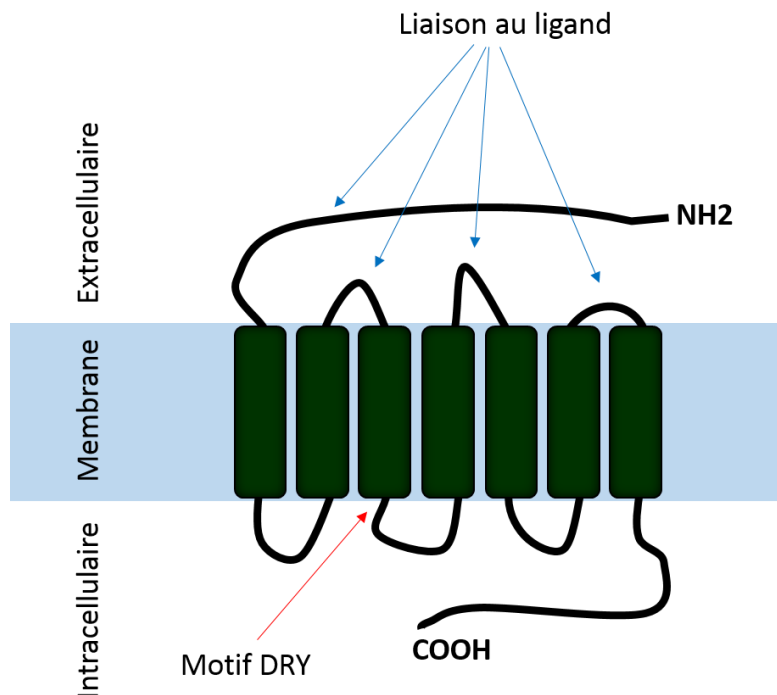


Figure 8 : Structure schématique des récepteurs de chimiokines.

Cette représentation schématique permet de visualiser l'organisation des récepteurs de chimiokines à 7 domaines transmembranaires.

La diversité des chimiokines et de leurs récepteurs en fait un réseau complexe capable d'interagir de façon multilatérale. Au sein d'une même sous-famille, une chimiokine peut se fixer à plusieurs récepteurs et un récepteur peut lier plusieurs chimiokines différentes. Cette propriété a été nommée la redondance des chimiokines. En effet, l'affinité des récepteurs à différents ligands peut être variable et elle dépend aussi du tissu où sont produites les chimiokines (Rajagopalan and Rajarathnam, 2006) ; (Steen et al., 2014). La nature et le niveau d'expression ajustés à la localisation permettent une régulation plus fine et spécifique du recrutement leucocytaire. D'autre part, certaines chimiokines peuvent avoir une fonction agoniste sur des récepteurs et antagoniste sur d'autres. Par exemple, le CCL7 est connu pour être un agoniste de CCR2 et CCR1 et un antagoniste du CCR5 (Loetscher and Clark-Lewis,

2001). La complexité de la redondance des chimiokines en fait un réseau robuste où certaines fonctions peuvent être induites par plusieurs molécules simultanément. Par exemple, les cellules endothéliales activées lors d'une inflammation vont produire de nombreuses chimiokines telles que CCL2, CCL3, CCL5, CCL7, CCL8, CX3CL1 dans le but de recruter les monocytes (Mantovani, 1999).

Fonctions associées aux chimiokines

Les chimiokines peuvent être produites constitutivement ou être sécrétées lors d'une activation cellulaire. Les chimiokines constitutives influencent la mobilisation des leucocytes en condition homéostatique, la surveillance immunitaire et permettent l'organisation structurelle de certains organes tels que les ganglions lymphatiques. Elles sont produites au niveau des organes lymphoïdes, de la peau et des muqueuses. Les chimiokines induites en réponse à un stress physiologique sont produites par le tissu et en particulier par les leucocytes qui s'y trouvent. Ces chimiokines vont recruter les cellules immunitaires sur le site inflammatoire.

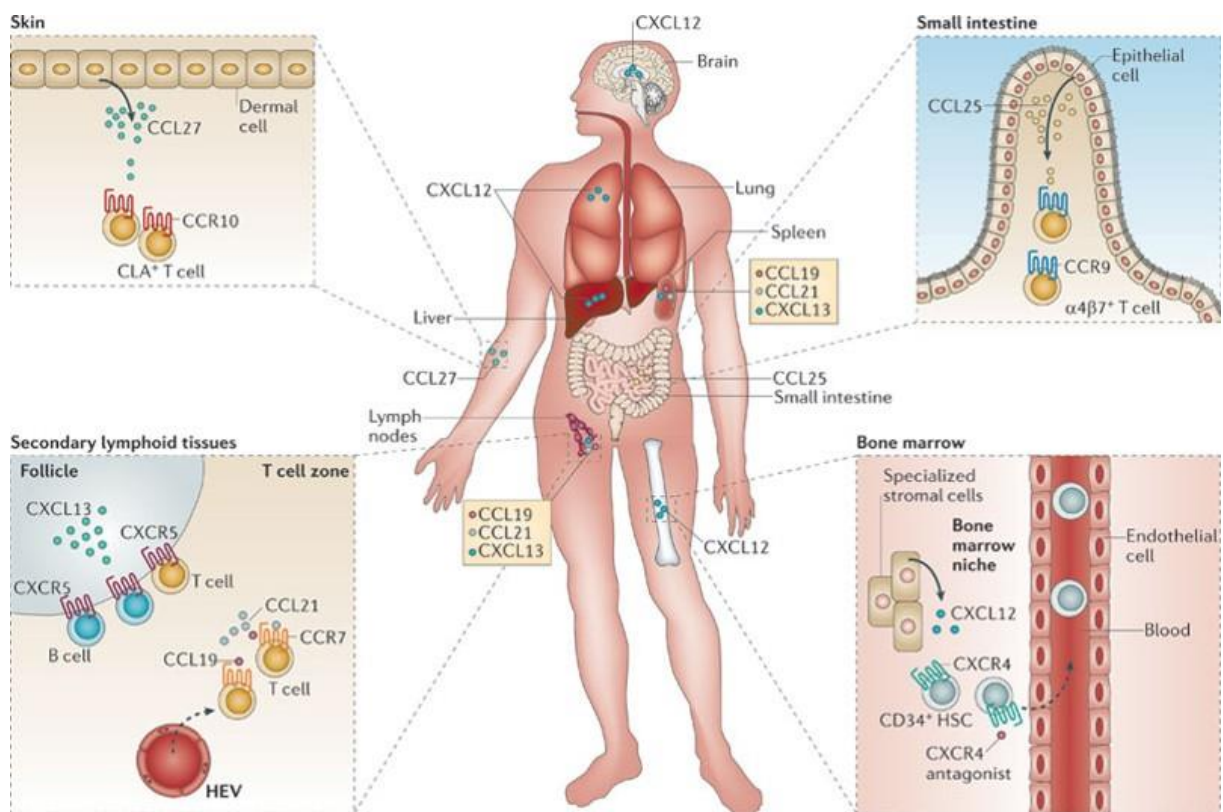
Le chimiotactisme est la fonction la plus reconnue du réseau chimiokinique mais il apparaît maintenant de plus en plus clairement que les chimiokines sont impliquées dans d'autres fonctions cruciales régulées par les leucocytes. Des études démontrent leur participation à la survie, la prolifération, la différenciation et l'acquisition de fonctions effectrices des cellules auxquelles elles se lient. Ces différents rôles impliquent les chimiokines dans de nombreuses activités biologiques comme le développement embryonnaire, l'hématopoïèse, l'immunosurveillance, la tolérance, l'angiogenèse ainsi que dans la tumorigenèse et les pathologies infectieuses.

Les chimiokines dans la surveillance immunitaire

Les chimiokines participent à de nombreuses fonctions homéostatiques (**Figure 9**) telles que l'organogenèse. Elles garantissent la migration des cellules souches dans l'organisme et les

dirigent vers l'organe en développement (Doitsidou et al., 2002). Elles favorisent l'angiogenèse et sont directement impliquées dans la prolifération cellulaire. Des études ont ainsi montré l'importance du couple CXCL12/CXCR4 dans le développement du cœur, de la moelle osseuse et du système nerveux central (Zou et al., 1998); (Miller et al., 2008).

Les chimiokines constitutives sont très importantes dans le développement des organes lymphoïdes secondaires et dans l'homéostasie des monocytes circulants impliqués dans la surveillance immunitaire. Le couple CCR7/CCL21 permet le recrutement des lymphocytes T et l'organisation des structures dans les organes lymphoïdes secondaires (SLO) et le couple CXCR5/CXCL13 est impliqué dans le recrutement des lymphocytes B dans les SLO (Hardtke et al., 2005).



Nature Reviews | Immunology

Figure 9 : Rôle des chimiokines constitutives dans le recrutement des leucocytes en condition homéostatique

Les chimiokines exprimées de façon constitutive permettent la régulation du trafic des cellules immunes qui expriment les récepteurs de chimiokines associés et organisent ainsi la surveillance immunitaire et l'architecture des organes lymphoïdes. Dans la peau, le CCL27 contribue au recrutement de lymphocytes T qui expriment le CCR10. Dans l'intestin, les lymphocytes T qui expriment CCR9 sont recrutés en réponse au CCL25 produits par les cellules épithéliales. Dans les ganglions lymphatiques, le CCL19 et le CCL21 sont connus pour recruter les lymphocytes CCR7⁺ et le CXCL13 participe au recrutement des lymphocytes T et B qui expriment le CXCR5. Certaines cellules stromales présentes dans la moelle osseuse expriment le CXCL12 nécessaire à la création de niche pour les cellules souches hématopoïétiques CXCR4⁺. (Zlotnik et al., 2011)

Les chimiokines dans la prolifération et la survie des leucocytes

Les chimiokines participent activement à la régulation de la prolifération cellulaire, fonction particulièrement importante lors de l'hématopoïèse. Cet effet est mis en évidence par la chimiokine CXCL12 qui est connue pour induire la prolifération des cellules souches hématopoïétiques (HSC). Cette chimiokine est produite par les cellules stromales de la moelle. Les souris déficientes pour CXCL12 ou pour son récepteur CXCR4 ne sont pas viables à cause du déficit majeur de l'hématopoïèse médullaire alors que l'hématopoïèse du foie fœtal est normale (Tachibana et al., 1998). Le couple CXCL12/CXCR4 participe à la rétention des précurseurs hématopoïétiques au niveau des niches médullaires et régule ainsi la prolifération des cellules hématopoïétiques. A l'inverse, CCL3 est capable d'inhiber directement la prolifération des HSC (Graham et al., 1990).

CX3CL1 est connu pour son rôle dans la survie des monocytes car il possède des propriétés anti-apoptotiques (Landsman et al., 2009). Les ligands des récepteurs CXCR4 et CCR3 peuvent inhiber la prolifération des progéniteurs neuronaux en induisant un état de quiescence alors que CX3CL1 est un acteur de la survie de ces cellules (Kratzwohl and Kaiser, 2004). De même, CCR5, en plus de permettre le recrutement des leucocytes dans le cerveau, est un facteur de survie lors d'une infection virale de ce tissu (Glass et al., 2005).

Rôle des chimiokines dans l'angiogenèse

L'angiogenèse est un processus de formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Elle est importante dans le développement embryonnaire ou la cicatrisation mais est aussi impliquée dans la croissance tumorale et la dissémination des métastases. Il existe des interactions directes et indirectes entre les cellules endothéliales responsables de l'angiogenèse et les cellules immunitaires, notamment les macrophages. Les chimiokines participent à ces

interactions et peuvent induire la production de molécules pro-angiogéniques telles que le VEGF.

Les ELR⁺ CXC-chimiokines sont impliquées dans l'angiogenèse principalement via la fixation au récepteur CXCR2 chez l'homme et chez la souris (**Tableau 1**). L'induction de l'angiogenèse par ces chimiokines et CXCR2 a été démontrée dans un modèle de néovascularisation de la cornée. L'utilisation de souris déficientes pour CXCR2 ou d'un anticorps neutralisant de ce récepteur inhibe la vascularisation de la cornée en réponse aux ELR⁺ CXC-chimiokines (Addison et al., 2000). Dans un modèle de réparation tissulaire, les souris déficientes pour CXCR2 ont une cicatrisation retardée due à une diminution de l'angiogenèse (Devalaraja et al., 2000). L'implication de CCL2 dans l'angiogenèse a été démontrée dans des modèles de la membrane chorioallantoïdienne de poulet ou dans l'implantation de cornée (Goede et al., 1999). Le CXCR3 est le récepteur principal des ELR⁻ CXC-chimiokines dont les interactions ont des propriétés angiostatiques (Mehrad et al., 2007). Il existe trois variants de CXCR3 qui ont des propriétés différentes et qui compliquent l'étude de ce récepteur. CXCR3A induit l'activité chimiotactique des cellules mononucléées après liaison à ses ligands et CXCR3-alt diminue l'activité de certaines chimiokines telles que CXCL11, CXCL9 et CXCL10. CXCR3B et ses ligands chimiokiniques sont responsables de l'inhibition de l'angiogenèse, comme cela a été montré pour les cellules endothéliales de micro-vaisseaux chez l'homme. Ainsi, l'expression des ligands de CXCR3 sur le site tumoral serait un moyen d'activer le récepteur et d'inhiber l'angiogenèse tumorale (**Tableau 1**) (Lasagni et al., 2003).

Systematic name	Human ligand	Mouse ligand	Receptor
Angiogenic			
CXCL1	Gro- α	KC	CXCR2
CXCL2	Gro- β	MIP-2	CXCR2
CXCL3	Gro- γ	MIP-2	CXCR2
CXCL5	ENA-78	LIX	CXCR2
CXCL6	GCP-2	-	CXCR2
CXCL7	NAP-2	-	CXCR2
CXCL8	IL-8	-	CXCR2
CCL2	MCP-1	JE	CCR2
Angiostatic			
CXCL4	PF-4	PF-4	CXCR3B, *
CXCL9	Mig	Mig	CXCR3B
CXCL10	IP-10	IP-10	CXCR3B
CXCL11	I-TAC	I-TAC	CXCR3B
CXCL12	SDF-1	SDF-1	CXCR4
CXCL14	BRAK	BRAK	?

*, additional receptors may be involved ; ?, undefined receptor.

Tableau 1 : Les chimiokines et leurs récepteurs impliqués dans l'angiogenèse.
 Les chimiokines sont ici classées en fonction de leurs propriétés angiogénique ou angiostatique.
 (Mehrad et al., 2007)

Les chimiokines sont donc impliquées dans de nombreuses fonctions leucocytaires encore mal considérées qui complexifient l'étude de ces molécules. Cela augmente aussi la difficulté de cibler les chimiokines comme traitements car il faut prendre en considération tout le spectre d'action de la molécule pour savoir quelles fonctions vont être impactées en cas d'inhibition ou d'activation.

Les principaux couples de chimiokines impliqués dans la mobilisation des monocytes

CCR2/CCL2

Le récepteur de chimiokines CCR2 lie la chimiokine CCL2 (MCP-1) avec la plus forte affinité mais lie aussi CCL7 (MCP-3), CCL8 (MCP-2) et CCL13 (MCP-4) (Tsou et al., 2007). Le CCL2 a été la première chimiokine de type CC à avoir été découverte chez l'homme en 1989 par 2 équipes indépendantes. La première à partir de lignées monocytaires (Matsushima et al., 1989) et la seconde à partir de myélome humain (Yoshimura et al., 1989) grâce à la capacité du CCL2 à faire migrer les monocytes. Le gène CCL2 de souris présente 75% d'homologie avec le gène humain ce qui fait des souris des modèles intéressants pour étudier les mécanismes liés à cette chimiokine.

Le CCL2 peut se lier à d'autres récepteurs tels que CCR4 ou ACKR1 et ACKR2. La capacité de CCL2 à se lier à d'autres récepteurs et de CCR2 à lier d'autres chimiokines rend la compréhension de leurs fonctions complexe. Cependant, l'interaction CCL2/CCR2 semble dominante puisque les souris déficientes pour le CCR2 ou le CCL2 ont un phénotype similaire (Zhang et al., 2010). Ces résultats indiquent que la redondance des chimiokines a quelques limites et que certains couples induisent des réponses suffisamment fortes pour que d'autres interactions chimiokiniques ne parviennent pas à les remplacer entièrement.

En condition physiologique, le CCL2 est produit dans la moelle osseuse où il est nécessaire pour la sortie des monocytes inflammatoires matures du parenchyme médullaire vers la circulation sanguine (Serbina and Pamer, 2006). En condition inflammatoire, la sécrétion de CCL2 a lieu en réponse à l'activation des cellules productrices par des cytokines pro-inflammatoires (Rollins and Pober, 1991) ou la stimulation des récepteurs de l'immunité innée par des molécules microbiennes. Beaucoup d'infections induisent la production de CCL2 ce qui conduit à son augmentation dans le sérum et dans les tissus inflammatoires.

L'axe CCR2/CCL2 est primordial dans le recrutement des monocytes Ly6C^{high} au cours d'une infection (Serbina and Pamer, 2006). Les souris déficientes pour le CCR2 présentent une accumulation médullaire de ces monocytes. En revanche, elles ont un défaut de monocytes dans le sang et dans les organes lymphoïdes périphériques (Nahrendorf et al., 2007);(Swirski et al., 2009). Ces souris sont plus sensibles à l'infection par de nombreux pathogènes (Shi and Pamer, 2011) mais sont protégées dans certaines pathologies inflammatoires comme l'athérosclérose (Boring et al., 1998) ou le modèle expérimental de sclérose en plaque (EAE, Experimental Autoimmune Encephalitis) (Fife et al., 2000). Ces résultats semblent montrer une implication non négligeable des monocytes et des macrophages dérivés de monocytes dans ces pathologies.

CX3CR1/CX3CL1

Le CX3CR1 est un récepteur de chimiokine exprimé par les monocytes, les macrophages, les mastocytes, les lymphocytes T et les cellules « Natural Killer ». Son unique ligand, CX3CL1 (ou fractalkine), est exprimé par les cellules endothéliales, les cellules épithéliales, les cellules musculaires lisses, les cellules dendritiques, les neurones et les macrophages. CX3CL1 est une chimiokine particulière qui existe sous forme soluble et sous forme membranaire. Cette dernière lui confère une capacité d'adhérence avec les cellules exprimant le récepteur (Bazan et al., 1997). L'interaction entre CX3CR1 et le CX3CL1 membranaire est suffisamment forte pour conduire à l'arrêt des monocytes soumis un flux (Fong et al., 1998). CX3CL1 est une molécule de 95kDa composée d'un domaine chimiokinique lié à un domaine transmembranaire via une queue riche en mucine (**Figure 10**). Elle peut être clivée de la membrane pour produire une chimiokine de 80kDa qui induit le chimiotactisme des cellules exprimant le CX3CR1. Ce clivage est produit par des métalloprotéinases de façon constitutive par ADAM 10 (Hundhausen et al., 2003) et en réponse à une activation cellulaire par ADAM

17 (Garton et al., 2001). La forme soluble a un rôle chimioattractant pour les monocytes et les NK.

Le CX3CR1 peut être exprimé par les cellules endothéliales de tissus inflammatoires activés par des cytokines inflammatoires telles que $TNF\alpha$, $IFN\gamma$ et IL-1 (Imaizumi et al., 2004).

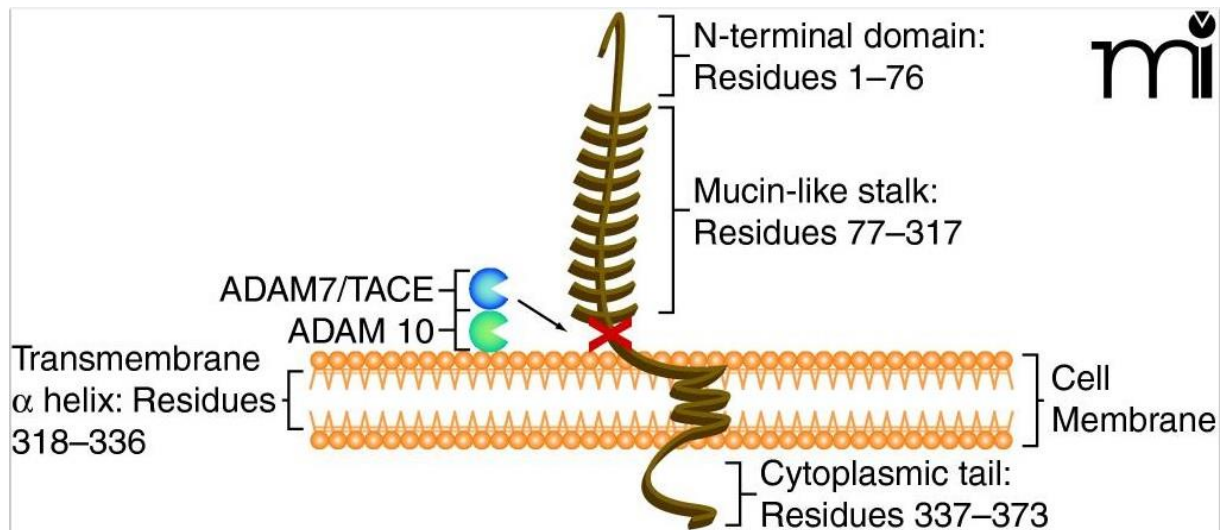


Figure 10: Structure de la chimiokine CX3CL1.

Le CX3CL1 (fractalkine) a la particularité d'exister sous une forme membranaire et sous une forme soluble. Il est composé d'un domaine N-terminal extracellulaire lié à un tronc mucine. Cet ensemble peut être clivé pour les métalloprotéinases telles que ADAM7 et ADAM10 et former le CX3CL1 soluble. Le CX3CL1 membranaire possède aussi une partie intracellulaire reliée au domaine transmembranaire.

(Jones et al., 2010)

Les souris déficientes pour le CX3CR1 ont une diminution de l'activité de « patrolling » des monocytes $Ly6C^{low}$ ainsi qu'une diminution du recrutement des monocytes $Ly6C^{high}$ au niveau des sites infectieux (Auffray et al., 2007) ; (Auffray et al., 2009). Dans un modèle murin de myéloablation transitoire, l'absence de CX3CR1 conduit à une augmentation rapide du nombre de monocytes $Ly6C^{high}$ dans le sang et la rate au cours de la reconstitution du réservoir médullaire et au contraire une réduction de la reconstitution dans la moelle osseuse. Ces résultats impliquent le CX3CR1 dans la libération des monocytes de la moelle osseuse (Jacquelin et al., 2013). Dans un modèle murin de rejet d'allogreffe cardiaque, les cellules endothéliales et les myocytes cardiaques expriment plus de CX3CL1, ce qui conduit à l'adhérence des monocytes sur les parois vasculaires et participe au rejet. L'utilisation

d'anticorps anti-CX3CR1 inhibe la liaison des monocytes à l'endothélium et protège partiellement les souris contre le rejet de greffe (Nelson and Krensky, 2001).

L'axe CX3CR1/CX3CL1 est impliqué dans la survie des monocytes en conditions homéostatiques et inflammatoires. Dans un modèle d'athérosclérose, les signaux de survie procurés par CX3CR1 sont essentiels pour la formation et la progression des plaques d'athérome (Landsman et al., 2009). CX3CR1 participe aussi au maintien de l'homéostasie des macrophages de la lamina propria dans l'intestin (Medina-Contreras et al., 2011). Ces études sont de nouveaux éléments démontrant que le rôle des chimiokines ne se limite pas au chimiotactisme.

Les antagonistes des chimiokines

Leur importance dans les principales fonctions immunes et leur rôle dans le recrutement des leucocytes auraient pu faire des récepteurs de chimiokines des cibles thérapeutiques très prisées par les compagnies pharmaceutiques. Jusqu'à aujourd'hui, un très grand nombre d'antagonistes de ces récepteurs ont été testés dans le traitement de pathologies auto-immunes, d'infections ou de cancers. Cependant, seulement deux molécules sont maintenant utilisées en clinique : des inhibiteurs du CCR5 et du CXCR4 (**Tableau 2**). Ce sont les premiers récepteurs à avoir été ciblés pour la recherche clinique car tous deux sont des corécepteurs de l'entrée du VIH dans les cellules. Plusieurs antagonistes du CCR5 ont atteint la phase III des essais cliniques et la combinaison de ces molécules avec des traitements optimisés chez des patients en échec thérapeutique permet d'améliorer la réponse anti-rétrovirale. Le maraviroc (Pfizer) est une des molécules mises sur le marché. L'étude du CXCR4 contre le VIH n'a pour l'instant pas aboutit mais le plerifloxor (Genzyme) est un antagoniste aujourd'hui approuvé et utilisé dans le traitement de certains cancers comme nous le décrirons plus tard.

En parallèle des essais cliniques, les études précliniques continuent de développer et d'optimiser des antagonistes. CX3CR1 et CCR2 jouent un rôle important dans la formation des plaques d'athérome et l'arrivée des monocytes dans les parois de l'artère. L'utilisation d'un antagoniste de CX3CR1 permet de réduire la progression de l'athérosclérose (Poupel et al., 2013). Des antagonistes du CCR2 ont été développés dans les traitements contre l'athérosclérose ainsi que contre l'insulino-résistance (**Tableau 2**).

L'asthme est associé à un recrutement et à une activation des éosinophiles et des mastocytes dans l'épithélium bronchique via le CCR3. L'inhibition des fonctions de chimiotactisme de CCR3 permet de diminuer l'inflammation pulmonaire liée à l'allergie (Tian et al., 2011). L'utilisation d'antagonistes de la voie SDF-1/CXCR4 a permis de révéler leur implication dans l'allergie des voies respiratoires et la formation des métastases du cancer mammaire chez la souris (Muller et al., 2001). D'autres antagonistes ont été générés dans les cas des maladies pulmonaires obstructives chroniques (CXCR1, CXCR2) (Kaur and Singh, 2013) ou du rejet de greffe (CXCR3) (Jenh et al., 2012).

La majorité des essais cliniques menés sur ces antagonistes n'a pas abouti. De nombreuses raisons ont été évoquées pour expliquer ces échecs dont la redondance des chimiokines et l'hétérogénéité des pathologies ciblées. En effet, démontrer l'efficacité d'un antagoniste ciblant un seul récepteur peut s'avérer complexe par rapport à l'ensemble du réseau chimiokinique. De plus, les différents effets que peuvent avoir l'activation d'un récepteur dans une pathologie ne permettent pas d'optimiser la réponse souhaitée avec l'utilisation d'un antagoniste ciblé. Une des alternatives à ces deux raisons serait l'utilisation d'antagonistes capables de cibler plusieurs récepteurs ou d'inhiber plusieurs chimiokines. Une étude a ainsi montré que le fait de bloquer simultanément CCR5 et CXCR3 grâce à un antagoniste permettait de diminuer le rejet de greffe de rein chez le rat (Kakuta et al., 2012).

L'ensemble de ces travaux permet aussi de souligner les limites présentes entre les recherches précliniques principalement menées chez les rongeurs et l'application à des essais cliniques. Les récepteurs de chimiokines exprimés par les cellules humaines ou murines peuvent avoir des profils d'expression différents et ne pas présenter la même affinité pour l'agoniste. Partant de cela, de nombreux biais peuvent apparaître lors du passage chez l'homme, tels que le choix de la cible, l'affinité de la molécule et le dosage utilisé. Néanmoins, de nombreuses études cherchent encore à produire des antagonistes de chimiokines et à les tester dans de nombreuses pathologies. De plus, nos connaissances sur le fonctionnement de ces petites molécules ne cessent pas de croître, ce qui laisse espérer que certains traitements finiront par aboutir.

receptor	company	phase	compound	generic name	affinity (nM)	MW	log P	indication	status
CCR1	Schering AG (Berlex)	II	BX471		1.0	434	2.1	MS, psoriasis, endometriosis	no efficacy
CCR1	Millennium	II	MLN 3701					MS, multiple myeloma	no longer reported
CCR1	Millennium	II	MLN 3897		2.3	518	5.1	RA, multiple myeloma	no efficacy in RA
CCR1	Pfizer	II	CP-481,715		64	482	2.3	RA	no efficacy
CCR1	AstraZeneca	II	AZD4818		5.0	461	1.9	COPD	no efficacy
CCR1	Chemocentryx	II	CCX354		1.5			RA	ongoing
CCR1	Merck	II	C-4462					RA	no efficacy
CCR1	Merck	II	C-6448					MS	no efficacy
CCR2	Millennium	II	MLN 1202 ^a					RA	no efficacy
CCR2	Incyte	I	INCB8696					atherosclerosis, MS	ongoing
CCR2	Incyte	II	INCB3254		3.7	520	1.9	MS, lupus	no longer reported
CCR2	Incyte	II	INCB3254		3.7	520	1.9	RA, type II diabetes	no longer reported
CCR2	Chemocentryx	I	CCX915					MS	terminated
CCR2	Chemocentryx	II	CCX140		2.3			diabetic nephropathy	ongoing
CCR2	Merck	II	MK-0518		5.0	469	2.4	RA, MS	no efficacy
CCR2	Pfizer	II	PF-4136309					pain	no longer reported
CCR2	BMS	II	BMS-741672					diabetic neuropathy	ongoing
CCR2	J & J	II	JNJ-17166864		20.0	443	3.6	allergic rhinitis	no efficacy
CCR3	Pharmaxis	II	ASM8 ^b					asthma	ongoing
CCR3	GSK	II	GSK766994		10.0	450	2.2	asthma and allergic rhinitis	no efficacy
CCR3	Dupont	I	DPC168		2.0	475	5.1	asthma	development halted
CCR3	BMS	I	BMS-639623		0.3	481	3.5	asthma	ongoing
CCR3	Novartis	I	QAAP-642					allergic rhinitis	development halted
CCR3	AstraZeneca	II	AZD3778		8.1	526	3.8	allergic rhinitis	no longer reported
CCR4	Amgen	II	KW-0761 ^a					oncology	ongoing
CCR4	GSK	I	GSK2239633		10.0	506	27	asthma	ongoing
CCR5	Pfizer	II	UK-127,857	maraviroc	3.0	513	4.4	RA	no efficacy
CCR5	Schering-Plough	II	SCH-C		2.0	557	29	AIDS	registered drug
CCR5	Schering-Plough	I	SCH-C					RA	no efficacy
CCR5	Schering-Plough	I	SCH-C					AIDS	development halted
CCR5	Schering-Plough	II	SCH-D	victiviroc	0.45	533	3.6	AIDS	development halted
CCR5	GSK	III	GW2239633	aplaviroc	3.0	577	3.8	AIDS	development halted
CCR5	Incyte	II	INCB9471		3.1	559	3.9	AIDS	development halted
CCR5	Progenies	II	Pro 140 ^a					AIDS	ongoing
CCR5	Tobira	II	TAK652	ceniciviroc	3.1	696	10.2	AIDS	ongoing
CCR5	AstraZeneca	II	AZD5672		0.26	672	3.1	RA	no efficacy
CCR5	Novartis	I	NIBR-6465		0.8			AIDS	ongoing
CCR5	Sangamo	II	SB-728 ^c					AIDS	ongoing
CCR5	HGS	I	HGS004 ^a					AIDS	ongoing
CCR9	Chemocentryx	III	CCX-282	vercimon	6.0	444	4.7	IBD, Crohn's	ongoing
CXCR1/ CXCR2	Schering-Plough	II	SCH 527123		3.9	415	1.0	COPD	ongoing
CXCR1/ CXCR2	Damps	II	Repertaxin		1.0	283	2.5	pancreatic islet transplantation	ongoing
CXCR2	GSK	I	SB-656933		5.1	463	4.2	COPD, cystic fibrosis	ongoing
CXCR3	Amgen	II	AMG487		8.0	603	3.8	psoriasis	no efficacy
CXCR4	Genzyme	approved	AMD3100	plerixafor	74	502	-0.4	MM, non-Hodgkins lymphoma	registered drug
CXCR4	TaiGen	II	Burixafor					stem cell transplant	ongoing
CXCR4	Polypor	II	POL6326					stem cell transplant	ongoing
CXCR4	Medarex	I	MDX-1338 ^a					multiple myeloma	ongoing
CXCR4	Biokine	I	BKT140 ^d					stem cell transplant	ongoing

^aNeutralizing monoclonal antibodies. ^bAntisense oligonucleotide. ^cZinc finger nuclease. ^dPeptide.

Tableau 2 : Antagonistes de récepteurs de chimiokines impliqués dans des essais cliniques.

Ce tableau regroupe la liste non exhaustive de tests cliniques et pré-cliniques réalisés dans le but de traiter des pathologies diverses (diabète, asthme, cancer) avec des antagonistes de chimiokines. Seuls deux antagonistes ont pour l'instant obtenus une mise sur le marché : le maraviroc (anti-CCR5) utilisé dans le traitement de l'arthrite rhumatoïde et le plerixafor (anti-CXCR4) contre les myélomes multiples et les lymphomes non-Hodgkiniens.

Abréviations : AIDS = Syndrome d'immunodéficience acquise ; COPD = Maladie pulmonaire obstructive chronique ; IBD Maladie intestinale inflammatoire ; MM = Myélome multiple ; MS = Sclérose multiple ; RA = Arthrite rhumatoïde (Pease and Horuk, 2012)

Les phagocytes mononucléés dans le cancer

Le cancer est aujourd'hui la première cause de mortalité en Europe et la deuxième dans le monde après les maladies cardiovasculaires. En France en 2015, le nombre de nouveaux cas de cancer était de 385 000 et le nombre de décès de 149 500 (Source : Institut National du Cancer). Malgré cela, la mortalité due au cancer a diminué ces vingt dernières années. Les cancers solides les plus fréquents sont ceux issus de la prostate, des seins, du colon et des poumons. Ce dernier est d'ailleurs l'un des plus meurtriers.

Les macrophages associés aux tumeurs (TAM) représentent la population stromale la plus abondante dans le microenvironnement tumoral. Ils sont associés à un mauvais pronostic chez les patients dans de nombreux cancers et peuvent diminuer l'efficacité des thérapies anti-cancéreuses. Ils sont aussi des acteurs majeurs dans la réponse inflammatoire puisqu'ils y participent depuis l'initiation jusqu'à sa résolution et peuvent aussi être des acteurs du maintien de l'inflammation dans le cas de pathologie inflammatoire.

L'inflammation et le système immunitaire dans le cancer

Inflammation et Cancer

Les relations entre inflammation et cancer ne sont pas récentes. C'est en 1863 que le Professeur Rudolph Virchow émet l'hypothèse que les tumeurs se développent au niveau de sites d'infections chroniques. Cet état se caractérise par la présence de leucocytes dans les tissus néoplasiques (Balkwill and Mantovani, 2001). Grâce à ces observations, de nombreuses comparaisons ont été faites entre les tumeurs et les blessures, confirmant le caractère inflammatoire de ces cancers comme des blessures qui ne guérissent pas (Dvorak, 1986). Ceci a ouvert la porte à une multitude de nouvelles cibles thérapeutiques dans le traitement des cancers comme les médicaments anti-inflammatoires non-stéroïdiens, les inhibiteurs de COX-

2, une enzyme impliquée dans les réponses inflammatoires ou les corticostéroïdes, déjà utilisés en traitement parallèle des chimio- ou radiothérapies pour réduire les effets secondaires (Rayburn et al., 2009).

L'inflammation est une composante majeure de la progression tumorale, Mantovani *et al.* l'ont même considérée comme étant le septième marqueur du cancer (Mantovani and Sica, 2010) (**Figure 11**). Ces marqueurs correspondent à des caractéristiques adoptées par les cellules tumorales et relevant d'un comportement anormal. Ils comprennent 1) l'insensibilité des cellules à des signaux et à des mécanismes anti-prolifératifs, 2) l'indépendance vis-à-vis des signaux qui stimulent la multiplication cellulaire, 3) l'échappement aux mécanismes apoptotiques, 4) une capacité anormale à induire l'angiogenèse, 5) une capacité proliférative illimitée et 6) l'acquisition d'une capacité invasive et métastatique.

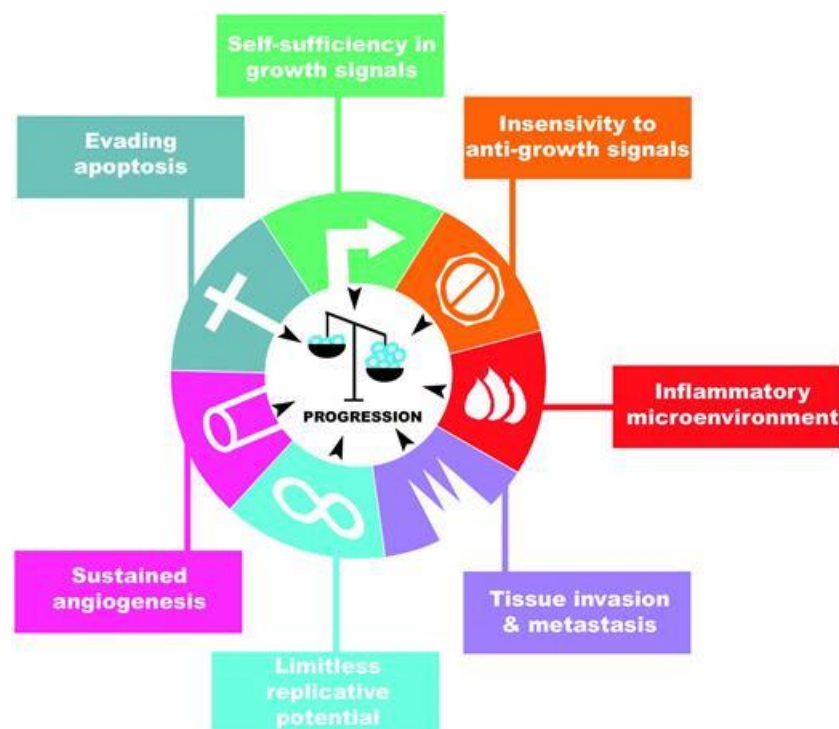


Figure 11 : Schéma des différentes caractéristiques biologiques du cancer.

Il existe 7 marqueurs différents permettant de définir le comportement anormal adopté par les cellules tumorales : 1) l'insensibilité des cellules à des signaux et à des mécanismes anti-prolifératifs, 2) l'indépendance vis-à-vis des signaux qui stimulent la multiplication cellulaire, 3) l'échappement aux mécanismes apoptotiques, 4) une capacité anormale à induire l'angiogenèse, 5) une capacité proliférative illimitée, 6) l'acquisition d'une capacité invasive et métastatique et 7) la présence d'un environnement inflammatoire. (Colotta et al., 2009)

La croissance tumorale est souvent associée à un état inflammatoire chronique. Chez l'homme, une colonisation persistante de la bactérie *Haemophilus influenzae* dans les poumons, signe d'une inflammation chronique, augmente le risque de développer un cancer du poumon. De même, des liens ont été fait entre les bactéries *Helicobacter pylori* et le cancer de l'estomac, entre les virus de l'hépatite B ou C et le cancer du foie et entre l'helminthe *Schistosoma hematobium* et le cancer de la vessie. En plus de l'inflammation prolongée, certains virus dits oncogènes peuvent directement rendre cancéreuses les cellules infectées en s'insérant dans leur génome, comme c'est le cas du papillomavirus associé avec le cancer du col de l'utérus. De façon différente, des composés comme l'amiante ou la fumée de cigarette sont à l'origine d'inflammations chroniques qui vont promouvoir le développement de cancer. La déplétion spécifique de STAT3, facteur de transcription impliqué dans l'immunosuppression, dans les cellules myéloïdes, induit une inflammation du colon et est associée à la production augmentée de TNF α et d'IL-6 par les macrophages, pouvant conduire à une inflammation chronique et un adénocarcinome invasif du colon (Yu et al., 2007). La présence d'un environnement inflammatoire promeut une instabilité génétique pendant le développement de cellules épithéliales tumorales (Colotta et al., 2009). De plus, la suppression de la flore bactérienne par des traitements antibiotiques réduit l'inflammation et semble inhiber la tumorigenèse dans le colon d'un modèle murin de développement spontané de l'inflammation (Deng et al., 2010). L'inflammation contribue au développement tumoral en induisant une prolifération cellulaire, en augmentant l'angiogenèse et l'invasion tissulaire (Grivennikov et al., 2010).

L'inflammation chronique induit une activation de l'endothélium tumoral et l'expression de plusieurs ligands qui facilite l'adhésion des monocytes. Parmi eux se trouve des ligands du CD62L (PSGL-1, des glycoprotéines de l'endothélium, CD44), qui est connu pour réguler l'infiltration des monocytes sur le site inflammatoire. Leurs interactions induisent le

recrutement des monocytes inflammatoires dans les zones tumorales périvasculaires. Les souris déficientes en CD62L ont un potentiel métastatique diminué dépendant de la diminution du recrutement de monocytes/macrophages périvasculaires (Borsig et al., 2001).

Certaines thérapies anti-cancéreuses ciblent l'inflammation associée à la tumeur mais le bénéfice de ces traitements est très controversé. Un des effets de l'inflammation est d'activer la présentation croisée d'antigènes tumoraux par les APC et ainsi induire une réponse anti-tumorale (Zitvogel et al., 2008) mais ces fonctions sont contrebalancées par la promotion des fonctions pro-tumorales, comme le font la nécrose et l'hypoxie qui accompagnent une croissance tumorale rapide et massive (Vakkila and Lotze, 2004). La nécrose libère des médiateurs nécrotiques comme HMGB1, protéine associée à la chromatine et libérée dans le TEM en condition inflammatoire, dont la présence est presque toujours considérée comme associée à un mauvais pronostic chez les patients. La nécrose induit l'infiltration de macrophages et la mise en place de mécanismes inflammatoires et de réparation qui sont nécessaires pour l'angiogenèse, la prolifération cellulaire et la stromagenèse (Vakkila and Lotze, 2004).

L'hypoxie est très présente dans les tumeurs solides pour deux principales raisons. La première est que la prolifération massive et non contrôlée des cellules tumorales est beaucoup plus rapide que la croissance des nouveaux vaisseaux qui constituent la tumeur. La seconde est que ces derniers sont désorganisés et n'assurent pas leur rôle d'apport de nutriment et d'oxygène. Les macrophages s'accumulent dans les zones hypoxiques où ils développent des fonctions pro-tumorales (Murdoch et al., 2008). Ils sont attirés dans ces zones grâce à la production de chimioattractant comme le VEGF dont l'expression est induite par l'hypoxie. C'est d'ailleurs dans ces zones que les macrophages ont une activité angiogénique forte. Les macrophages hypoxiques expriment des facteurs de transcription induits par l'hypoxie (HIF-1,

HIF-2), ce qui conduit à la transcription de gènes qui régulent la prolifération, le métabolisme et l'angiogenèse (Lewis and Murdoch, 2005).

L'hypoxie diminue l'expression de CCR2 et CCR5 par les macrophages, induisant la désensibilisation à leurs ligands chimiokines. Cette inhibition limite la migration des macrophages en réponse aux chimiokines. Elle apporte un élément de réponse pour expliquer la rétention et l'accumulation des macrophages dans les zones hypoxiques (Bosco et al., 2004b). Bien que ces deux récepteurs soient exprimés de façon constitutive, leur expression peut être augmentée suite à une stimulation par l'IFN γ .

Les concepts d'immunosurveillance et d'immunoediting

L'utilisation de souris immunodéficientes grâce à des invalidations génétiques telles que les souris nude (déficientes en lymphocytes T), SCID (déficientes en lymphocytes T et B) ou déficientes pour RAG, protéine nécessaire au réarrangement du TCR et des Ig (déficientes en lymphocytes T et B et en NKT) a permis de prouver l'importance du système immunitaire dans le contrôle du cancer. L'étude de Shankaran *et al.* a permis de démontrer l'importance de l'immunité adaptatrice contre les tumeurs en utilisant des souris immunodéficientes telles que RAG2^{-/-} et RAG2^{-/-} x STAT1^{-/-} car elles sont plus susceptibles aux inducteurs de carcinomes et au développement de tumeurs spontanées (Shankaran et al., 2001).

Nous savons maintenant que dans la plupart des cas, le système immunitaire prévient l'apparition des cancers de différentes manières. Il protège l'hôte des infections virales susceptibles de conduire à des tumeurs induites par ces virus. Il empêche l'établissement d'un environnement inflammatoire qui facilite la tumorigenèse en éliminant les pathogènes et en résolvant rapidement l'inflammation. Enfin, le système immunitaire élimine les cellules tumorales dans certains tissus car les nouvelles cellules transformées expriment des ligands

activant les récepteurs de l'immunité innée ainsi que des antigènes tumoraux reconnus par les cellules de l'immunité adaptatrice. Cependant, il arrive parfois que le système immunitaire échoue et que l'inflammation non contrôlée combinée à la dégénérescence de certaines cellules conduisent au développement d'un cancer.

Les antigènes tumoraux sont à l'origine de la réponse immunitaire adaptatrice. Leur présence a été démontrée avec des souris immunisées contre des tumeurs induites chimiquement qui étaient protégées contre de nouvelles injections de ces mêmes tumeurs. Ces antigènes sont souvent issus de l'expression protéique de gènes mutés (ex : p53), de protéines du soi anormalement exprimées (ex : HER-2) ou de protéines exogènes issues de l'expression de gènes de virus oncogéniques (ex : protéines du papillomavirus) (Cheever et al., 2009).

Le concept d'immunosurveillance a été introduit dans les années 1950 par Burnet et considère que le système immunitaire empêche ou freine le développement de nombreux cancers (Burnet, 1957). Ce concept a été validé dans divers modèles expérimentaux de cancers induits ou spontanés. Chez l'homme, des individus ayant des défauts génétiques portant sur les fonctions de l'immunité ou des patients avec une immunodéficience induite ont un risque accru de développer des cancers. D'autre part, la présence d'infiltrat lymphocytaire abondant est souvent associée à un bon pronostic (Galon et al., 2006). L'importance du système immunitaire pour contrer le développement tumoral a donné lieu au concept d'immunoediting. C'est une théorie selon laquelle la réponse immunitaire fait évoluer l'immunogénicité des tumeurs par sélection des variants tumoraux résistants. En effet, les cellules immunitaires vont détruire les cellules qu'elles reconnaissent et les cellules tumorales qui seront capables d'échapper au système immunitaire vont survivre et participer au développement du cancer. L'implication du système immunitaire dans le développement des

cancers peut être expliqué depuis l'immunosurveillance jusqu'à l'échappement tumoral en trois phases majeures que nous allons présenter brièvement (Kim et al., 2007).

La phase d'élimination

Lors de cette phase, les cellules cancéreuses sont reconnues et détruites par des effecteurs de l'immunité innée ou adaptatrice. L'élimination est difficile à établir cliniquement car à ce stade, aucune tumeur n'est visible. Les mécanismes par lesquels le système immunitaire reconnaît la présence d'une tumeur naissante sont encore mal connus. Il existe entre autres des signaux de danger comme les IFN de type I qui sont induits très tôt dans le développement tumoral. Ils activent les NK, les macrophages et les cellules dendritiques et induisent l'initiation des réponses adaptatrices anti-tumorales. Les signaux de danger associés à des motifs moléculaires (DAMP) sont libérés par les cellules tumorales mourantes et dans les tissus endommagés par l'invasion de tumeurs solides qui participent aussi à l'activation du système immunitaire (Sims et al., 2010). Les ligands de stress comme RAE-1 et H60 (souris) ou MICA/B (humain) sont d'autres cibles activatrices des cellules immunitaires, exprimées à la surface des cellules tumorales. Ils se lient à des récepteurs exprimés par des cellules de l'immunité innée, ce qui conduit à la production de cytokines pro-inflammatoires et immunomodulatrices qui vont faciliter le développement d'une réponse immunitaire adaptatrice anti-tumorale. En théorie, l'ensemble de ces signaux conduit à la destruction complète des cellules tumorales (**Figure 12**).

La phase d'équilibre

Dans certains cas, une partie des cellules tumorales parvient à survivre à la phase d'élimination et le développement tumoral entre dans une phase d'équilibre. Cette phase est envisagée comme étant la plus longue du processus d'immunosurveillance. Dans les modèles de tumeurs induites par des traitements avec des faibles doses du carcinogène MCA (3'-

methylcholanthrène), la phase d'équilibre apparaît comme la combinaison de la croissance tumorale et l'action cytotoxique du système immunitaire sur les cellules tumorales, ce qui limite l'expansion de la tumeur (Koebel et al., 2007). Les acteurs impliqués dans cet équilibre sont majoritairement issus de l'immunité adaptative tels que l'IL-12, l'IFN- γ , les NK, les lymphocytes T CD4 et CD8 alors que les acteurs de l'immunité innée ont été peu étudiés (**Figure 12**). Par exemple, l'activation des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) via leur TCR et la reconnaissance d'antigènes tumoraux leur permet de tuer les cellules tumorales grâce à trois voies principales : une voie liée aux récepteurs de mort (Fas/FasL et TRAIL) ; une voie de sécrétion de granules (perforines/granzymes) conduisant à la lyse des cellules tumorales (Martinez-Lostao et al., 2015) et une voie indirecte liée à la production de cytokines comme l'IFN γ et le TNF α (Andersen et al., 2006).

Dans de nombreux cancers, les cellules développent des altérations qui réduisent leur immunogénicité comme la perte du CMHI ou des antigènes tumoraux et l'augmentation de leur capacité proliférative et de survie. Le système immunitaire va alors éliminer toutes les cellules tumorales immunogènes ce qui induit la sélection de variants non reconnus par les cellules immunes. Ce processus a été défini selon le terme d'immunoediting.

La phase d'échappement

Cette phase résulte d'une part de l'immunoediting progressif des cellules tumorales qui aboutit à leur résistance au système immunitaire. Les cellules tumorales peuvent échapper au système immunitaire en améliorant leur capacité à agir contre les actions cytotoxiques dirigées contre elles. Elles peuvent par exemple induire des mécanismes anti-apoptotiques en activant de façon persistante des facteurs de transcription pro-oncogéniques comme STAT3 ou l'expression de molécules anti-apoptotiques comme BCL-2. Les cellules tumorales elles-mêmes peuvent produire des cytokines immunosuppressives telles que VEGF, TGF- β , IDO et

ainsi recruter des cellules immunosuppressives. Cette phase est liée à une forte instabilité génétique et au processus d'immuno-sélection (**Figure 12**) (Khong and Restifo, 2002).

D'autre part, le TME participe à l'échappement tumoral grâce à l'établissement d'un environnement immunosuppresseur (Radoja et al., 2000). L'échappement tumoral est aussi issu des mécanismes d'immunorégulation. L'immunosuppression consiste à inhiber par différents mécanismes les fonctions effectrices des cellules immunitaires comme peuvent le faire les lymphocytes T régulateurs (Treg), les cellules myéloïdes suppressives (MDSC) ainsi que certaines fonctions des macrophages associés aux tumeurs (TAM).

Les Treg sont des acteurs de l'immunosuppression. Ils peuvent inhiber les fonctions effectrices des lymphocytes par contacts cellulaires comme l'expression de checkpoints immunologiques et de récepteurs inhibiteurs (CTLA-4, PD-1, TIGIT, IDO ...) ou dépendants de facteurs solubles comme les cytokines suppressives (TGF- β , IL-10, IL-35), les granules de perforines et granzymes et la consommation de l'IL-2 afin de perturber le métabolisme des lymphocytes (Vignali et al., 2008). Chez l'homme, un faible nombre de Treg est un bon pronostic dans de nombreux cancers (sein, poumon, foie, rein, pancréas) (Shang et al., 2015).

Les MDSC sont une population hétérogène de cellules myéloïdes immatures. Ce sont des cellules productrices de L-arginine 1, de ROS et de NO, permettant leur activité pro-tumorale et l'inhibition fonctionnelle des lymphocytes T (Bronte and Zanovello, 2005) ; (Rodriguez and Ochoa, 2008).

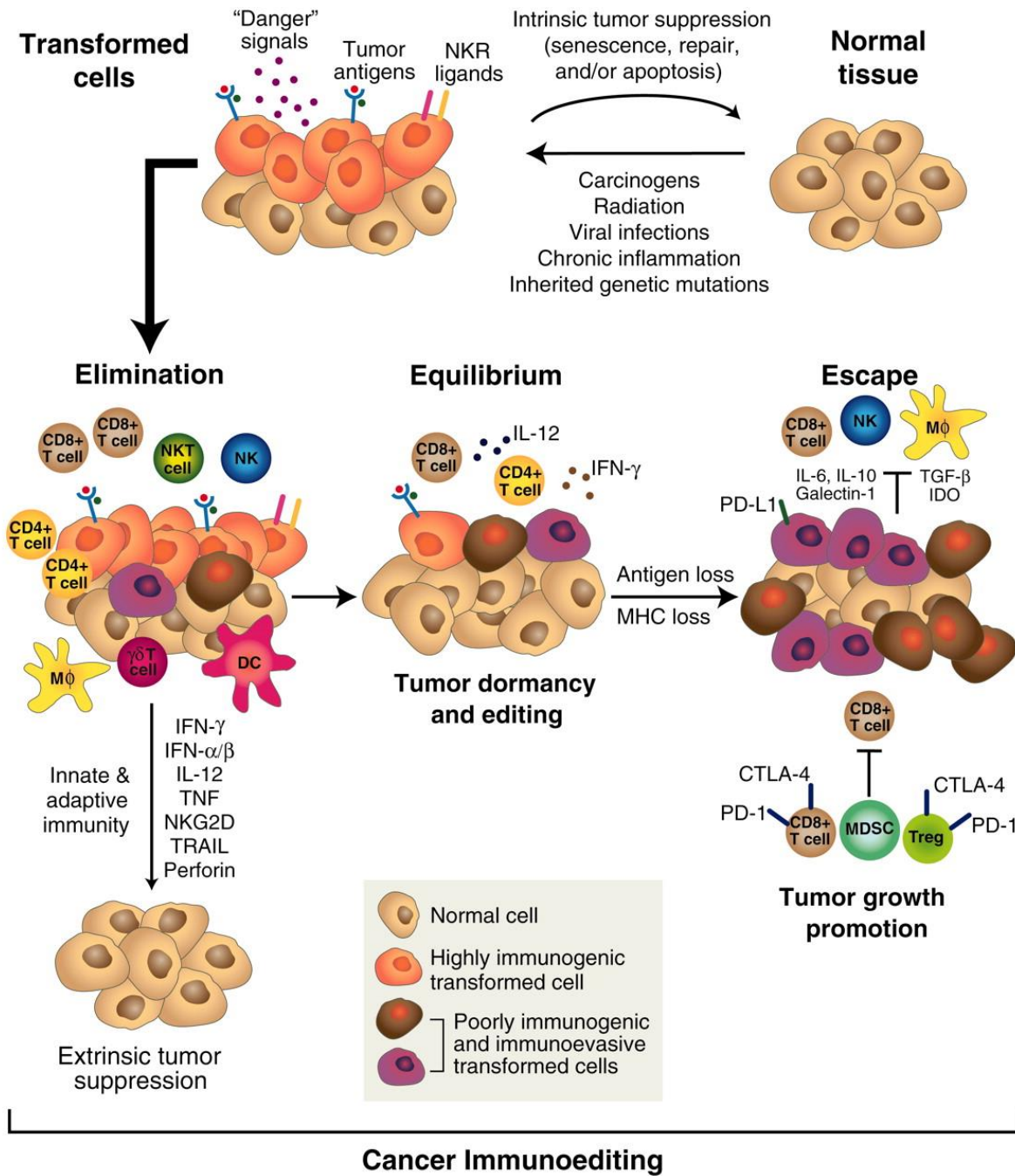


Figure 12: Concept de l'immunoediting

Le système immunitaire (SI) est fortement impliqué tout au long du développement tumoral. Les interactions entre les cellules tumorales et les cellules immunitaires évoluent et peuvent être séparées selon trois phases distinctes. La phase d'élimination suit l'apparition des premières cellules qui ont dégénéré. Les cellules immunitaires recrutées vont reconnaître et détruire les cellules tumorales en réponse à des signaux tels que les signaux de danger ou de stress. La phase d'équilibre est une phase de contrôle de la croissance tumorale par un équilibre entre la croissance des cellules tumorales et leur élimination par les cellules immunitaires. La destruction de toutes les cellules tumorales immunogènes induit la sélection de variants non reconnus (immunoediting) et aboutit à la phase d'échappement. Cette dernière phase résulte de mécanismes mis en place par les cellules tumorales pour ne plus être reconnues par le SI et par l'établissement d'un environnement immunosuppresseur par le TME. Ceci conduit à une croissance tumorale non contrôlée et à l'établissement du cancer d'un point de vue clinique. (Schreiber et al., 2011)

Les macrophages dans le cancer

Les macrophages représentent la population immunitaire majoritaire dans le microenvironnement tumoral. Contrairement à d'autres types cellulaires comme les lymphocytes cytotoxiques ou les MDSC qui sont plutôt définis comme étant anti- ou pro-tumoraux, celui des macrophages est plus paradoxal. En effet, les macrophages ayant des phénotypes pro- ou anti-tumoraux semblent pouvoir coexister au sein du microenvironnement tumoral. Nous allons maintenant essayer d'avoir un aperçu global du rôle des TAM et de montrer que ces cellules représentent finalement un système dynamique qui évolue sans cesse avec l'ensemble du microenvironnement (**Figure 13**).

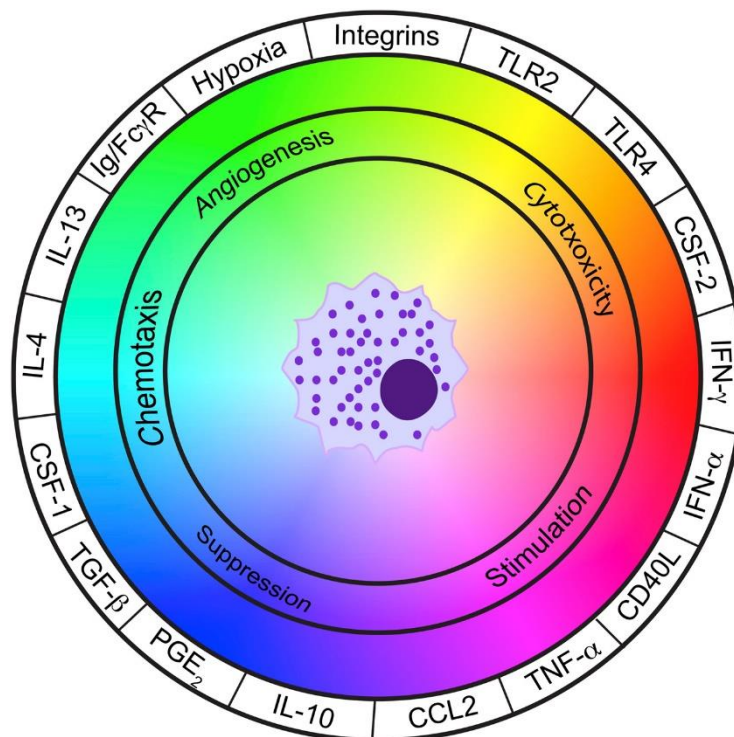


Figure 13 : Associations des fonctions macrophagiques au microenvironnement tumoral.

Les signaux provenant du microenvironnement tumoral sont représentés sur le cercle extérieur. Ils participent à l'activation des macrophages et conditionnent les fonctions qui en découlent (cercle intérieur). Les intégrines et les TLR représentés sur le cercle extérieur peuvent être activés par plusieurs ligands. Cette figure permet d'avoir un aperçu de la complexité des fonctions macrophagiques associée à la multitude de signaux provenant de l'extérieur qu'ils sont capables de capter. (Ruffell and Coussens, 2015)

Le rôle des monocytes

Jusqu'ici les TAM sont considérés comme des macrophages provenant de l'infiltration de monocytes qui se sont différenciés dans la tumeur. Les monocytes semblent pénétrer sur le site tumoral en réponse à l'inflammation liée à la tumeur et en présentant des fonctions pro-inflammatoires. En revanche, une fois qu'ils ont infiltré le tissu, la tumeur parvient à altérer leurs fonctions en partie grâce à la production d'IL-10 dans le TME. Ainsi, le transfert adoptif de monocytes inflammatoires à des souris ayant des tumeurs injectées en sous-cutanée favorise la croissance tumorale (Augier et al., 2010). Néanmoins, ce n'est pas seulement le monocyte en lui-même qui participe à la croissance tumorale mais le fait qu'il puisse se différencier en DC tolérogène ou en TAM. La déplétion du facteur de transcription permettant la différenciation des monocytes en TAM (RBPJ) réduit la densité tumorale, suggérant que la majorité des TAM provient de la différenciation monocyttaire (Franklin et al., 2014). Les monocytes inflammatoires contribuent à l'accumulation des TAM et à leur maintenance comme cela a été démontré dans un modèle murin de tumeur mammaire (Movahedi et al., 2010).

Contrairement aux monocytes inflammatoires, peu de papiers évoquent la possibilité que les monocytes Ly6C^{low} se différencient en TAM. Dans la tumeur, ils peuvent être plutôt protecteurs, ce qui est sans doute lié à leur rôle de surveillance du système vasculaire. Ils s'accumulent dans les métastases et inhibent leur implantation et leur croissance dans le nouveau tissu. Ces monocytes phagocytent les débris tumoraux et participent au recrutement et à l'activation des NK (Hanna et al., 2015). Il existe une population particulière de monocytes Ly6C^{low} qui exprime Tie-2, décrite chez l'homme, très présente dans les tumeurs, qui a un rôle essentiel dans l'angiogenèse et la progression tumorale (Venneri et al., 2007). Le rôle des monocytes Ly6C^{low} semble lui aussi controversé puisqu'une étude a récemment démontré qu'ils pouvaient participer à la résistance de la tumeur aux traitements anti-

angiogéniques. Chez l'homme comme chez la souris, l'utilisation d'un traitement anti-VEGFR2 contre le cancer colorectal augmente le CX3CL1 sur le site tumoral, induisant le recrutement des monocytes Ly6C^{low}. Le blocage de la chimiokine empêche le recrutement de ces cellules, ce qui améliore l'efficacité du traitement anti-VEGFR2 dans le modèle murin (Jung et al., 2017). Il apparaît que les monocytes Ly6C^{low} ont eux aussi des rôles paradoxaux puisqu'ils sont bénéfiques contre le développement tumoral et les métastases alors qu'ils participent à l'échec de certaines thérapies anti-tumorales.

Les récentes découvertes sur l'ontogénie des macrophages reposent la question de leur origine au sein des tumeurs. Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à cette question et mon travail a consisté à démontrer que les nodules tumoraux pulmonaires étaient composés de macrophages de différentes origines. Les travaux récents de Bowman *et al.* ont déjà en partie répondu à cette question en montrant dans un modèle de gliomes chez la souris que les tumeurs cérébrales comportaient des macrophages issus du recrutement monocyttaire et d'autres issus de la prolifération des microglies (Bowman et al., 2016). Un travail encore plus récent semble confirmer notre hypothèse en montrant dans un modèle orthotopique d'adénocarcinome pancréatique que le pool de TAM est composé de macrophages d'origine embryonnaire et de la différenciation de monocytes médullaires (Zhu et al., 2017). Ces découvertes vont certainement améliorer notre compréhension de la fonctionnalité des TAM mais le rôle respectif de ces différentes sous-populations reste pour l'heure inconnu.

Rôle des macrophages dans la réponse anti-tumorale

Les macrophages sont décrits principalement comme étant pro-tumoraux pendant la phase d'échappement. Cependant, il est fort probable que les macrophages anti-tumoraux soient aussi présents et que les deux réponses fonctionnelles doivent coexister dans une population globale. Cela rend d'autant plus dur la distinction des macrophages entre M1 et M2. De plus,

certaines fonctions, comme la phagocytose, n'ont pas encore été associées à des réponses pro- ou anti-tumorales ce qui augmentent le flou présent autour du paradoxe des macrophages.

Les macrophages anti-tumoraux inhibent le développement des tumeurs en produisant de l'IFN- γ et de l'IL-12 et par leurs activités cytotoxiques. Cependant, le microenvironnement tumoral contient de nombreux éléments pour induire les macrophages immunosuppresseurs tels que la production de cytokines pro-tumorales (IL-10) et de facteurs de croissance (VEGF).

Comme nous l'avons expliqué précédemment, la phagocytose des cellules apoptotiques ou nécrotiques est une fonction essentielle dans différents processus homéostatiques et dans la régénération tissulaire (Hochreiter-Hufford and Ravichandran, 2013). En revanche, durant le développement tumoral, le rôle de la phagocytose entre les réponses pro- et anti-tumorales n'est pas encore connu. La phagocytose des cellules apoptotiques exposant de la phosphatidylsérine, molécule membranaire intracellulaire apparaissant à la surface en cas d'apoptose, conduit à la sécrétion de TGF- β et de VEGF par les macrophages, ce qui favorise, respectivement la résolution de l'inflammation et la régénération (Huynh et al., 2002). Au contraire, la calréticuline, protéine du réticulum endoplasmique transférée à la membrane des cellules nécrotiques, induit une réponse pro-inflammatoire des macrophages.

Les macrophages sont capables de faire la distinction entre les cellules vivantes ou mourantes grâce à divers mécanismes. Le récepteur CD47 est une molécule ubiquitaire qui transmet un signal « don't eat me » aux cellules immunitaires. Les cellules endommagées ou mourantes perdent l'expression de cette molécule (Reinhold et al., 1995). La liaison de SIRP- α , une glycoprotéine de la famille des SIRP exprimée par les cellules myéloïdes, au CD47 permet d'inhiber la phagocytose et participe au maintien de l'homéostasie. CD47 a été découvert comme surexprimé par les cellules tumorales dans certains types de cancer, ce qui peut participer à les protéger contre la phagocytose (Chao et al., 2012).

Les macrophages pro-inflammatoires peuvent recruter et activer des lymphocytes Th1, des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) et des cellules NK au niveau du site tumoral en produisant des cytokines pro-inflammatoires. Ces macrophages vont sur-exprimer le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CHMII) et des molécules de co-stimulation (CD40, CD80, CD86) et produire de l'IL-12. L'ensemble de ces éléments est nécessaire pour parvenir à une stimulation antigénique de qualité et induire la différenciation des lymphocytes en Th1.

Dans certains cas, les macrophages sont capables de faire de la cytotoxicité directe via deux voies. La cytotoxicité des tumeurs générée par les macrophages (MTC) est un processus lent qui peut durer jusque trois jours. Il implique la liaison directe des macrophages aux cellules tumorales. Les macrophages vont sécréter des facteurs (TNF α , protéases) directement dans la cellule tumorale et conduire à sa lyse (Klostergaard, 1987) ; (Koestler et al., 1987). La cytotoxicité cellulaire induite par les anticorps (ADCC) est plus rapide que la MTC car elle dure quelques heures. Ce mécanisme dépendant des anticorps conduit lui aussi à la lyse des cellules tumorales. La liaison d'anticorps sur les antigènes de surface des cellules tumorales, puis la liaison récepteurs des Fc des macrophages à la partie constante de ces anticorps permet l'activation des macrophages et conduit à la lyse des cellules tumorales (Herter et al., 2014).

Le rôle pro-tumoral des macrophages

Une majorité des études cliniques menées a révélé qu'un nombre élevé de macrophages associés aux tumeurs (TAM) était un facteur de mauvais pronostic (Ruffell and Coussens, 2015). Par exemple, l'augmentation de la densité de macrophages corrèle avec un faible taux de survie dans les cas de cancers du sein, de la prostate, des poumons et du foie.

De nombreuses études sur des modèles animaux ont aussi démontré que les macrophages potentialisaient la progression tumorale et les métastases. Des souris déficientes en

macrophages présentent une diminution de la progression tumorale, une nécrose prononcée et des vaisseaux tumoraux avec une morphologie anormale (Nowicki et al., 1996). Les souris déficientes en CSF-1 ont une diminution de la différenciation des macrophages et de leur accumulation dans les tumeurs du sein du modèle de tumeur mammaire spontanée PyMT. De plus, l'expression transgénique de CSF-1 dans l'épithélium mammaire de ces souris conduit à l'accélération de la croissance tumorale, une augmentation de l'apparition de métastases pulmonaires et une infiltration massive de macrophages dans la tumeur primaire (Lin et al., 2001).

De nombreuses études ont démontré que l'administration de liposomes de clodronate, qui induisent l'apoptose des cellules phagocytaires, inhibait la croissance de plusieurs modèles de tumeurs tels que le mélanome, le carcinome pulmonaire de Lewis ou le cancer des ovaires (Piaggio et al., 2016) ; (Schmall et al., 2015) ; (Reusser et al., 2014).

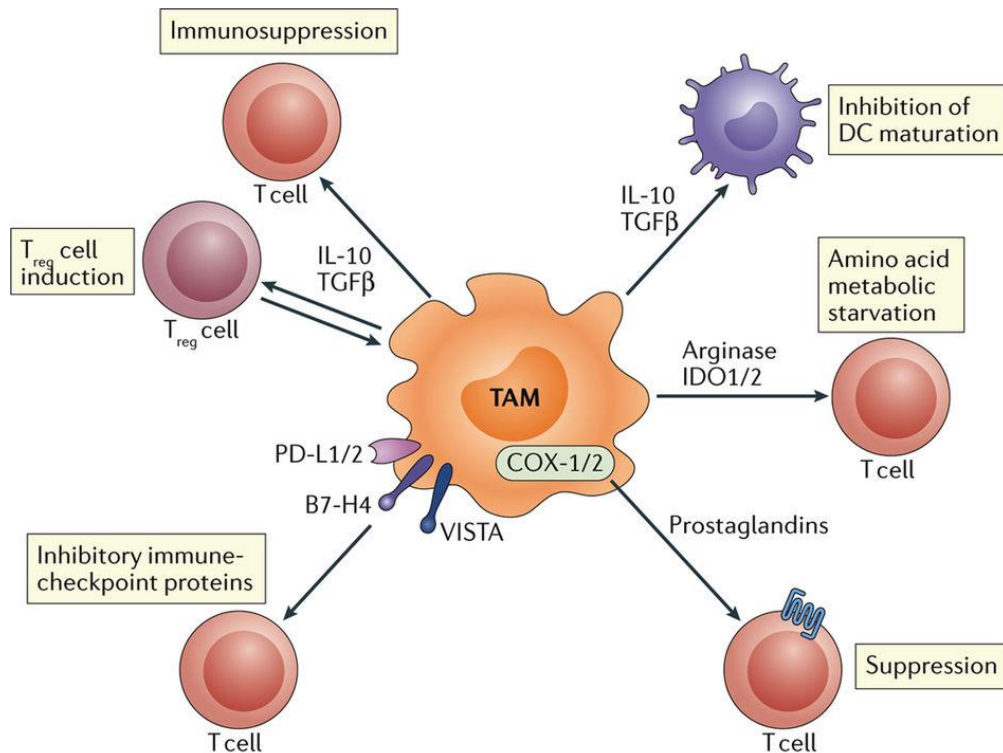
Les TAM produisent du VEGF dans les zones hypoxiques des tumeurs humaines et de modèles murins, ce qui stimule l'angiogenèse locale et permet le recrutement de plus de macrophages dans ces zones (Leek and Harris, 2002). Le VEGF-A est connu pour son implication dans le recrutement des macrophages dans les régions hypoxiques (Murdoch et al., 2004). L'augmentation du VEGF-A dans ces zones agit comme un chimio-attractant pour les monocytes et les macrophages (Lee et al., 2013). Les souris déficientes en VEGFR1 (récepteur du VEGF-A) ont une migration des macrophages dans les zones hypoxiques diminué en réponse au VEGF-A car le recrutement des macrophages sur le site tumoral est bloqué (Li et al., 2011).

Les macrophages périvasculaires sont caractérisés par une forte expression de TIE2, récepteur de l'angiopoïétine et VEGFA, ce qui stimule l'angiogenèse tumorale, la libération des cellules tumorales dans la circulation et la rechute après chimiothérapie. Ils jouent aussi un rôle

important dans les métastases tumorales en régulant la dégradation de la matrice extracellulaire (ECM), la sécrétion de protéases, la libération de molécules chimioattractantes et l'intravasation des cellules tumorales (Lewis et al., 2016).

Comme évoqué précédemment, au-delà des Treg et des MDSC, les macrophages exercent aussi des fonctions immunosuppressives. Les macrophages sont capables d'inhiber directement la prolifération des lymphocytes T ainsi que leur production d'IFN γ , comme cela a été décrit dans le carcinome ovarien humain (Kryczek et al., 2006). Les TAM peuvent participer à la rétention des CTL hors de la zone tumorale, les empêchant d'infiltrer la tumeur pour y exercer leurs fonctions cytotoxiques (Boissonnas et al., 2013).

Au sein du microenvironnement tumoral, les TAM sont capables de produire des cytokines immunosuppressives telles que l'IL-10 et le TGF β (Lin and Pollard, 2004) et ils expriment les récepteurs PD-1 et CTLA-4 qui sont impliqués dans l'anergie des lymphocytes en bloquant les signaux de costimulation (Noy and Pollard, 2014). En parallèle, une étude a montré que la production d'IL-10 induit l'expression de PD-L1 par les monocytes et diminue la réponse cytotoxique des lymphocytes T ce qui contribue à la croissance tumorale (Kuang et al., 2009) (**Figure 14**). Dans les cancers ovariens humains, les macrophages produisent du CCL22, une chimiokine qui régule l'arrivée des Treg qui sont associés à un mauvais pronostic dans ce type de cancer.



Nature Reviews | Clinical Oncology

Figure 14 : Fonctions immunosuppressives des TAM.

Les TAM sont impliqués dans de nombreuses fonctions immunosuppressives. A travers des interactions bidirectionnelles, ils peuvent promouvoir l'activité immunosuppressive des Treg par la production d'IL-10 et de TGFβ. Ces mêmes cytokines sont aussi impliquées dans l'inhibition de la maturation des DC. La production d'IDO et d'arginase par les TAM peut conduire à une diminution du métabolisme des lymphocytes T. Les TAM expriment les protéines de points de contrôle immunologiques (PD-L1, CTLA-4) pour bloquer la co-stimulation des lymphocytes T et les rendre anergiques. L'ensemble de ces fonctions induit l'inhibition des réponses adaptatives effectrices. (Mantovani et al., 2017)

Implication des macrophages dans l'invasion des cellules tumorales et les métastases

Le développement de métastases est une des principales causes de mortalité de patients atteints de tumeurs solides. A moment du diagnostic d'un cancer, au moins la moitié des patients présente des métastases détectables cliniquement. Les métastases se développent suite à un processus compliqué qui implique l'invasion des cellules tumorales issues de la tumeur primaire dans les tissus environnants suivit de l'intravasation dans les vaisseaux du sang ou de la lymphe. Après cela, les cellules tumorales circulent jusqu'à ce qu'elles s'arrêtent et extravasent dans des sites secondaires. Les tumeurs primaires sont capables d'induire

l'accumulation de cellules myéloïdes sur des sites distants, ce qui favorise l'implantation de métastases (Kaplan et al., 2005).

L'imagerie intravitale utilisée sur le modèle de tumeurs mammaires spontanées PyMT ou sur des xénogreffes de cellules tumorales mammaires humaines à des souris immunodéficientes a permis de mettre en évidence le rôle des macrophages dans la migration des cellules tumorales et l'invasion (Condeelis and Pollard, 2006). Certaines fonctions des macrophages comme le remodelage de la matrice permettent l'invasion tumorale et améliorent la capacité des cellules tumorales à entrer dans les vaisseaux. L'intravasation peut être bloquée par l'inhibition pharmacologique de l'EGFR (Wyckoff et al., 2004). L'hereguline et le CXCL12 participent à la co-migration des macrophages et des cellules tumorales comme décrit dans un modèle de cancer du sein. Ces molécules peuvent être produites par les cellules tumorales ou les fibroblastes et suggèrent la mise en place d'un microenvironnement favorable à l'invasion (Hernandez et al., 2009).

L'activité angiogénique des macrophages participe à la libération des cellules tumorales dans les systèmes circulatoires (**Figure 15**). En effet, les nouveaux vaisseaux sont très perméables et avec des membranes minces, ce qui facilite la sortie des cellules tumorales. Les macrophages peuvent alors transporter les cellules tumorales grâce à des interactions de molécules d'adhésion exprimées par les deux types cellulaires (van Netten et al., 1993). Les macrophages participent à l'extravasation des cellules tumorales et à leur survie dans le nouveau site métastatique (Qian et al., 2009). Là encore les macrophages ont un rôle prépondérant. Leur nombre dans les métastases des ganglions lymphatiques a été associé à un faible taux de survie (Oberge et al., 2002).

Une fois dans le nouveau tissu, une phase d'adaptation des cellules tumorales à leur microenvironnement est nécessaire pour qu'elles parviennent à proliférer et à former des

nodules métastatiques (Chaffer and Weinberg, 2011);(Pantel and Brakenhoff, 2004);(Gupta and Massague, 2006). En effet, à cette étape, il est suggéré que certaines cellules tumorales meurent, retournent dans une phase de prolifération cellulaire contrôlée ou deviennent quiescentes (Celia-Terrassa and Kang, 2016). Ce dernier état est retrouvé en clinique où de nombreux patients atteints de mélanome, de carcinomes du sein ou de la prostate développent des métastases des années après le diagnostic ou le traitement de la tumeur primaire (Aguirre-Ghiso, 2007). Les métastases sécrètent du CCL2 afin de recruter des monocytes inflammatoires. Dans une étude, les auteurs concluent que le VEGF est aussi impliqué dans le recrutement des cellules myéloïdes car l'inhibition du VEGFR avec un antagoniste inhibe leur accumulation et la formation de métastases (Kaplan et al., 2005). En revanche, cela n'exclue pas que l'inhibition du VEGFR soit plutôt impliquée dans la survie et l'efficacité des TAM dans le développement des métastases sans interférer avec l'infiltration des monocytes sur le site tumoral.

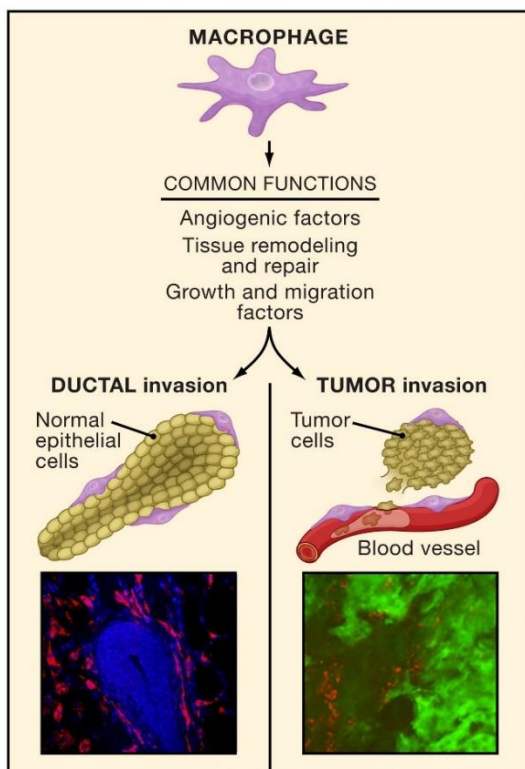


Figure 15 : Certaines fonctions macrophagiques favorisent l'invasion tumorale. Les macrophages ont de nombreuses fonctions utiles en condition physiologique pour le maintien de l'homéostasie. Le schéma à gauche représente le rôle des macrophages dans l'invasion des cellules épithéliales pendant la morphogenèse des canaux mammaires. Ces mêmes fonctions sont impliquées dans l'invasion tumorale et les métastases (droite). L'imagerie intravivale permet d'observer les cellules épithéliales (bleu) présentes dans une glande mammaire de souris pendant son développement. La glande est entourée de macrophages (rouge). Ces macrophages sont aussi présents dans les tumeurs mammaires (vert) et s'accumulent au niveau du front d'invasion. (Condeelis and Pollard, 2006)

Implication des phagocytes mononucléés dans les thérapies anti-cancéreuses

Les différentes thérapies anti-cancéreuses

La chimiothérapie et la radiothérapie restent les principaux traitements contre le cancer avec la chirurgie et sont référés comme thérapies conventionnelles. La chimiothérapie représente plus de 300 000 personnes traitées en France en 2015 pour des cancers de l'appareil digestif (25%), du sein (20%), des hémopathies malignes (18%) et de l'appareil respiratoire (15%) (Source : Institut National du Cancer). La radiothérapie représente plus de 200 000 personnes traitées principalement pour des cancers du sein (38%), de la prostate (16%) ou des voies respiratoires (9%). (Source : Institut National du Cancer). En revanche, ces thérapies sont parfois suivies par des phases de rechute ou sont confrontées à des phénomènes de résistance qui compliquent gravement le pronostic, en particulier chez des patients atteints de tumeurs inopérables. C'est pourquoi les chercheurs s'intéressent maintenant à développer la médecine de précision, en se basant sur de meilleures connaissances des mécanismes biologiques de l'apparition et du développement des tumeurs grâce à des données génétiques, environnementales et immunologiques.

La médecine de précision représente 21,7% des patients par rapport au 39% traités par chimiothérapie et 29,7% traités par radiothérapie (Source : Institut National du Cancer). Les thérapies ciblées et les immunothérapies font partie de ce type de médecine et sont maintenant utilisées dans plusieurs types de cancers comme les cancers du sein, du poumon, les mélanomes ou les lymphomes.

Les thérapies ciblées visent directement les cellules tumorales en bloquant leur croissance ou la propagation de la tumeur. Elles peuvent agir sur des anomalies moléculaires ou interférer avec des mécanismes du développement ou de la dissémination des cellules tumorales. La

première thérapie ciblée autorisée en 2000 a été le trastuzumab (anti-HER2), utilisée comme traitement dans les cancers du sein métastatiques HER2 positifs. En 2015, le nombre de thérapies ciblées autorisées est de 43 dans le traitement des cancers. De nombreuses études s'intéressent maintenant à développer des thérapies combinées, dont le but est d'ajouter un nouveau traitement à des thérapies conventionnelles afin d'améliorer leur efficacité. Nous allons ici développer comment répondent les monocytes et les macrophages à ces différents types de thérapies, seules ou combinées.

Les immunothérapies ne ciblent pas directement la tumeur mais agissent sur le système immunitaire. Leurs buts sont de redonner leurs aptitudes aux cellules immunitaires effectrices pour qu'elles détruisent la tumeur ou rendre les cellules tumorales plus reconnaissables au système immunitaire. Il existe différents types d'immunothérapie. Les plus utilisés sont les anticorps monoclonaux qui bloquent les fonctions immunosuppressives comme les inhibiteurs des points de contrôle immunologique (CTLA-4, PD-1, PD-L1) mais d'autres anticorps existent aussi contre des cibles différentes et variées du système immunitaire (cellules, cytokines). Les immunothérapies par transfert adoptif de cellules cherchent à éduquer des cellules naïves (lymphocytes T, DC) pour qu'elles détruisent les cellules tumorales ou induisent une réponse adaptatrice efficace. Il existe aussi des anticorps bispécifiques, visant à rapprocher le système immunitaire des cellules tumorales et la vaccination thérapeutique anti-tumorale dont le but est de stimuler et diriger le système immunitaire contre la tumeur.

Les thérapies anti-tumorales provoquent souvent des effets secondaires indésirables pour les patients. Certains effets moins connus sont l'activation du système immunitaire. Dans certains cas, les cellules effectrices sont stimulées et améliorent l'efficacité de traitement en participant à la destruction tumorale. Dans d'autres cas, la réponse induite va être délétère et

l'activation des cellules immunes va participer aux phénomènes d'échecs thérapeutiques et de rechute.

De nombreuses études ont mis en évidence que les TAM pouvaient influencer l'efficacité de thérapies anti-cancéreuses et qu'ils pouvaient participer à la rechute en facilitant la croissance et la propagation des cellules tumorales après traitement. C'est pourquoi l'identification de ces cellules impliquées dans l'échec thérapeutique est nécessaire pour améliorer les traitements et permettre la mise en place de thérapies combinées qui ciblent la destruction de la tumeur et l'acteur principal de cet échec, comme les TAM.

Cibler les macrophages dans la tumeur pour améliorer l'effet de différentes thérapies est au cœur de nombreuses études précliniques et cliniques. Les thérapies sont très variées car il existe de nombreuses fonctions qui peuvent être ciblées chez les macrophages. Le blocage du recrutement des macrophages dans la tumeur, la polarisation, le rétablissement des fonctions effectrices des macrophages sont un aperçu de la variété de cibles dans des modèles précliniques qui ont amélioré l'efficacité des thérapies cytotoxiques (**Tableau 3**) (Ruffell and Coussens, 2015).

Table 1. Macrophage Therapeutic Targeting				
Pathway	Target ^a	Efficacy in Murine Models	Clinical Compounds	Clinical Trials in Solid Tumors ^b
Recruitment	CD11b	radiation, chemotherapy	rovelizumab	
	CSF-1R	single agent (GBM, PDAC), chemotherapy, radiation, angiogenesis inhibitors	PLX3397, AMG820 IMC-CS4/LY3022855, RG7155/RO5509554	NCT01596751 (O); NCT01444404 (C); NCT01349036 (O); NCT01004861 (O); NCT01346358 (O); NCT02265536 (O); NCT01494688 (O); NCT02323191 (O)
	CCL2	single agent (metastasis, PDAC)	carlumab	NCT00992186 (C); NCT01204996 (C)
	Neuropilin-1	angiogenesis inhibitors	MNRP1685A	NCT00747734 (C); NCT00954642 (C)
	ANG2	single agent (mammary), chemotherapy, angiogenesis inhibitors	nesvacumab	NCT01271972 (O); NCT01688960 (O)
Polarization	IL-4	single agent (metastasis), chemotherapy, radiation	pascalizumab	
	IL4R α		dupilumab	
	IL-13	chemotherapy	lebrikizumab, tralokinumab, GSK679586,	
	Fc γ R	chemotherapy	rituximab (CD20), ibrutinib (BTK), R788 (Syk)	
Function	IL-6		clazakizumab, olokizumab, siltuximab, sirukumab	NCT00433446 (C); NCT00385827 (C) NCT00841191 (C)
	IL-6R		tocilizumab, sarilumab	
	TNF- α	mitogen-activated protein kinase inhibitors	adalimumab, certolizumab, etanercept, golimumab, infliximab	
Activation	CD40	single agent (PDAC), chemotherapy	CP-870,893	NCT00711191 (C); NCT01456585 (C) NCT02157831 (C); NCT01008527 (O) NCT02225002 (C); NCT00607048 (C) NCT01103635 (O)

O, ongoing; C, completed.

^aOnly targets with clinical compounds are listed.

^bData obtained from <https://clinicaltrials.gov>.

Tableau 3 : Thérapies anti-cancéreuses ciblant les macrophages par différentes voies.

De nombreuses thérapies peuvent cibler directement ou indirectement (effets secondaires) les macrophages. Elles visent à inhiber de différentes manières les macrophages par leur recrutement, leur polarisation, leurs fonctions ou leur activation. (Ruffell and Coussens, 2015)

Les effets secondaires des thérapies conventionnelles sur les phagocytes mononucléés

La chimiothérapie

La chimiothérapie peut être cytostatique et cibler le métabolisme cellulaire ou antinéoplasique et cibler directement les cellules en division. Même si le but est préférentiellement de détruire les cellules tumorales qui ont une forte activité métabolique et proliférative, leurs effets ne sont pas spécifiques et ont de nombreux effets secondaires en particulier sur l'ensemble du système immunitaire dont les monocytes et les macrophages. Contre toutes attentes, certains de ces effets secondaires ont révélé des effets bénéfiques sur l'efficacité thérapeutique.

Certaines chimiothérapies, comme la doxorubicine, peuvent rendre la tumeur immunogène et ainsi permettre de développer une réponse anti-tumorale adaptatrice. Par exemple, la libération d'ATP va conduire au recrutement de cellules myéloïdes qui vont devenir des cellules présentatrices d'antigène (APC) et induire une réponse adaptatrice efficace (Ma et al., 2013). Dans certains types de cancers, l'infiltration des macrophages dans la tumeur suite à une chimiothérapie est de bon pronostic, indiquant la capacité des certaines chimiothérapies à permettre le recrutement de macrophages anti-tumoraux et à la mise en place d'un environnement propice à la destruction de la tumeur (**Tableau 4**). Dans ce cas-là, le suivi longitudinal du phénotype des TAM peut être très important car si la croissance tumorale reprend, il n'est pas impossible que les cellules tumorales parviennent à modifier la polarisation de ces TAM.

En ce sens, d'autres effets secondaires ont en revanche une action plus délétère. Des études sur de longues durées après traitements chimiothérapeutiques semblent indiquer que le système immunitaire fini par développer des fonctions immunes pro-tumorales. Les TAM sont impliqués dans cette rechute. Il semblerait que les TAM soient capables de protéger directement les cellules tumorales après chimiothérapie, en particulier les cellules souches tumorales, grâce à la production d'IL-6 et de MFG-E8, un facteur de croissance impliqué dans la progression tumorale (Jinushi et al., 2011).

Les macrophages périvasculaires s'accumulent autour des vaisseaux après chimiothérapie où ils favorisent la revascularisation de la tumeur et la rechute. La déplétion spécifique du VEGFA dans les monocytes et les macrophages permet de retarder la rechute (Hughes et al., 2015).

Table 1 | High density of TAMs as a predictor of patient outcomes after chemotherapy for neoplasia

Study (year of publication)	Tumour type	Therapy	TAM markers	High TAM density	Outcome prediction
Farinha et al. ⁶⁸ (2005)	Follicular lymphoma	BP-VACOP followed by involved region radiation	CD68	>15 macrophages/HPF ($\times 1,000$)	Negatively correlated with DFS and OS (≤ 0.001)
Taskinen et al. ⁷⁰ (2007)	Follicular lymphoma	CHOP	CD68	Highest decile	Negative correlated with DFS ($P = 0.026$)
		CHOP + rituximab	CD68	Highest tertile	Positively correlated with DFS ($P = 0.006$)
Steidl et al. ⁶⁶ (2010)	Classic Hodgkin lymphoma	ABVD*	CD68	>25–50% positive cells	Negatively correlated with DSS ($P = 0.003$)
E2496 Intergroup trial; Tan et al. ⁶⁷ (2012)	Classic Hodgkin lymphoma (locally advanced and advanced stage)	ABVD	CD68	>12.7% of positive pixels	Negatively correlated with DFS and OS (both $P < 0.01$)
			CD163	>16.8% of positive pixels	Negatively correlated with DFS ($P = 0.03$) and OS ($P = 0.04$)
		Stanford V	CD68	>12.7% of positive pixels	Negatively correlated with DFS ($P < 0.01$) and OS ($P = 0.02$)
			CD163	>16.8% of positive pixels	Negatively correlated with DFS and OS (both $P < 0.01$)
Kridel et al. ⁷¹ (2015)	Follicular lymphoma	CVP + rituximab	CD163	>3.97% of positive pixels	Negatively correlated with DFS ($P = 0.004$)
		CHOP + rituximab	CD163	>0.16% of positive pixels	Positively correlated with DFS ($P = 0.01$ training, $P = 0.03$ validation)
Algars et al. ⁵⁵ (2012)	Colorectal cancer (stage III)	Unspecified [†]	CLEVER-1/ stabilin-1 [‡]	>10 peritumoral/ $0.0625 \text{ mm}^2 (\times 400)$	Positively correlated with DSS ($P = 0.05$)
			CD68	>30 peritumoral/ $0.0625 \text{ mm}^2 (\times 400)$	Positively correlated with DSS on univariate analysis, but not significantly ($P = 0.09$)
Di Caro et al. ⁴⁵ (2016)	Pancreatic cancer	No adjuvant chemotherapy	CD68	Highest quartile	Negatively correlated with DFS ($P = 0.02$)
		Gemcitabine-based adjuvant chemotherapy	CD68	Highest quartile	Positively correlated with DSS ($P = 0.05$)
Malesci et al. (unpublished data)	Colorectal cancer (stage III)	No adjuvant chemotherapy	CD68	>8% of cells in immune-reactive area (tumour border)	None
		5-FU-based adjuvant chemotherapy	CD68	>8% of cells in immune-reactive area (tumour border)	Positively correlated with DFS ($P < 0.001$)

5-FU, 5-fluorouracil; ABVD, doxorubicin, bleomycin, vinblastine, and dacarbazine; BP-VACOP, bleomycin, cisplatin, etoposide, doxorubicin, cyclophosphamide, vincristine, and prednisone; CHOP, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone; CVP, cyclophosphamide, vincristine, and prednisone; CVPP, cyclophosphamide, vinblastine, procarbazine, and prednisone; DFS, disease-free survival; DSS, disease-specific survival; GDP, gemcitabine, dexamethasone, and cisplatin; HPF, high-power field; OS, overall survival; TAM, tumour-associated macrophage. *Or ABVD-like, with or without radiation therapy. Second-line therapy comprised autologous stem-cell transplantation, CVPP or GDP chemotherapy, and/or field radiation. [†]5-FU and folinic acid plus oxaliplatin (FOLFOX) adjuvant chemotherapy is the standard-of-care for stage III colorectal cancer. [‡]CLEVER-1 and stabilin-1 were used as a marker of alternatively activated M2 macrophages.

Tableau 4 : Rapport pronostique de la densité de TAM dans la tumeur après chimiothérapie chez les patients.

La densité de macrophages dans les tumeurs peut servir de facteurs prédictifs pour évaluer la réponse à une chimiothérapie. En revanche, en fonction du type de cancer et de la thérapie utilisée, le pronostique peut être positif ou négatif. (Mantovani et al., 2017)

La radiothérapie

De même que la chimiothérapie, la radiothérapie est susceptible d'entraîner une rechute chez les patients. Souvent, la radiothérapie est suivie par une infiltration massive de monocytes et de macrophages. Ces derniers sont connus pour avoir des capacités radiorésistantes, car ils produisent des molécules anti-oxydatives comme la manganèse superoxyde dismutase (MnSOD). La déplétion des macrophages chez la souris avec des liposomes de clodronate avant irradiation améliore l'efficacité de la radiothérapie (Meng et al., 2010). Chez la souris,

l'arrivée de monocytes dans la tumeur après radiothérapie induit une réponse profibrotique et peut promouvoir la rechute tumorale (Xu et al., 2013). Le traitement des tumeurs avec de fortes doses de rayons X induit l'apparition de zones hypoxiques favorisant les fonctions immunosuppressives des macrophages (Chiang et al., 2012). Les doses d'irradiation utilisées peuvent avoir différents effets sur les TAM. Par exemple, des doses modérées (entre 1 et 10Gy) sont capables de reprogrammer les TAM vers des fonctions anti-tumorales par l'activation des voies telles que NFκB et STAT1 ou la production de NO. En revanche, des irradiations à fortes doses induisent une modification de la polarisation des TAM vers des fonctions pro-tumorales comme la production d'IL-10. Dans un modèle murin de cancer de la prostate, ces fortes doses de radiothérapie induisent l'angiogenèse et la croissance tumorale (Tsai et al., 2007).

Les anticorps monoclonaux associés aux macrophages pour détruire la tumeur

Les anticorps monoclonaux ont été découverts dans les années 1970 durant une étude sur les myélomes où les lymphocytes B altérés produisaient de grandes quantités d'anticorps identiques. Georges Köhler et César Milstein ont mis au point une technique permettant la production de ces anticorps qui leur a valu un prix Nobel en 1984. Depuis, la qualité de ces anticorps s'est beaucoup améliorée pour optimiser la reconnaissance de l'antigène et humaniser ou supprimer leurs parties constantes. Les thérapies utilisant des anticorps monoclonaux sont souvent utilisées en combinaison avec des agents chimiothérapeutiques. Il existe maintenant des anticorps visant directement des molécules exprimées ou produites par les macrophages.

L'inhibition thérapeutique du CSF-1 réduit le recrutement de macrophages chez des souris portant des xénogreffes de tumeurs humaines (Abraham et al., 2010). L'association d'un

anticorps neutralisant le CSF-1 avec une chimiothérapie combinée (CMF: cyclophosphamide, methotrexate, 5-fluorouracil) dans un modèle murin de xénogreffe de tumeur mammaire humaine a été testée. Elle permet d'améliorer l'efficacité thérapeutique en augmentant la sensibilité des cellules tumorales à la chimiothérapie car elles diminuent leur expression de nombreux gènes associés à la chimiorésistance (*BRCP (breast cancer-related protein)*, *MDR1 (multi drug resistance gene 1)*, *GCS (glucosylceramide synthase)*) et en réduisant l'angiogenèse et le recrutement de macrophages (Paulus et al., 2006). Dans un modèle de cancer du pancréas traité avec de la gemcitabine, une chimiothérapie antimétabolique, l'administration d'anticorps anti-CSF-1 ou anti-CSF-1R permet d'inhiber la survie des TAM. La combinaison avec un inhibiteur du CCR2, diminuant le recrutement des TAM et des monocytes permet de lever l'immunosuppression et d'augmenter la réponse à la chimiothérapie (Mitchem et al., 2013).

Des thérapies inhibant la voie CD47-SIRP α ont été développées grâce à des anticorps monoclonaux dirigés contre CD47. Leur utilisation conduit à une augmentation de la phagocytose et réduit fortement la croissance de différentes tumeurs comme cela a été démontré *in vitro* et dans des modèles de souris humanisées (Chao et al., 2012) (**Figure 16**).

Les macrophages peuvent tuer les cellules tumorales via l'ADCC. Avec l'utilisation des anticorps monoclonaux, une fonction dérivée des macrophages a été étudiée. En effet, de nombreuses thérapies ciblées sont capables d'induire des effets secondaires liés à l'activation de cellules immunes. Il apparaît que les macrophages sont très importants pour améliorer l'efficacité de nombreux anticorps dirigés contre des molécules telles que CD38, CD20 ou HER2, grâce à la phagocytose cellulaire dépendante des anticorps (ADCP) (Weiskopf and Weissman, 2015) (**Figure 16**). Des anticorps ont même été spécifiquement modifiés pour améliorer la réponse des macrophages comme cela a été fait avec un Ac anti-CD20, approuvé

dans le traitement des leucémies lymphoïdes chronique (LLC) (Herter et al., 2014). De même, des anticorps bispécifiques ont été développés dans le but de se lier à un antigène tumoral et à un récepteur macrophagique simultanément. Par exemple, un anticorps ciblant HER2 et le FC γ RIIIa a été l'objet d'une étude clinique chez des patients atteints d'un adénocarcinome HER2⁺. Une efficacité a été observée mais le développement d'un choc cytokinique (cytokine storm) suivant l'administration de faibles doses a stoppé l'avancé de l'étude (Weiner et al., 1995). Depuis, de nombreux autres essais ont été réalisés avec de nouveaux anticorps bispécifiques. Si ces études n'ont pour le moment pas été concluantes, ce secteur de recherche reste très prometteur.

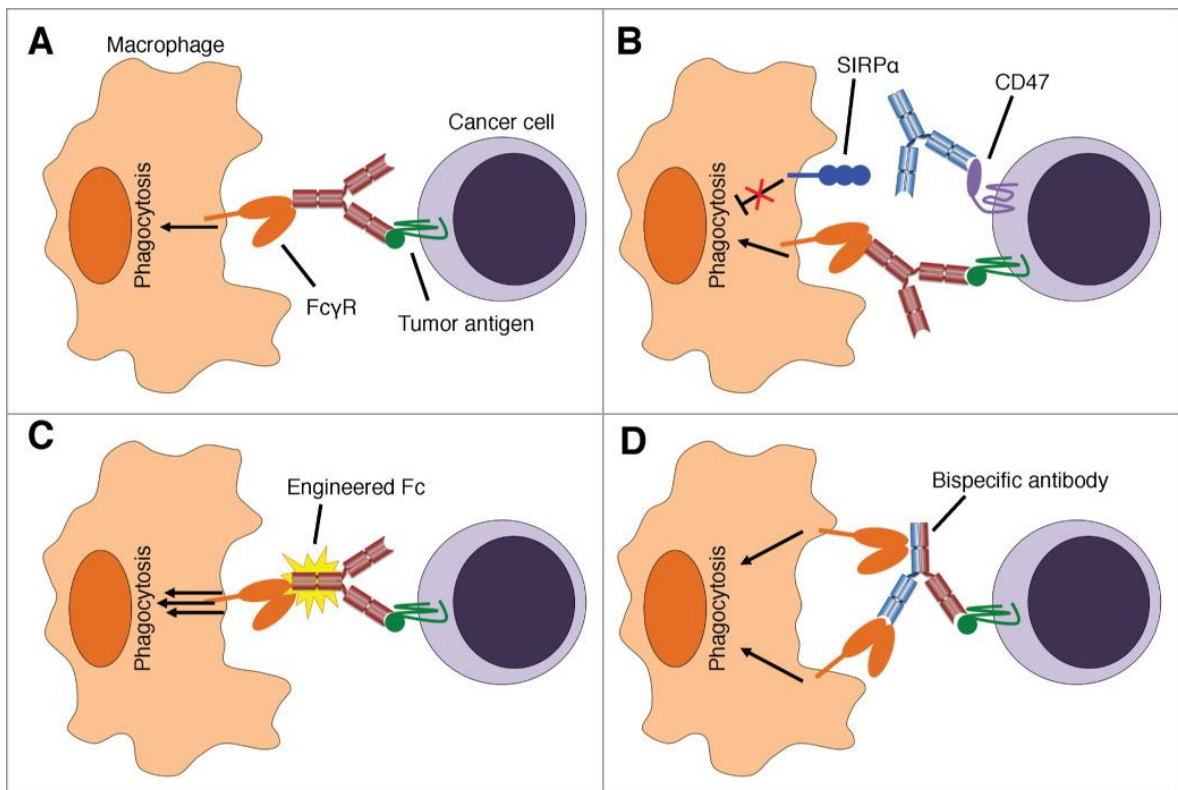


Figure 16 : Action des anticorps monoclonaux (mAc) sur l'activité cytotoxique des macrophages sur les cellules tumorales.

A. Les mAc stimulent l'activité phagocytaire des macrophages via leur fixation aux récepteurs Fc γ . **B.** Les interactions entre SIRP α et CD47 inhibent la phagocytose via les mAc. Le blocage de CD47 permet ainsi de lever cette inhibition et améliorer l'efficacité des mAc. **C.** Des anticorps avec un fragment Fc modifié permettent d'améliorer l'activation des macrophages. **D.** L'utilisation d'Ac bispécifiques permet de cibler à la fois les macrophages et les cellules tumorales. Ils activent les macrophages directement et spécifiquement contre les cellules tumorales et augmentent leur activité en induisant une troisième liaison via les récepteurs Fc. (Weiskopf and Weissman, 2015)

Les couples CCL2/CCR2 et CX3CL1/CX3CR1 comme cibles des thérapies anti-tumorales

CCL2/CCR2

Le CCL2 est produit par de nombreux types de cancers et est associé avec un mauvais pronostic dans les cancers du sein, du colon et de la thyroïde (Bailey et al., 2007) ; (Saji et al., 2001) ; (Tanaka et al., 2009). Une augmentation du niveau de CCL2 dans la circulation sanguine et dans le microenvironnement tumoral corrèle avec la progression tumorale, l'agressivité et la rechute après thérapies dans ces cancers. Le CCL2 est modulé par la radiothérapie dans de nombreux modèles tumoraux. Sa production induit l'infiltration d'un nombre important de monocytes décrits comme pro-tumorigéniques. Dans les cancers ovariens, le niveau de CCL2 dans le sang corrèle avec le grade histologique et permet de différencier les kystes bénins des cas de cancers (Hefler et al., 1999). L'ensemble de ces informations suggère que le CCL2 peut servir de marqueur pronostique pour juger le développement des cancers et la réponse aux thérapies.

Les niveaux d'expression de CCL2 par les cellules tumorales corrèlent avec le recrutement de monocytes dans le TME. L'infiltration de macrophages augmente dans un modèle de mélanome murin exprimant CCL2 (Bottazzi et al., 1992). L'utilisation d'un siRNA spécifique du CCL2 ou d'un anticorps monoclonal (mAb) anti-CCL2 réduit le recrutement de monocytes et retarde la progression tumorale et l'apparition de métastases (Qian et al., 2011). L'hypoxie inhibe la production de CCL2 par les cellules tumorales et les macrophages, ce qui constitue un mécanisme de régulation négative permettant de contrôler le recrutement de ces cellules dans le tissu (Negus et al., 1998) ; (Bosco et al., 2004a).

L'axe CCL2/CCR2 est important dans l'implantation des métastases et a été impliqué dans les étapes précoces et tardives du développement des métastases (Lim et al., 2016). CCL2

participe au recrutement, à la prolifération et à la migration des cellules endothéliales. Le CCR2 exprimé par ces cellules leur permet d'être recrutées dans le microenvironnement métastatique (Salcedo et al., 2000). En plus des effets directs sur les cellules tumorales et les cellules endothéliales, le CCL2 recrute aussi divers types de cellules immunitaires comme les monocytes et les macrophages sur le site métastatique (Qian et al., 2011) ; (Mizutani et al., 2009). CCL2 est impliqué dans la différenciation et la polarisation des lymphocytes T et régule la polarisation des Th2 vers un phénotype plus immunosuppresseur de Treg (Luther and Cyster, 2001) ; (Gu et al., 2000).

Des études se sont basées sur le blocage de CCL2 ou CCR2 comme traitement anti-tumoral. L'utilisation d'antagonistes de cette chimiokine augmente l'efficacité de la radiothérapie (Connolly et al., 2016). L'étude de Bonapace *et al.* a montré que dans plusieurs modèles de cancer mammaire chez la souris, la neutralisation du CCL2 inhibe les métastases en retenant les monocytes dans la moelle osseuse. En revanche l'interruption de l'inhibition du CCL2 conduit à une augmentation massive du nombre de métastase et à une mort plus rapide (Bonapace et al., 2014). L'axe CCR2/CCL2 a été démontré comme jouant un rôle crucial dans le processus métastatique, dans l'invasion et dans la migration. De plus, des évidences expérimentales dans des modèles de cancers précliniques indiquent que le CCL2 et le CCR2 sont des cibles attractives dans le traitement des métastases. Cependant, jusqu'à maintenant, les thérapies visant à inhiber cet axe chimiokinique ont eu des résultats décevants en clinique.

Le Carlumab est un anticorps monoclonal qui se lie au CCL2 et empêche la liaison au CCR2 (Obmolova et al., 2012). Cet anticorps a été testé seul ou en combinaison avec des thérapies standards. Il est bien toléré chez les patients avec peu d'effets secondaires. Après la première injection, le CCL2 est supprimé transitoirement. En revanche, après les injections suivantes, les niveaux de CCL2 dans le sang augmentent fortement et dépassent même les

concentrations observées avant le début du traitement (Sandhu et al., 2013). De plus, les patients traités n'ont pas eu de réponse anti-tumorale significative et visible cliniquement.

L'axe CCR2/CCL2 peut aussi être inhibé par le blocage de CCR2. L'anticorps humanisé MLN1202 a été testé en essai clinique de phase 2 dans les métastases des os issues de tumeurs primaires non spécifiées. De même que l'inhibition du CCL2, cet anticorps a été bien toléré chez les patients. Si les effets anti-tumoraux et sur la réponse immunitaire n'ont pas été divulgués, il apparaît que le MLN1202 a été testé cliniquement dans le traitement de l'athérosclérose et n'a eu qu'un effet modéré (Gilbert et al., 2011).

Malgré ces résultats décevants au point de vue thérapeutique, CCL2 ou CCR2 pourraient devenir d'importants biomarqueurs de l'évolution des tumeurs et de la réponse aux thérapies. S'il est connu comme agissant directement sur les monocytes et les macrophages, cet axe peut aussi cibler directement d'autres types cellulaires. J'ai d'ailleurs participé à une étude visant à démontrer un rôle additionnel du CCR2 dans le recrutement des Treg dans le TME. En effet, lors de la croissance tumorale, une population de Treg exprimant le CCR2 se développe dans le ganglion lymphatique drainant la tumeur (dLN) et va être mobilisée sur le site tumoral de façon dépendante du CCR2. Ces cellules ont des fonctions immunosuppressives dans le dLN et sont particulièrement sensibles à de faibles doses d'un agent chimiothérapeutique, le cyclophosphamide (Loyher et al., 2016).

CX3CL1/CX3CR1

Le rôle de CX3CR1 dans le développement tumoral est encore mal connu. Les principaux résultats proviennent des études sur le cancer du cerveau, où CX3CL1 est exprimé constitutivement. CX3CR1 et CX3CL1 sont tous les deux exprimés dans les gliomes où ils inhibent l'invasion des cellules tumorales en accentuant leur agrégation. L'inhibition de CX3CL1 par le TGF- β contribue à l'invasion des cellules gliomales (Sciume et al., 2010). En revanche, de fortes expressions de CX3CL1 sont présentes à des stades avancés de cancers et

associées à une faible survie chez les patients atteints de glioblastomes ou d'oligodendrogliomes (Erreni et al., 2010).

CX3CL1 promeut le développement du cancer du sein via l'activation des facteurs de croissance de l'épiderme (EGF) (Tardaguila et al., 2013). Une autre étude a montré que l'absence de CX3CR1 dans le microenvironnement des tumeurs du colon diminue le développement de métastases dans le foie. Ces résultats sont liés à la diminution du nombre de macrophages angiogéniques dû à une augmentation de l'apoptose dans le microenvironnement. Ainsi, la diminution de l'angiogenèse dans la tumeur inhibe les métastases tumorales (Zheng et al., 2013a). CX3CR1 semble donc impliqué dans la survie des macrophages au sein de la tumeur primaire et des métastases.

La présence de CX3CL1 dans les cancers colorectaux corrèle avec le recrutement de lymphocytes et augmente le taux de survie des patients (Ohta et al., 2005). L'injection en sous-cutané à des souris de lignées tumorales transfectées pour qu'elles produisent du CX3CL1 conduit à une diminution de la croissance tumorale par rapport aux lignées non transfectées. Cet effet du CX3CL1 est dû non pas aux macrophages, mais aux cellules NK qui expriment aussi le récepteur CX3CR1. Les lignées tumorales produisant du CX3CL1 induisent une meilleure infiltration des NK, ce qui indique qu'il ne faut négliger aucune des cellules exprimant le récepteur CX3CR1 et que ce dernier peut mobiliser des cellules ayant plutôt des fonctions anti-tumorales (Lavergne et al., 2003).

Des interactions croisées ont été étudiées entre les macrophages et des cellules du carcinome pulmonaire de Lewis (LLC) via le CCR2 et le CX3CR1. Les co-cultures de ces deux types cellulaires et l'utilisation de souris déficientes pour ces récepteurs de chimiokines ont montré une augmentation de l'expression de CX3CR1 et CCR2 ainsi que de leurs ligands respectifs

CX3CL1 et CCL2 par les cellules tumorales et par les macrophages, ce qui augmente la prolifération et la migration des cellules tumorales et polarise les macrophages vers un phénotype immunosuppresseur (Schmall et al., 2015).

Dans l'ensemble, peu d'éléments nous informent sur le rôle réel du CX3CR1 dans le développement tumoral. Ce manque de connaissance explique que peu de traitements anticancéreux ciblant CX3CR1 ont été testés. Ce récepteur étant déjà impliqué dans la survie et le recrutement des macrophages et des monocytes, il représente une cible intéressante contre les TAM et contre leur rôle dans l'angiogenèse et les métastases. Quelques études ouvrent tout de même des voies vers des traitements anti-tumoraux.

L'injection intratumorale d'un plasmide codant pour une immunoglobuline présentant le domaine chimiokinique de CX3CL1 induit une forte réponse anti-tumorale en partie liée aux cellules NK (Lavergne et al., 2003). De plus, la combinaison de ce plasmide CX3CL1-Ig à des antigènes viraux ou tumoraux comme stratégie de vaccination, injectée en intra-tumoral dans un modèle murin de tumeurs sous-cutanées induit une forte prolifération des lymphocytes T spécifiques de l'antigène et l'acquisition de fonctions effectrices efficaces pour protéger contre une nouvelle injection de cellules tumorales. L'expression de CX3CL1-Ig dans la tumeur permet l'activation de lymphocytes T par des DC d'origine myéloïde qui sont recrutées dans le ganglion lymphatique drainant la tumeur (Iga et al., 2007).

Il est maintenant avéré que la lutte contre le cancer ne se limite plus à cibler uniquement les cellules tumorales mais aussi l'ensemble du microenvironnement dont les cellules immunitaires. Les immunothérapies sont donc de plus en plus développées car elles permettent de rééduquer le système immunitaire ou de contrer les cellules immunosuppressives tout en essayant de limiter les effets secondaires considérables que peuvent provoquer certains traitements anticancéreux.

OBJECTIFS DE LA THESE

Les monocytes et les macrophages sont des protagonistes clés de la réponse inflammatoire. Les grandes questions qui sont à l'origine de mon travail de recherche portent sur l'existence et la caractérisation de monocytes tissulaires. Leur implication dans l'immunosurveillance et dans les processus inflammatoires ainsi que les fonctions liées aux origines des macrophages associés aux tumeurs ont été peu étudiées. Ainsi, les mécanismes régulant la mobilisation de ces phagocytes mononucléés doivent être connus pour pouvoir proposer des solutions thérapeutiques aux nombreuses pathologies inflammatoires qui les impliquent.

Ma thèse s'oriente autour de l'étude de la dynamique des phagocytes mononucléés en conditions physiologiques et lors de la réponse inflammatoire, que ce soit dans le cadre d'une réponse inflammatoire aiguë (modèle de péritonite) ou chronique (modèle de développement cancéreux).

Nos objectifs ont été de comprendre d'une part dans quelle mesure les monocytes participent à la réponse inflammatoire sans se différencier en macrophages et comment les axes chimiokiniques CCL2/CCR2 et CX3CL1/CX3CR1 interviennent dans leur mobilisation. Ainsi, nous avons voulu déterminer s'il est possible d'améliorer l'efficacité des réponses engagées à travers ces axes de recrutement.

D'autre part, nous avons aussi cherché à démontrer l'implication respective des macrophages résidents du poumon et des macrophages dérivés des monocytes dans le développement des métastases pulmonaires et dans la réponse aux thérapies anti-cancéreuses.

RESULTATS

Travaux principaux

Article 1

“Tracking mouse bone marrow monocytes *in vivo*” J Vis Exp 2015.

Article 2

“CX3CR1-dependant endothelial margination modulates Ly6C^{high} monocyte systemic deployment upon inflammation in mice” Blood 2017.

Article 3

“Implication of resident and recruited macrophages in lung metastasis development and response to cancer therapies” Manuscrit soumis et en révision.

Article 1 : “Tracking mouse bone marrow monocytes *in vivo*”

Pauline Hamon, Mathieu P Rodero, Christophe Combadière, Alexandre Boissonnas

J Vis Exp 2015

Contexte de l'étude

La moelle osseuse est responsable de l'hématopoïèse, nécessaire à la production des cellules du système immunitaire. C'est ici que sont principalement produites les cellules myéloïdes dont font parti les monocytes. La moelle osseuse participe au renouvellement continu des monocytes circulants qui sont des cellules non-prolifératives à courte durée de vie. En condition physiologique, les monocytes présents dans le système sanguin peuvent pénétrer dans les tissus et renouveler les macrophages et les cellules dendritiques ou être stockés brièvement dans la rate. En condition inflammatoire, la moelle osseuse et la rate libèrent de nombreux monocytes pour qu'ils soient recrutés dans les tissus. Dans tous les cas, la sortie des monocytes de la moelle osseuse est régulée par des axes chimiokiniques spécifiques. L'étude de la dynamique des niches médullaires et leurs interactions continues avec les sinusoides est nécessaire pour mieux appréhender les processus de mobilisation et de libération des monocytes.

L'imagerie intravitale en temps réel par microscopie biphotonique permet d'observer la mobilité cellulaire dans un tissu sans l'endommager et pendant de longues durées. Contrairement à l'étude sur du tissu explanté, l'imagerie intravitale permet de conserver les circulations sanguine et lymphatique stables. De plus, la microscopie biphotonique permet de réaliser des reconstitutions en trois dimensions conduisant à un suivi des cellules dans le temps et dans l'espace. La combinaison avec des souris transgéniques exprimant des rapporteurs de fluorescence facilite ce genre d'étude. Ainsi, il est possible de suivre pendant

plusieurs heures la mobilité des cellules en condition physiologique ou lors d'une réponse inflammatoire.

C'est pourquoi nous avons optimisé un protocole qui consiste à imager la moelle osseuse présente dans le crâne de souris sans avoir à abimer l'os. Cette zone large est facile d'accès et simple à exposer car elle est juste recouverte de peau. Cela nous permet d'observer la mobilité des monocytes dans le parenchyme et dans les sinusoides de la moelle osseuse.

Principaux résultats

Les monocytes ont une dynamique différente dans le parenchyme médullaire et dans les sinusoides

La souris transgénique appelée MacBlue exprime un transgène composé d'éléments du promoteur du CSF-1R placé devant le gène du facteur de transcription gal4-VP16. Une fois exprimé, ce dernier va activer l'expression du marqueur de fluorescence ECFP ce qui conduit à l'expression de cette protéine par toutes les cellules monocytaires. Cette souris permet le suivi des monocytes dans la moelle osseuse. L'injection de Rhodamine-Dextran en intraveineux marque tous les vaisseaux et permet la distinction entre le parenchyme et les sinusoides. Enfin, la génération de seconde harmonique (SHG) met en évidence des structures particulières telles que le collagène qui délimite la moelle osseuse (Figure 1).

Nous avons ainsi observé la répartition des monocytes entre le parenchyme et les sinusoides et quantifié leur dynamique spécifique. Il apparaît que la vitesse de déplacement et l'éloignement des monocytes par rapport à leur point d'origine sont plus importants quand les monocytes sont présents dans le système vasculaire par rapport aux monocytes du parenchyme (Figure 2).

Les paramètres de l'imagerie intravitale permettent le suivi de différentes populations cellulaires en temps réel

Il est possible d'optimiser les paramètres de suivi des cellules dans le tissu en fonction de leur localisation et de leur vitesse moyenne de déplacement. Un monocyte qui roule le long des parois vasculaires va nécessiter une prise d'image plus rapprochée car il se déplace plus vite et peut être rapidement perdu si le temps entre chaque image est trop long. Ici, nous avons montré la différence entre une acquisition toutes les 30s et toutes les 10s et la qualité de suivi que l'on apporte pour des cellules qui se déplacent rapidement (Figure 3). En revanche, pour des cellules à faible mobilité comme les cellules du parenchyme, il est possible de plus espacer le temps entre chaque prise d'images ce qui permet de réaliser un film de plus haute résolution graphique.

Enfin, nous avons montré la possibilité d'associer à l'imagerie des souris transgéniques un marquage spécifique *in vivo*. Nous avons réalisé une injection intraveineuse d'un anticorps anti-Ly6G couplé à un fluorochrome (PE) spécifique des neutrophiles (Figure 4). Cette approche permet de comparer la mobilité de différents types cellulaires.

Conclusion et perspectives

Cette technique d'imagerie permet de réaliser le suivi de cellules dans différents compartiments cellulaires de façon stable dans la durée. Une bonne préparation de la souris avant l'imagerie est nécessaire pour accéder à une grande surface de moelle osseuse et éviter les risques de dérive de l'image durant l'acquisition.

Cette étude a permis de montrer la difficulté liée à l'optimisation de la vitesse d'acquisition de chaque image et de la résolution graphique. Il faut parfois faire des compromis pour pouvoir suivre sur des temps plus courts la mobilité de cellules qui se déplacent à des vitesses élevées.

La technique d'imagerie intravitale est aussi un bon moyen pour étudier la localisation et l'activité de populations cellulaires sur du tissu vivant non fixé en comparaison à l'histologie. Cependant, le champ d'analyse est beaucoup plus restreint. Il reste limité à la périphérie des tissus et implique des temps d'acquisition beaucoup plus long ce qui peut entraîner un biais dans l'interprétation par rapport aux différentes niches tissulaires. Par contre, en plus de la difficulté de préparation des échantillons, l'analyse histologique ne conduit qu'à une observation statique du tissu. Notre protocole permet de mettre en évidence les échanges entre les différents compartiments et ouvre des perspectives pour des études de modèles pathologiques en combinaison avec des souris invalidées pour des molécules impliquées dans la mobilisation cellulaire, comme nous allons le présenter dans l'article suivant.

Video Article

Tracking Mouse Bone Marrow Monocytes *In Vivo*

Pauline Hamon¹, Mathieu Paul Rodero¹, Christophe Combadière¹, Alexandre Boissonnas¹¹Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI), INSERM, U1135, CNRS, ERL 8255, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, CR7Correspondence to: Alexandre Boissonnas at alexandre.boissonnas@upmc.frURL: <http://www.jove.com/video/52476>DOI: [doi:10.3791/52476](https://doi.org/10.3791/52476)

Keywords: Immunology, Issue 96, Immunology, hematology, Intravital imaging, bone marrow, monocytes, cell trafficking.

Date Published: 2/27/2015

Citation: Hamon, P., Rodero, M.P., Combadière, C., Boissonnas, A. Tracking Mouse Bone Marrow Monocytes *In Vivo*. *J. Vis. Exp.* (96), e52476, doi:10.3791/52476 (2015).

Abstract

Real time multiphoton imaging provides a great opportunity to study cell trafficking and cell-to-cell interactions in their physiological 3-dimensional environment. Biological activities of immune cells mainly rely on their motility capacities. Blood monocytes have short half-life in the bloodstream; they originate in the bone marrow and are constitutively released from it. In inflammatory condition, this process is enhanced, leading to blood monocytosis and subsequent infiltration of the peripheral inflammatory tissues. Identifying the biomechanical events controlling monocyte trafficking from the bone marrow towards the vascular network is an important step to understand monocyte physiopathological relevance. We performed *in vivo* time-lapse imaging by two-photon microscopy of the skull bone marrow of the *Csf1r-Gal4VP16/UAS-ECFP* (MacBlue) mouse. The MacBlue mouse expresses the fluorescent reporters enhanced cyan fluorescent protein (ECFP) under the control of a myeloid specific promoter¹, in combination with vascular network labelling. We describe how this approach enables the tracking of individual medullar monocytes in real time to further quantify the migratory behaviour within the bone marrow parenchyma and the vasculature, as well as cell-to-cell interactions. This approach provides novel insights into the biology of the bone marrow monocyte subsets and allows to further address how these cells can be influenced in specific pathological conditions.

Video Link

The video component of this article can be found at <http://www.jove.com/video/52476/>

Introduction

The bone marrow plays a central role in hematopoiesis and represents the main reservoir of monocytes that constitutively recirculate between the blood and the medullar parenchyma, renew the pool of circulating monocytes with a short life span^{2,3} and participate in the reconstitution of the steady state tissue-macrophages and dendritic cells⁴. During inflammation or after transient aplasia, monocytes are actively mobilized from either the bone marrow or the spleen^{5,6,7} and colonize inflamed organs. Several chemoattractant axis have been involved in the process of myeloid cell mobilization from the bone marrow^{8,5,6,9}. Beyond the myeloid compartment the bone marrow is also an important site of T lymphocyte priming¹⁰ and a niche of immunological memory^{11,12}. Thus, this tissue is central for numerous investigations in the field of hematology and immunology. Our knowledge on the structural organization of medullar myeloid cells mainly arises from the analysis of histological section of fixed tissues¹³. This static view does not allow for a study of the cellular exchange dynamic between the different compartments of the bone marrow, which is the basis of its functional activity.

Intravital imaging constitutes an important biological input in the study of cell mobility, cell adherence and cell-to-cell interactions, which were previously described only from *in vitro* systems. Technical challenges for proper intravital imaging include the ability to reach the tissue of interest in an optical point of view, and to maximize its isolation from physiological (breath, muscle or peristaltic contractions) or mechanical drifts (tissue disruption and extension following surgery, and exposure to microscope objective as well as temperature and vascular/oxygenation perturbations). Microscopic drifts may limit the ability to keep the focus a long time and could introduce artifacts in the quantification of cell motility. One alternative, validated for several tissues to reduce these technical difficulties, is to work on explanted tissue incubated in a thermostated and oxygenated medium; however, complete disruption of the lymphatic and vascular circulation may be problematic. Intravital imaging of skull bone marrow has several advantages concerning these issues. Firstly, it requires minimal surgical action. Secondly, thickness of the bone in this region allows direct visualization of bone marrow niches without abrasion, thus reducing physiological perturbations. The medullar network can be imaged in the parasagittal region of the bone; however the sinusoids are more visible in the fronto-parietal area where the bone matrix is thinner^{12,14}.

Intravital imaging relies on the availability of the most accurate fluorescent reporter tagging the population of interest. *In vitro* labelling of purified cell population before adoptive transfer led to important characterization of hematopoietic stem cell niches¹⁵ or bone marrow endothelial microdomains favouring tumor engraftment¹⁶, and provided several fundamental inputs on key concepts in immunology¹⁷. However, this approach usually requires hundreds of thousands of cells to get a chance to detect them afterwards *in vivo*. This could be explained by the high mortality rate following staining, the dilution in the whole body and the change in the activation state, which might lead to biased homing. Endogenous tagging from transgenic mouse system greatly overcomes these limitations and has allowed to image the behaviour of endogenous

osteoblast⁸, megakaryocytes¹⁸ or myeloid-lineage subsets⁶. Nevertheless, one has to be cautious when considering the specificity of the fluorescent reporter among the studied subset.

The *Csf1r*-Gal4VP16/UAS-ECFP, called MacBlue mouse¹, is a valuable transgenic system to study medullar monocytes with real time imaging⁶. Intravenous injection of high molecular weight rhodamin-dextran distinguishes the medullar parenchyma from the vascular sinusoid network of the bone marrow. Using this approach, it is possible to track the monocyte behaviour in the different medullar compartments in a specific physiopathological context of interest. Furthermore, we propose an additional strategy to compare monocyte dynamics with that of neutrophils through *in vivo* labelling using a specific antibody.

Protocol

NOTE: All experiment protocols were approved by the French Animal Experimentation and Ethics Committee and validated by the "Service Protection et Santé Animales, Environnement" with number A-75-2065. Sample sizes are chosen to ensure reproducibility of the experiments, and according to the 3R of animal ethic regulation.

1. Preparation of the Mouse

1. Anaesthesia
 1. For short period of imaging (less than 1 hr), anaesthetize the mouse with an intraperitoneal injection of 200 μ l of a saline solution containing Ketamine (100 mg/kg) and Xylazine (10 mg/kg).
 2. Alternatively, for longer period of imaging (up to 4 hr), anaesthetize the mouse with an inhalation of isoflurane 2.5% vaporized in a 70/30 mixture of O₂/N₂O, through an adapted mask.
 3. NOTE: This way provides for more stable unconsciousness and avoids serial intraperitoneal injection of drugs.
 4. Once the mouse is anesthetized, check for unconsciousness through stimulation of the foot pad with nippers.
2. Vascular staining/ additional staining
 1. For vascular staining: Inject intravenously in the tail vein, 200 μ l of Rhodamin-Dextran (2 MDa, 10 mg/ml in saline buffer).
 2. For neutrophil staining: inject 2 μ g of Ly6G-PE (clone 1A8) in 100 μ l of saline solution intravenously in the tail vein.
3. Immobilization
 1. For immobilization, use a custom made stereotactic holder adapted to the microscope and to the anaesthetic gas inhalator.
NOTE: The stereotactic holder is a metal support with two metal plate brackets, one being fixed and the other removable and adaptable, to tighten the animal's head.
 2. Install the head of the mouse between the retaining plates to ensure isolation from breathing movements. Tighten the ears between retaining plates and head to stretch the skin. Check for stability and breathing welfare of the animal.
4. Remove the scalp
 1. Carefully use ethanol 70% to wet the hair of the scalp with a sterile applicator, avoiding contact with the eyes.
 2. Cut the skin with sterile scissors and nippers to fully remove the scalp from the backward of the parietal bone to the frontal bone. Keep away up to 3 mm from eyes and ears to prevent extensive bleeding. Remove the loose connective tissue covering the skull (periosteum). Wash out remaining hair with warm PBS-soaked paper towel.
5. Immersion system set up
 1. Paste a rubber ring of 18mm diameter with surgical glue directly on the skull using a small gauge needle to control distribution. Glue the entire periphery of the rubber ring to prevent leakage (30 μ l should be sufficient).
 2. Clean the skull under the ring one last time with PBS-soaked paper towel and then add 37 °C PBS for complete immersion of the skull. Add a drop of NaCl 0.9% solution or specific ophthalmic ointment on each eye of the mouse to avoid eye dryness. Drag the stereotactic holder under the objective.
 3. Approximately position the field using the microscope ocular through direct transmission.

2. Two-photon Imaging Acquisition

1. Use a multiphoton microscope coupled with a Ti:Sapphire crystal laser, which provides 140fs pulses of NIR light, selectively tunable from 680 to 1,080 nm, and an acousto-optic modulator for laser power control. Use a configuration including 3 external non-descanned detectors (NDD) (that enable simultaneous recording of 3 fluorescent channels) with a combination of 2 dichroic mirrors (565 nm and 690 nm), 565/610 and 500/550 bandpass filters, and a 485 short pass filter, with a plan apochromat \times 20 (NA = 1) water immersion objective.
2. Set the heating chamber to allow good homeothermy of the anaesthetized mouse.,
NOTE: Temperature might be set 1 hr before imaging session for better stability. In our case, 32 °C has been chosen to get optimal body temperature of the anaesthetized mouse (36-37 °C) and is maintained up to 4 hr. This temperature may be adapted to the system used (digital probe can be used to check this point). In addition, the heating chamber used is dark/black and covers a part of the system (objectives and motorized plate) to avoid external light contamination.
3. Turn on the system
 1. Turn on the Ti:Sapphire laser, then the whole microscope system. Launch the acquisition software. Set the laser wavelength range to 870 nm. Select appropriate NDD for recording.

NOTE: In our case, second harmonic generation (SHG)¹⁹ and cyan fluorescent protein (ECFP) are detected by the NDD after the 485 short pass filter. ECFP is also detected by the NDD after the 500/550 bandpass filter and rhodamin-dextran is detected by the NDD after the 565/610 bandpass filter.

4. Adjust acquisition settings
 1. Use the “live acquisition” imaging command of the software and using the microscope directional control, adjust the focus on a region with ECFP and Rhodamine signal. Set the laser power to the minimum to obtain best signal-to-noise ratio with minimal photo-damage. NOTE: The power setting used varies according to the depth of the region of interest. Typically the AOM settings are set around 20%, which represents a laser power beyond the objective around 15 mW. It is better to increase gain power on the PMTs for each NDD to reduce photo-bleaching and photo-damage. Typical acquisition settings are single scanning with a pixel dwell time of 1.58 μ s, and a resolution of 512 x 512 pixels with a 1.5 magnification.
5. Select regions of interest
 1. Once recording parameters are set, use again the “live” acquisition command, and survey the tissue to choose a desired (x,y,z) field to be monitored in real time.
NOTE: Typically, we chose a field including both vascular and parenchymal areas.
 2. Register the field with the “position” software command.
NOTE: This command memorizes x,y,z coordinates of different distant fields.
 3. Select and register additional fields of interest (up to 3) using the same procedure.
 4. Set a 3D z-stack with the “z-stack” software command on the first memorized position according to the required volume with chosen magnification. Memorize deeper position first, and then the highest position. Normalize laser power with the depth.
NOTE: For multiple concomitant field imaging, we acquire 5 slices separated by 3 μ m z-steps for each field to acquire a volume of 12 μ m thickness. These settings might be adapted to the type of cell studied.
6. Launch acquisition
 1. Select the “time series” software command and choose the duration of time interval and the number of cycles. Begin time-lapse imaging according to the time lapse and duration required by selecting the “start experiment” software command.
NOTE: In our case, we acquire one volume each 30 sec during 60 cycles representing 30 min real time. Smaller time lapse can be performed to track fast cell rolling in the blood vessel. In this case thinner z-stack and no more than 2 different fields can be recorded at the same time.
 2. Regular monitoring of the set up.
 1. Always monitor the animal to make sure it is unconscious.
NOTE: Shaking of whiskers or legs of the animal are indicators of revival. In case the animal's breathing is jerky, the quantity of isoflurane can be slightly reduced. Strong tissue drift during acquisition is an indicator of mouse revival.
 2. Ensure the objective is properly immersed. Renew 37 °C PBS between two acquisitions (30 min).
NOTE: Progressive disappearance of signal during acquisition is indicator of PBS leakage.
7. End of procedure
 1. Once the required videos are recorded, euthanize the animal by cervical dislocation rapidly before resuscitation.
NOTE: wound healing leads to the formation of a scab in 24 to 48 hr which limits the possibility to perform longitudinal imaging.

3. Data Analysis

1. Drift correction
 1. Use Imaris Bitplane software for 3D automatic tracking.
 2. Open the 3D image sequence on Imaris. Select “spot” command, and generate manual tracking (mouse click+shift) for all time points for a minimum of 4 different anchor points, if possible homogeneously distributed in the field.
 3. Apply the drift correction using “correct drift” command in the “edit track” tab.
 4. Check for the quality of the correction in x, y and particularly in z to avoid artefactual wavering.
NOTE: If the correction is not satisfactory, try other anchor points or exclude the video from the analysis.
2. Cell tracking
 1. Use “add new spots” command and select “track spots over time” algorithm setting. Go to next step.
 2. Apply automatic cell tracking procedure either on the whole channel of interest using “source channel” command. Set objects (i.e., cells) diameter to 10 μ m. Go to next step.
NOTE: The choice will depend on the distinction between objects and specificity of the measured signal. In short, automatic tracking on the whole channel is possible only if detected signal is specific to the object of interest. Because both SHG and ECFP are detected by the NDD after the 485 short pass filter, tracking will be more specific and efficient using the ECFP signal recorded by the NDD after the 500/550 bandpass filters. Clustered or dense packed objects will require manual selection of individual objects similar to step 3.1.2.
 3. Select “quality” filter type, set the threshold to exclude tracking of unspecific objects. Go to next step.
 4. Choose “Brownian Algorithm Motion” with accurate parameters of “Max distance” and “Gap size” between two spots. Validate track generation.
 5. Once tracks are automatically calculated, select “track duration” filter type, set the threshold to eliminate tracks shorter than 120 sec (representing 4 time points).
 6. **Mandatory: After automatic tracking, check the quality of the tracks.**
 1. Unroll the time bar to check that the objects follow the track paths. If not, use the options of track point correction available in the “edit” tab: Delete false or improper tracks with “delete” command (delete any track point individually using “disconnect”

command). If track path is discontinuous, add missing time points (mouse click+shift), select all points on a given track, and use "connect" command in the "edit track" tab.

3. Quantification parameters

1. Select the "Statistic" tab in "Preferences" command, choose the dynamic parameters of interest in the list. Select "Export all statistics to file" command and save the excel file generated.

NOTE: Several dynamic parameters are directly obtained from the software such as track lengths, instantaneous velocity, mean velocity, and track straightness. Motility coefficient^{6,20} can be determined but is not directly provided by the software.

2. For each cell, calculate the mean of the displacements for each period of time (δt) (for a 30 sec time lapse movie, δt will be 30, 60, 90 sec, etc). Plot the mean of the square displacement as a function of the time interval. Obtain motility coefficient by calculating the slope of the linear part of the curve.

Representative Results

Mouse skull structure offers a good opportunity to study the bone marrow physiology by intravital imaging. The bone being thin around the frontoparietal area, it is possible to get access to medullar niches without abrasion of the bone. **Figure 1** represents a wide 2D field of the skull of a MacBlue transgenic mouse. The bone matrix is mainly composed of collagen I easily detectable by SHG¹⁹. Injection of rhodamin-dextran stains the vascular network of the bone marrow and allows for the identification of parenchymal bone marrow niches between the bone matrix and the vessels¹⁴. ECFP cells are distributed in the two compartments of the bone marrow, but are absent from the bone matrix. Monocytes are manually classified according to their location within the tissue. Vascular monocyte is defined when the whole cell is within the vasculature, disregarding the size of the vessel. Only big collecting venules are excluded from our analysis. Parenchymal monocyte is defined when the cell is located between the vasculature and the bone matrix.

Time-lapse imaging of specific region of interest (supplementary video 1 and 2) allows for the calculation of individual cell trajectory over time for either vascular (**Figure 2A**) or parenchymal (**Figure 2B**) monocytes. The track length shows that parenchymal monocytes display reduced displacement compared to vascular monocytes. Analysis of the displacement over time compares the mean velocity of monocytes in both compartments (**Figure 2C**). The mean square displacement as a function of time is a measure of the spatial extent of random motion. Motility coefficient is determined by the slope of the linear part of the curve and provides a better idea of the cell displacement (see discussion section). The motility coefficient of vascular monocytes ($MC=71\mu\text{m}^2/\text{s}$) is higher than the motility coefficient of parenchymal monocytes ($MC=4.4\mu\text{m}^2/\text{s}$).

The time resolution of acquisition must be adapted to the average cell velocity. Rolling vascular monocytes can make important displacement within a short time delay. For a more accurate cell tracking, reducing the time interval of acquisition is preferable. **Figure 3** shows an illustration of monocyte tracking with two different time-resolutions. A 30 sec time-interval reduces the accuracy as well as the length of the pathways (in green dashed line) compared to 10 sec time-interval.

Finally, **Figure 4** illustrates the possibility to analyze another cell subset concomitantly to monocytes. Ly6G is a specific marker of mature mouse neutrophils. The injection of anti-Ly6G combined with a fluorochrome (in this case Phyco-erythrin) 5 min before the imaging sequence stain neutrophils directly *in vivo*. This approach provides an additional dimension of analysis and the possibility to compare the behaviour of the different cell subsets. Such approach could be used to define subsets in the monocyte compartments.

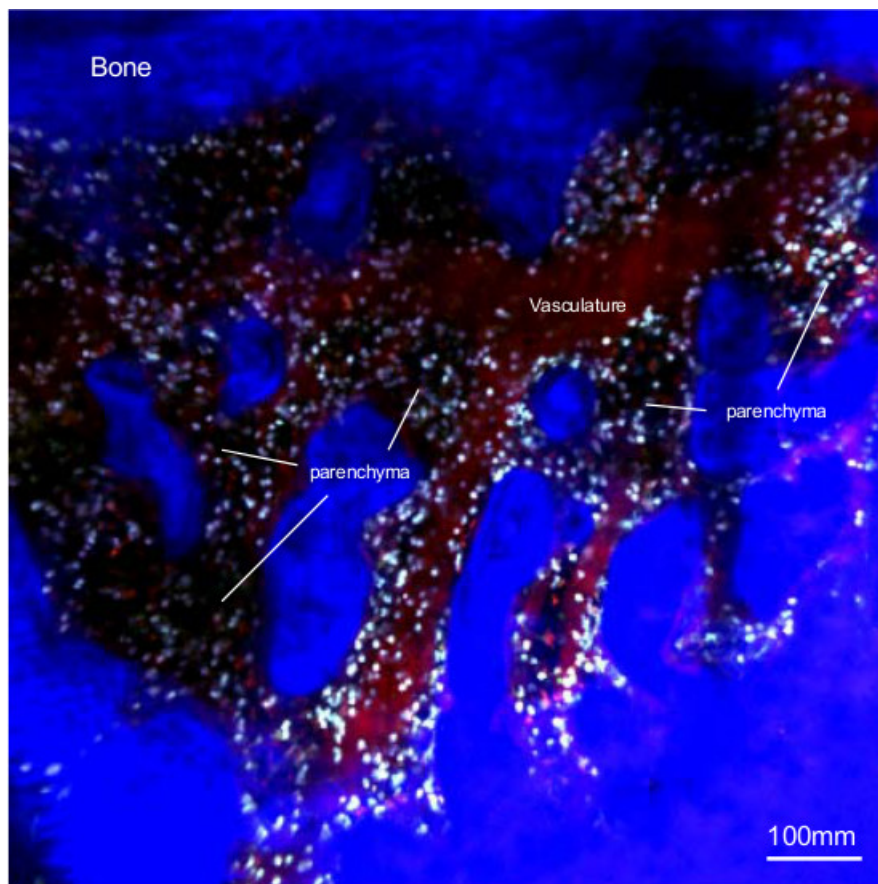


Figure 1. Wide field of skull bone marrow organization. *In vivo* two-photon laser scanning microscopy image of skull steady-state bone marrow from MacBlue mouse. Vasculature (in red) is stained by tail vein injection of 2MDa Rhodamin-Dextran 5 min before imaging session. The bone is visualized by second harmonic generation (blue). ECFP+ monocytes (Cyan) are located within parenchymal niches (dark areas between vasculature and bone) and within the vessels. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

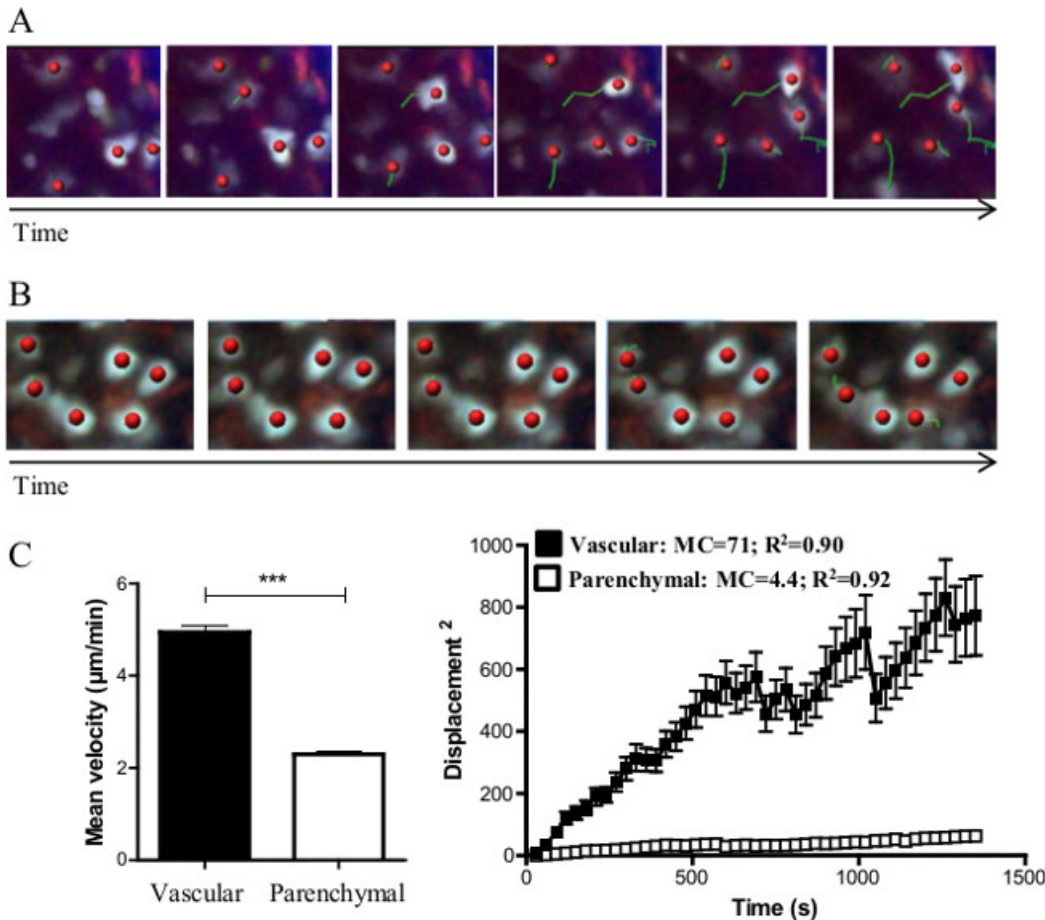


Figure 2. Real time cell tracking. Representative track paths along time of monocytes within (A) the vasculature and (B) the parenchyma. Tracks (green line) for each cell are automatically generated by the software. Red spots represent the centre of mass of tracked cells. (C) Mean velocity comparison between vascular and parenchymal monocytes. Mann-Whitney statistical analysis has been performed. *** represents $p < 0.001$. (D) Mean squared displacement (msd) as a function of time is represented for vascular and parenchymal monocytes. Asymptotic curve indicates the constrained displacement of the cells over time, whereas linear curve indicates random walk in a non-constrained environment. Motility coefficient indicates the extent of cell displacement and is determined by the slope of the curve calculated by linear regression. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

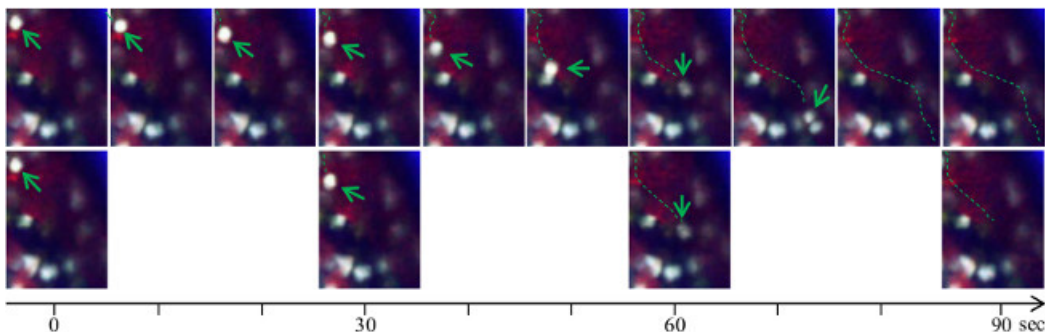


Figure 3. Time interval resolution in the study of rolling monocytes. Representative image sequences show that increased time resolution improves precision of the rolling cell trajectory. (Up) Image sequence with 10 sec time intervals. (Down) Image sequence with 30 sec time intervals. The quality of the track path is improved and the risk of considering two different cells for the same or the opposite is reduced. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

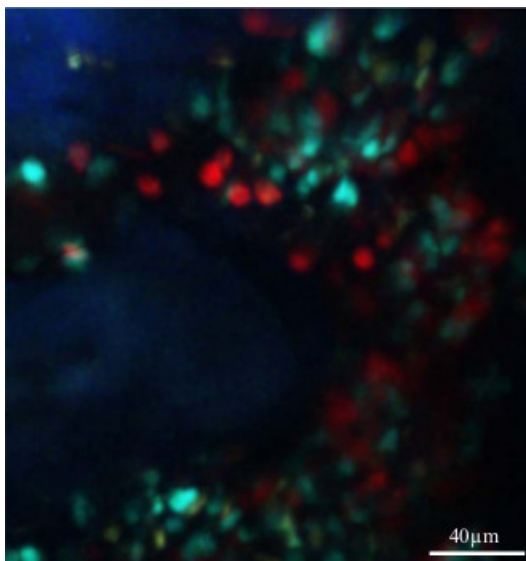


Figure 4. In vivo co-localization of medullar neutrophils and monocytes. This figure illustrates the possibility to detect another cell subset *in vivo* concomitantly with monocytes, by injecting specific monoclonal antibody combined with a fluorochrome. 2 μg of Ly6G-PE antibody has been injected intravenously 5 min before skull bone marrow imaging of the MacBlue mouse. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

Supplementary video 1. Migratory behavior of parenchymal monocytes. *In vivo* 3D-imaging of the steady-state migratory activity of monocytes in the skull bone marrow parenchyma of a MacBlue mouse. The ECFP⁺ signal is in cyan. Migratory paths for each cell (red dot) appear in green.

Supplementary video 2. Migratory behavior of vascular monocytes. *In vivo* 3D-imaging of the steady-state migratory activity of monocytes in the skull bone marrow vasculature of a MacBlue mouse. The ECFP⁺ signal is in cyan. (2M Da) rhodamine-dextran was injected before the imaging session to distinguish the bone marrow vasculature (red). Migratory paths for each cell (red dot) appear in green.

Discussion

The critical points of *in vivo* imaging methodology are to ensure stability of the focus in order to maximize the duration of imaging and to minimize the risk of bacterial contamination and inflammation, which might impact the dynamics of the inflammatory cells. Imaging of the skull bone marrow follows these aims as the surgery performed to get access to the bone marrow is minimal. The use of sterile material and antiseptics is essential to limit the risk of infection that might induce perturbation in cell homeostasis.

The development of the stereotactic holder might be challenging and requires specific customization for each system (distance between objective and motorized stage of the microscope, use of gas inhalator for anaesthesia). It is important to get the head of the mouse as horizontal as possible for a wider imaging surface access. Once the animal is positioned, it is likely that several minutes can be required to obtain good stability of the focal plane. Therefore, it is recommended to check for tissue drift before launching the acquisition recording. Because this process together with the selection of regions of interest can last a while, it is also recommended to regularly check that the animal is unconscious if Ketamin /Xylazin have been used, and to check for proper immersion of the objective as leakage and evaporation can occur.

The good positioning of the rubber ring on the skull represents another critical step in the process. Cyanoacrylate glue provides good results in terms of stability and sealing, but one needs to prevent excessive loading of glue, which could cover the skull and block access to the region of interest of the tissue. The advantage of direct immersion of the skull without a glass coverslip is to get access to deeper regions of the bone. In addition, since the skull is not a plain surface, this will not limit the imaging area to the contact surface between the skull and the coverslip, allowing a wide imaging field, as displayed in **Figure 1**.

For all imaging technologies, the choice between acquisition speed and resolution quality is a compromise. Thus, the number and the quality of images per unit of time are limited, and the choice depends on the scientific question addressed. Typically, vascular monocytes are fast rolling cells, whereas parenchymal monocytes are slow motile or sessile. An accurate tracking of rolling cells requires higher time resolution of acquisition, as shown in **Figure 2**. High imaging rate for sessile cells is useless and high x,y,z resolution can be preferred to analyze protrusive activity of dendrites for example. Fast cells would require thicker volume to get a longer tracking of their displacement in z.

The mean square displacement as a function of time is not provided by the software Imaris. The principle of this representation based on the fact that, for an object travelling ballistically without any encounter or structural constriction, the distance it travelled would be proportional to the time interval (**Figure 2D**). Thus linearity of the slope indicates a random walk in a non-constrained environment. In contrast, asymptotic shape of the curve would reflect a constrained displacement over time of the cell population. The second advantage of this calculation is that velocity is sometimes overestimated by artefactual displacement of the centre of mass. This is particularly important for slow motile cell with protrusive activity. Thus, calculation of the motility coefficient by the slope of the curve calculated by linear regression indicates a real displacement of the cell over time²¹.

Ly6G staining *in vivo* illustrates the possibility to add a new parameter of analysis during the imaging process (**Figure 3**). We have used this technique to stain vascular neutrophil infiltration into skin wound, and observed no defect in their mobility suggesting no functional alteration (Rodero *et al* in press). Although more than 98% of vascular neutrophils are properly labeled, the staining of bone marrow neutrophils is less efficient, and the mean fluorescence intensity is strongly reduced, suggesting reduced access of the antibody toward the bone marrow parenchyma (data not shown). Rhodamin dextran, quantum dots, or other specific dyes of apoptotic or necrotic cells such as Dapi, Propidium iodide, sytox²², or fluorescent reporter for cell functions such as production of reactive oxygen species²³, can be added intravenously through the tail vein during imaging process and offer a good opportunity to quantify functional properties such as cell death, phagocytosis and neutrophil extracellular trap. Mazo *et al*¹² nicely used two different vascular dyes with low and high molecular weight to better contrast parenchyma and vasculature. The choice of the fluorescent dye is critical to allow concomitant acquisition of the different fluorescent reporters. Indeed, the excitation wavelength will be chosen accordingly to get the best compromise between all used fluorescent dyes.

The protocol used herein makes it possible to analyze *in vivo* the biological activity of a cell compartment, study of which was difficult so far. Histological analysis of the bone marrow tissue usually requires a long preparation of bone decalcification to allow thin section, and it only provides a static view of the tissue. The dynamic view highlights the rate of cell exchange between the parenchyma and the bone marrow sinusoids. This rapid process is a crucial step to decipher in order to have a better understanding of cell mobilization mechanism upon inflammatory signal⁵ or preconditioning myeloablative chemotherapy regimen⁶. We have reported event of cell intravasation⁶ but this process is barely detectable due to the low frequency at steady state. However, it is likely to be enhanced upon inflammatory signaling. Chemokine receptors such as CCR2, CX3CR1 or CXCR4 are highly implicated in the process of intravasation, hence the use of genetic invalidation of these receptors should provide novel fundamental insights in the pathways of cell migration

Disclosures

The authors have nothing to disclose.

Acknowledgements

The authors wish to thank Anne Daron and Pierre Louis Loyher for editorial assistance, the Plateforme Imagerie Pitié-Salpêtrière (PICPS) for assistance with the two-photon microscope and the animal Facility "NAC" and Camille Baudesson for mice breeding assistance. The research leading to these results has received funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement n° 304810 – RAIDs, and n°241440-Endostem, from Inserm, from Université Pierre et Marie Curie "Emergence", from la "Ligue contre le cancer", from "Association pour la Recherche sur le Cancer" and from "Agence Nationale de la Recherche" Programme Emergence 2012 (ANR-EMMA-050). P.H. was supported by la "Ligue contre le cancer".

References

- Ovchinnikov, D. A., *et al*. Expression of Gal4-dependent transgenes in cells of the mononuclear phagocyte system labeled with enhanced cyan fluorescent protein using Csf1r-Gal4VP16/UAS-ECFP double-transgenic mice. *J Leukoc Biol.* **83**, 430-433 (2008).
- Parihar, A., Eubank, T. D., Doseff, A. I. Monocytes and macrophages regulate immunity through dynamic networks of survival and cell death. *J Innate Immun.* **2**, 204-215 (2010).
- Geissmann, F., Jung, S., Littman, D. R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity.* **19**, 71-82 (2003).
- Robbins, C. S., Swirski, F. K. The multiple roles of monocyte subsets in steady state and inflammation. *Cell Mol Life Sci.* **67**, 2685-2693 (2010).
- Shi, C., *et al*. Bone marrow mesenchymal stem and progenitor cells induce monocyte emigration in response to circulating toll-like receptor ligands. *Immunity.* **34**, 590-601 (2011).
- Jacquelin, S., *et al*. CX3CR1 reduces Ly6Chigh-monocyte motility within and release from the bone marrow after chemotherapy in mice. *Blood.* **122**, 674-683 (2013).
- Swirski, F. K., *et al*. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science.* **325**, 612-616 (2009).
- Germain, R. N., Miller, M. J., Dustin, M. L., Nussenzweig, M. C. Dynamic imaging of the immune system: progress, pitfalls and promise. *Nat Rev Immunol.* **6**, 497-507 (2006).
- Charo, I. F., Ransohoff, R. M. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med.* **354**, 610-621 (2006).
- Milo, I., *et al*. Dynamic imaging reveals promiscuous crosspresentation of blood-borne antigens to naive CD8+ T cells in the bone marrow. *Immunity.* **122**, 193-208 (2013).
- Cavanagh, L. L., *et al*. Activation of bone marrow-resident memory T cells by circulating, antigen-bearing dendritic cells. *Nat Immunol.* **6**, 1029-1037 (2005).
- Mazo, I. B., *et al*. Bone marrow is a major reservoir and site of recruitment for central memory CD8+ T cells. *Immunity.* **22**, 259-270 (2005).
- Travlos, G. S. Normal structure, function, and histology of the bone marrow. *Toxicol Pathol.* **34**, 548-565 (2006).
- Mazo, I. B., *et al*. Hematopoietic progenitor cell rolling in bone marrow microvessels: parallel contributions by endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule 1. *J Exp Med.* **188**, 465-474 (1998).
- Rashidi, N. M., *et al*. In vivo time-lapse imaging of mouse bone marrow reveals differential niche engagement by quiescent and naturally activated hematopoietic stem cells. *Blood.* (2014).
- Sipkins, D. A., *et al*. In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment. *Nature.* **435**, 969-973 (2005).
- Cariappa, A., *et al*. Perisinusoidal B cells in the bone marrow participate in T-independent responses to blood-borne microbes. *Immunity.* **23**, 397-407 (2005).
- Junt, T., *et al*. Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science.* **317**, 1767-1770 (2007).

19. Zoumi, A., Yeh, A., Tromberg, B. J. Imaging cells and extracellular matrix in vivo by using second-harmonic generation and two-photon excited fluorescence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**, 11014-11019 (2002).
20. Miller, M. J., Wei, S. H., Parker, I., Cahalan, M. D. Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node. *Science.* **296**, 1869-1873 (2002).
21. Cahalan, M. D., Parker, I. Choreography of cell motility and interaction dynamics imaged by two-photon microscopy in lymphoid organs. *Annu Rev Immunol.* **26**, 585-626 (2008).
22. Yost, C. C., *et al.* Impaired neutrophil extracellular trap (NET) formation: a novel innate immune deficiency of human neonates. *Blood.* **113**, 6419-6427 (2009).
23. Devi, S., *et al.* Multiphoton imaging reveals a new leukocyte recruitment paradigm in the glomerulus. *Nat Med.* **19**, 107-112 (2013).

Article 2 : “CX3CR1-dependant endothelial margination modulates Ly6C^{high} monocyte systemic deployment upon inflammation in mice”

Pauline Hamon, Pierre-Louis Loyher, Camille Baudesson de Chanville, Fabrice Licata, Christophe Combadière, Alexandre Boissonnas

Blood 2017

Contexte de l'étude

La mobilisation des monocytes est un élément clé dans la surveillance de l'organisme et dans l'initiation de la réponse inflammatoire. Dans les années 1980, van Furth avait émis l'hypothèse de la présence d'un compartiment de monocytes marginés qu'il a différencié des monocytes médullaires et des monocytes circulants car le nombre de monocytes produits par la moelle osseuse était beaucoup plus important que celui des monocytes présents dans le sang circulant (van Furth and Sluiter, 1986). Ces cellules marginées restent dans le réseau vasculaire par adhérence à l'endothélium et leurs rôles et leurs fonctions sont peu connus en raison de leur difficulté d'accès.

L'imagerie intravitale représente une opportunité unique pour analyser les différentes dynamiques monocytaires présentes dans les tissus et dans le réseau vasculaire. Elle a déjà été utilisée pour mettre en évidence la fonction de patrouilleur des monocytes Ly6C^{low} et leur implication dans la surveillance du réseau vasculaire en se déplaçant lentement dans la lumière des vaisseaux, le long des parois de l'endothélium de façon dépendante de LFA-1.

Dans cette étude, nous avons cherché à caractériser le compartiment de monocytes marginés grâce à l'imagerie intravitale et une technique de marquage *in vivo* des cellules présentes dans le réseau vasculaire. Puis, nous nous sommes intéressés à la mobilisation de ces cellules en

condition inflammatoire et nous avons caractérisé l'impact des axes chimiokines CCR2/CCL2 et CX3CR1/CX3CL1 dans la mobilisation des monocytes.

Principaux résultats

La margination des monocytes Ly6C^{high} et Ly6C^{low} dans le réseau vasculaire des tissus dépend de CCR2 et CX3CR1.

L'imagerie intravitale nous a permis de distinguer plusieurs dynamiques monocytaires dans le réseau vasculaire de la moelle osseuse en fonction de la force de l'adhérence de ces cellules aux parois vasculaires. Certains monocytes sont arrêtés dans la lumière du vaisseau avec une faible vitesse de déplacement (inférieure à 2µm/min), les monocytes en « crawling » ont une vitesse intermédiaire et ne sont pas contraints par le flux sanguin. Les cellules en « rolling » ont une vitesse élevée et un déplacement soumis au flux sanguin, que l'on distingue des cellules circulantes car elles sont impossibles à suivre sur plus d'un champ par imagerie intravitale. Les cellules arrêtées, en crawling ou en rolling sont des cellules en interactions avec l'endothélium vasculaire que nous avons qualifiées de marginées. Les invalidations génétiques de CCR2 et CX3CR1 chez les souris révèlent leur importance dans le contrôle de la margination en régulant respectivement la sortie du parenchyme et la force de l'adhérence des monocytes marginés aux parois vasculaires (Figures 1 et 2).

En parallèle, la technique de marquage *in vivo* des cellules, nommée « blood/tissue partitionning », a permis de distinguer les cellules présentes dans le réseau vasculaire d'un tissu de celles présentes dans le parenchyme. L'injection d'un anticorps anti-CD45 couplé à un marqueur fluorescent en intraveineuse à des souris 2min avant leur sacrifice permet de marquer exclusivement les cellules présentes dans tout le réseau sanguin. Ainsi, les monocytes marqués par l'Ac *in vivo* représentent 20% des monocytes présents dans le compartiment sanguin pour un seul os, ce qui permet d'envisager que les cellules marginées

sont beaucoup plus nombreuses que les cellules circulantes. La capacité des monocytes à résider dans les vaisseaux a été décrite par Auffray *et al.* et associée à un rôle de surveillance des endothéliums vasculaires. Nos résultats indiquent que les monocytes Ly6C^{high} sont capables de marginer dans les vaisseaux dans les mêmes proportions que les monocytes Ly6C^{low}. De plus, nous avons pu démontrer que dans certains organes comme le poumon, les monocytes marqués représentent plus de 90% des monocytes présents dans l'organe, ce qui ajoute une nouvelle dimension à l'étude des monocytes tissulaires et montre que les monocytes peuvent participer à la surveillance de ce tissu sans l'infiltrer (Figure 4).

Les monocytes marginés sont mobilisés rapidement en condition inflammatoire

Nous avons caractérisé la mobilisation des monocytes marginés dans un modèle d'inflammation stérile induite par de faibles doses de lipopolysaccharide (LPS) injectées en intrapéritonéal. Les monocytes marginés dans la moelle osseuse sont mobilisés dès la première heure après l'injection de LPS puis leur nombre augmente de nouveau jusqu'à 4h. Cette cinétique est similaire à celle observée dans le sang alors que dans le parenchyme de la moelle osseuse, le nombre de monocytes Ly6C^{high} diminue jusque 3h et augmente de nouveau à 4h (Figure 2). Ces résultats indiquent que les monocytes Ly6C^{high} circulants et marginés dans les sinusoides sont mobilisés très rapidement après l'initiation de l'inflammation. Cette mobilisation les conduit vers le réseau vasculaire du péritoine, site d'injection du LPS. Les monocytes vont adhérer et s'accumuler aux niveaux des parois vasculaires de la membrane péritonéale (Figure 4). De plus, une partie de ces monocytes infiltrent le tissu et sont retrouvés dans la cavité péritonéale. La mobilisation des monocytes Ly6C^{high} marginés a aussi été validé dans un modèle de septicémie polymicrobienne qui consiste à ligaturer et percer le caecum des souris (CLP) (Figure 6).

CX3CR1 contrôle la distribution des monocytes Ly6C^{high} pendant l'inflammation et leur adhérence aux parois des vaisseaux du site inflammatoire

Nous nous sommes interrogés sur le rôle des récepteurs de chimiokines dans la mobilisation des monocytes en condition inflammatoire. L'absence de CX3CR1 chez les souris modifie les proportions entre les cellules en crawling et en rolling vers une augmentation de monocytes en rolling dans les sinusoides de la moelle osseuse. Il apparaît aussi que le CX3CR1 est primordial pour la margination aux parois vasculaires de la membrane péritonéale. Chez les souris déficientes pour le CX3CR1, nous n'avons pas observé de margination dans les vaisseaux du péritoine pendant le processus inflammatoire. En revanche, il y a une accumulation de monocytes Ly6C^{high} dans la cavité péritonéale beaucoup plus importante que chez les souris WT (Figure 3). Pour valider ces résultats, nous avons utilisé une molécule développée au laboratoire appelée F1 qui se fixe sur le CX3CR1 et bloque l'adhérence des monocytes. L'injection de F1 empêche la margination des monocytes dans les vaisseaux de la membrane péritonéale (Figure 5). Dans le modèle de CLP, le traitement avec F1 bloque aussi la margination dans le tissu inflammé et modifie la distribution des monocytes Ly6C^{high} dans l'organisme (Figure 6).

Conclusion et perspectives

Cette étude a permis de confirmer et de caractériser la présence d'un compartiment de monocytes marginés qui comprend autant de monocytes Ly6C^{high} que de monocytes Ly6C^{low} et qui est dépendant des récepteurs de chimiokines CCR2 et CX3CR1. Ce compartiment représente un nombre de cellules marginées non négligeable, qui pourrait même être supérieur à celui des monocytes circulants. Cependant, les mécanismes de régulation de l'équilibre entre les compartiments parenchymateux, marginés et circulants sont encore peu connus. En condition inflammatoire, les monocytes marginés sont mobilisés avec les monocytes circulants et vont adhérer dans les vaisseaux du tissu inflammé. Ce résultat, combiné au

nombre très important de monocytes intravasculaires dans certains tissus comme le poumon, indique que les monocytes peuvent participer à la réponse inflammatoire ou à la surveillance des tissus sans engager de processus d'extravasation. Dans les deux modèles d'inflammation que nous avons utilisés, nous avons découvert que CX3CR1 était impliqué dans la rétention des monocytes Ly6C^{high} dans les vaisseaux. De même, une autre étude menée par notre équipe sur le modèle de CLP a démontré que l'adhésion des monocytes Ly6C^{high} dans les vaisseaux du rein avait un effet protecteur contre les lésions rénales. Nous avons observé une extravasation massive des monocytes Ly6C^{high} dans la cavité péritonéale chez les souris déficientes pour le CX3CR1. Un modèle de péritonite aiguë par injection de thioglycolate a permis de montrer que les interactions entre CX3CR1 et CX3CL1 ne sont pas fondamentales pour engager l'extravasation transendothéliale des monocytes dans la cavité péritonéale (Jung et al., 2000). Si l'adhérence aux vaisseaux et la rétention des monocytes sont dépendants de ce récepteur et que l'infiltration en est indépendante, nous ne connaissons pas encore les mécanismes responsables de cette extravasation.

IMMUNOBIOLOGY

CX3CR1-dependent endothelial margination modulates Ly6C^{high} monocyte systemic deployment upon inflammation in mice

Pauline Hamon, Pierre-Louis Loyher, Camille Baudesson de Chanville, Fabrice Licata, Christophe Combadière, and Alexandre Boissonnas

Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, INSERM UMR 1135, CNRS ERL8255, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses, Paris, France

Key Points

- Blood monocytes are distributed between a marginated and a circulating pool.
- CX3CR1 regulates inflammatory monocyte residence into the blood vasculature during inflammation.

Two subsets of blood monocytes are commonly described in mice and humans: the classical inflammatory monocytes, which are rapidly mobilized upon inflammation in a CC-chemokine receptor 2-dependent manner, and the nonclassical blood resident monocyte subset that patrols the intraluminal side of the endothelium. Old reports suggest that blood monocytes are distributed into circulating and marginating pools, but no direct evidence of the latter has been obtained so far. Using a combination of in vivo real-time imaging and blood/tissue partitioning by intravascular staining of leukocytes, we showed that both inflammatory and resident monocytes are retained in the bone marrow vasculature, representing an important reservoir of marginated monocytes. Upon lipopolysaccharide or cecal ligation and puncture-induced peritonitis, these marginated cells are rapidly released and recruited to the peritoneum membrane lumen vasculature where they reside through CX3C-chemokine receptor 1 (CX3CR1)-dependent adherence. At a later time point, inflammatory monocytes infiltrate the spleen parenchyma but remain

mainly intravascular in the vicinity of the lungs and the peritoneum. Our results show that this monocyte deployment is controlled by a CX3CR1-dependent balance between marginating and circulating monocytes and highlight that tissue infiltration is not a mandatory fate for inflammatory monocytes. (*Blood*. 2017;129(10):1296-1307)

Introduction

Monocytes (Mo) are circulating cells implicated in the steady-state immune surveillance and in the initiation of inflammation.¹ They derive from bone marrow (BM) precursors and constitutively egress toward the bloodstream, where they differentiate into 2 functional classes, in both mice and humans. In the mouse, circulating classical or inflammatory monocytes are short lived,² express high levels of Ly6C and the chemokine receptor, CCR2, but also express intermediate levels of the CX3C-chemokine receptor 1 (CX3CR1). Inflammatory monocytes are precursors of longer-lived patrolling monocytes that lack Ly6C and CCR2 but express higher CX3CR1.³ BM parenchyma and spleen are known to be the main reservoirs of monocytes,^{4,5} rapidly available upon inflammation. Monocyte mobilization from the BM is CCR2 dependent in the steady state as well as under inflammatory conditions.^{6,7} Beyond the role of CX3CR1 in Ly6C^{low}-Mo survival,⁸ the membrane-anchored form of the CX3CL1 provides a potent adhesion molecule^{9,10} that contributes to slowing down monocyte egress from the marrow during myeloablative recovery.¹¹

It has been suggested that monocytes are distributed between a circulating pool and a marginating pool,¹² the latter representing up to 60% of the peripheral reservoir and defined by cells in direct

interaction with the endothelium. The nature and function of marginated monocytes are not defined due to their poor accessibility. Furthermore, very little is known about the mechanism that governs this equilibrium. Intravital imaging approaches have brought experimental evidence of the presence of patrolling Ly6C^{low}-Mo¹ that crawls along the luminal side of the vessels in a CD11a-dependent manner and participates in steady-state immune surveillance. Upon inflammatory stimuli, Ly6C^{high}-Mo and Ly6C^{low}-Mo are recruited in large numbers to carry out specific effector functions.¹³ Lung microvasculature represents a major site for monocyte margination after lipopolysaccharide (LPS) stimulation and during sepsis.¹⁴⁻¹⁶ The spleen represents another major source of monocytes. Direct visualization of the splenic monocyte reservoir was assessed, and the subcapsular red pulp identified was as their main site of residence.⁴

Herein, we used intravital imaging approach and in vivo intravascular leukocyte staining to identify and characterize the behavior of the marginating pool of monocytes in different vascular niches, in steady state and in the course of peritonitis. Our results indicate a key role of CX3CR1 in the equilibrium between vascular retention and extravasation of blood monocytes and thus in the regulation of monocyte deployment toward the periphery.

Submitted 4 August 2016; accepted 16 December 2016. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, 23 December 2016; DOI 10.1182/blood-2016-08-732164.

The online version of this article contains a data supplement.

There is an Inside *Blood* Commentary on this article in this issue.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2017 by The American Society of Hematology

Methods

Mice

C57Bl6 mice were purchased from Elevage Janvier (Le Genest, Saint Isle, France). *Cx3cr1*-EGFP-Kin (*Cx3cr1*^{egfp/+}),¹⁷ *Csflr*-Gal4VP16/UAS-ECFP (MacBlue),¹⁸ and *Ccr2*^{-/-} mice were intercrossed to generate MacBlue×*Cx3cr1*^{egfp/+}, MacBlue×*Cx3cr1*^{egfp/sgfp}, or MacBlue×*Cx3cr1*^{egfp/+}×*Ccr2*^{-/-} mouse strains and bred at Pitié-Salpêtrière animal facility.

Peritonitis models

For low-dose LPS-mediated peritonitis, mice were administered intraperitoneally with or without 100 ng/kg LPS in phosphate-buffered saline (PBS). For cecal ligation and puncture (CLP)-induced peritonitis, mice were operated as previously performed.¹⁹ In some experiments, 50 µg of CX3CR1 antagonist (F1) antagonist²⁰ was injected IV into sterile PBS concomitantly with LPS injection or immediately and 3.5 hours after CLP.

Blood/tissue partitioning

Intravascular CD45 labeling was performed as previously described.²¹⁻²³ Mice were injected IV with 1 µg of anti-CD45 (clone 30-F11). Two minutes after injection, blood was drawn and mice were sacrificed. Lungs and spleen were harvested and bathed in a large volume of PBS. CD45-labeled cells in all tissues were considered to be intravascular and CD45⁻ cells were considered to be parenchymal.

Flow cytometry

Flow cytometry acquisition was performed on the fluorescence-activated cell sorter (FACS) LSRFortessa X-20 (BD, Franklin Lakes, NJ) with DIVA Flow Cytometry software, and data were analyzed with FlowJo software (Tree Star, Inc, Ashland, OR). Blood was drawn via retro-orbital puncture with heparin and directly stained with antibodies. After staining, erythrocytes were lysed with buffer containing 0.15 M NH₄Cl, 0.01 mM KHCO₃, and 0.1 mM EDTA and resuspended in FACS buffer containing PBS 0.5% bovine serum albumin EDTA 2 mM. BM cells were harvested by flushing out the tibia with PBS. Peritoneal fluids were collected by peritoneal lavage with 5 mL of ice-cold FACS buffer. Lungs and spleen were harvested and digested in RPMI 1640 medium (Gibco, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) with 1 mg/mL collagenase IV (Sigma) for 30 minutes at 37°C and dissociated through a 40-µm pore cell strainer (Becton Dickinson, Rungis, France). One-tenth of the cell suspension was incubated with 1 µg/mL purified anti-CD16/32 (2.4G2; BD Biosciences) for 10 minutes at 4°C, and then surface staining was performed by an additional 20-minute incubation with appropriate dilution of the surface marker antibodies. Cells were then washed once in FACS buffer. For chemokine binding assays, after surface staining, cells were incubated with 100 nM *m*-Fractalkine (Alexa-647; Almac, Edinburgh, Scotland) for 45 minutes at 37°C. Cell suspensions were washed once in FACS buffer and analyzed directly by flow cytometry. CX3CL1-A647 binding specificity was controlled on CX3CR1-deficient mice.

Immunofluorescence of the peritoneal membrane

After intraperitoneal lavage, a minimum of 2 cm² of abdominal muscle tissue including the peritoneal membrane was cut on both sides of the linea alba and was directly laid on a microscope coverslip to image the inner side of the parietal sheet of the peritoneum. Large wide field images along the linea alba were recorded with an inverted Zeiss Axio Z1 fluorescent microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) using Zen software. Enhanced cyan fluorescent protein (ECFP) and enhanced green fluorescent protein (EGFP) signals were acquired using an ExBP 475/40, EmBP 530/50 for EGFP and an ExBP 436/25, EmBP 480/40 for ECFP light cube filters. Cell quantification was performed by counting the number of ECFP⁺ cells at the interface between the muscular aponeurosis and the linea alba using ImageJ software (National Institutes of Health).

Results

Intravital imaging reveals a marginated pool of Ly6C^{high} and Ly6C^{low} monocytes in BM vasculature

Intravital multiphoton microscopy provides a unique opportunity to understand spatiotemporal distribution of monocytes in their physiological environment. We tracked medullar monocytes of the skull BM using the previously described MacBlue×*Cx3cr1*^{egfp/+} transgenic mouse.²³ We and others previously showed that the MacBlue transgene is mainly expressed by monocyte-derived cells, whereas it is relatively absent from tissue-resident macrophages except Langerhans cells, microglia, and alveolar macrophages.^{11,23,24} A combination of high-molecular-weight Rhodamin-Dextran IV injection and second harmonic generation (SHG) signal collected from the bone matrix discriminated the vasculature from the parenchymal niches of the BM (Figure 1A). ECFP⁺ cells were distributed in both compartments, whereas EGFP⁺ cells were only located in the parenchymal areas. Flow cytometric analysis confirmed that >90% of BM and 53% of blood ECFP^{bright} cells were CX3CR1^{low}Ly6C^{high}-Mo (CD11b⁺F4/80⁺Ly6G^{neg}NK1.1^{neg}Ly6C^{high}CX3CR1^{low}), and the remaining ECFP^{bright} cells represented CX3CR1^{high}Ly6C^{low} monocytes/macrophages (supplemental Figure 1A, available on the *Blood* Web site). In the BM sinusoids, we defined circulating monocytes that can be detected in a single picture of the movies, rolling monocytes that are slowed down in the lumen of the vessels, and marginated monocytes either crawling with amoeboid-like shape or completely arrested in the lumen of the vasculature (Figure 1B; supplemental Video 1).

We next compared the behavior of the marginated monocytes in wild-type (WT), *Ccr2*^{-/-}, and *Cx3cr1*^{-/-} mutant mice. In *Ccr2*^{-/-} mice, ECFP⁺ cells in the sinusoids were visually less frequent than in WT mice (supplemental Videos 1 and 2), and the remaining cells were mostly arrested (Figure 1C). In contrast, the proportion of arrested cells was significantly reduced in *Cx3cr1*^{-/-} compared with WT mice with an increased proportion of circulating and rolling cells (Figure 1C; supplemental Videos 1 and 2). Accordingly, the distribution of the cell mean velocity among arrested, crawling, and rolling cells showed an increased proportion of cells with high velocity (>6 µm/min) in *Cx3cr1*^{-/-} mice compared with WT mice (Figure 1D).

To further characterize the nature of the cells present in the vasculature of the BM, we performed blood/tissue partitioning by in vivo CD45 staining.²¹ This approach allowed the discrimination between circulating monocytes, collected by blood drawing, CD45⁺ BM-intravascular monocytes, including marginated and circulating subsets, and CD45⁻ BM-parenchymal monocytes isolated from BM extraction (Figure 1E schema). One hundred percent of circulating cells were labeled after intravascular staining (Figure 1E left). In steady-state BM, both Ly6C^{high}-Mo and Ly6C^{low}-Mo were labeled by the anti-CD45 antibody with a lower MFI compared with circulating monocytes, showing a reduced accessibility of the antibody to the cells in accordance with cell margination to the endothelium (Figure 1E right). The numbers of these intravascular BM monocytes (CD45 in vivo⁺ cells) in 1 tibia of WT mice were 8159 ± 7737 for Ly6C^{high}-Mo and 6758 ± 6687 for Ly6C^{low}-Mo (Figure 1F). The ratio of in vivo CD45⁺Ly6C^{high}/Ly6C^{low}-Mo in the BM (45 ± 18.4%) was similar to the ratio in the bloodstream (45.7% ± 19.6%), suggesting no preferential margination in the BM sinusoids of 1 subset to the other (data not shown). As expected in *Ccr2*^{-/-} mice, the number of intravascular BM Ly6C^{high}-Mo but not that of Ly6C^{low}-Mo was significantly reduced compared with WT. In *Cx3cr1*^{-/-} mice, only

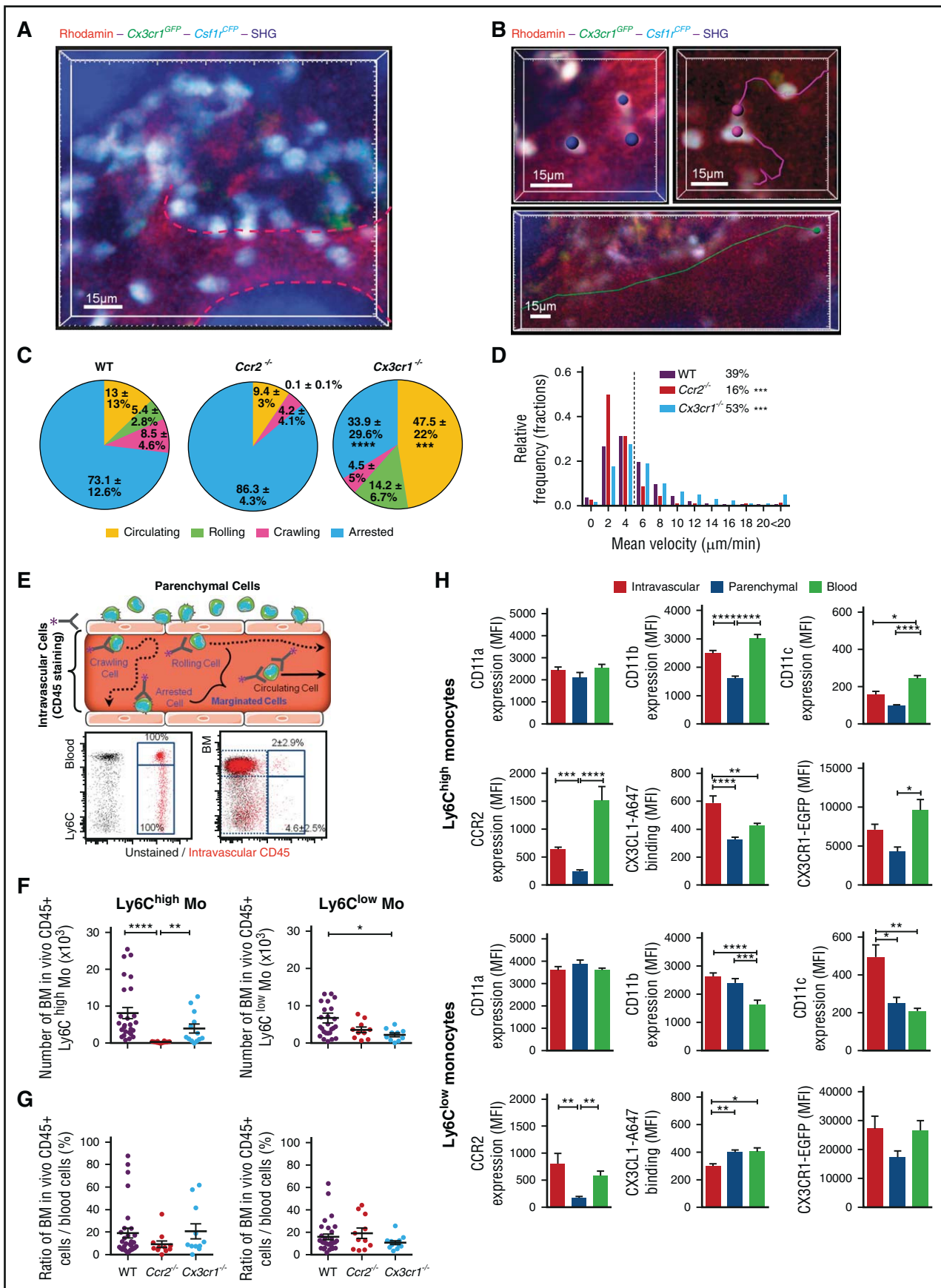


Figure 1.

the number of BM-intravascular Ly6C^{low}-Mo was significantly reduced (Figure 1F). Assuming a total blood volume of 2 mL, we estimated that BM-intravascular CD45⁺Ly6C^{high}-Mo from only 1 thighbone represented up to 19.1% ± 23.9% (median = 9.3%) of the total circulating Ly6C^{high}-Mo and BM-intravascular CD45⁺Ly6C^{low}-Mo represented 15.9% ± 13.9% (median = 10.8%) of the total circulating Ly6C^{low}-Mo (Figure 1G). Considering the numerous other BM niches, this very high concentration of CD45⁺ BM-intravascular monocytes further argues for a specific monocyte enrichment in BM sinusoids. To provide further insights on the origin of marginating monocytes, we performed intravital imaging on parabionts. One month after parabiosis between C57Bl6 (host) and MacBlue×*Cx3cr1^{gfp/+}* (donor) mice, marginated ECFP⁺ monocytes from the donor were detected in the blood vasculature of the host BM as well as within the parenchymal niches (supplemental Figure 1B-C). Flow cytometry confirmed that 66.8% ± 22% of the donor ECFP⁺ monocytes were Ly6C^{high}, arguing that inflammatory monocytes can constitutively exchange between the vasculature and the BM parenchyma (supplemental Figure 1D). In *Ccr2^{-/-}* and *Cx3cr1^{-/-}* mice, the ratio of BM-intravascular to circulating Ly6C^{high}-Mo and Ly6C^{low}-Mo numbers were similar compared with WT mice, suggesting that the margination is in direct correlation with the level of circulating cell at steady state (Figure 1G).

We next investigated whether the BM-intravascular/marginated monocytes expressed differential levels of the CD11 integrins and chemokine receptors (Figure 1H) compared with peripheral blood circulating and BM-parenchymal monocytes. BM-intravascular (CD45⁺) and circulating Ly6C^{high}-Mo expressed similar levels of the integrins CD11b and CD11a. BM-intravascular (CD45⁺) Ly6C^{high}-Mo expressed reduced levels of CD11c and CCR2. Despite expression of the CX3CR1 reporter EGFP was lower, CX3CL1 binding was higher in BM-intravascular compared with peripheral circulating Ly6C^{high}-Mo. CD11b, CCR2, and CX3CR1 levels were increased in the intravascular (CD45⁺) fraction of the BM compared with the parenchymal (CD45⁻) pool. BM-intravascular Ly6C^{low}-Mo displayed increased expression of CD11b, CD11c, and CCR2 compared with its circulating counterpart but reduced level of functional CX3CR1. These different phenotypes further confirm that the BM-intravascular and peripheral circulating monocytes represent distinct pools.

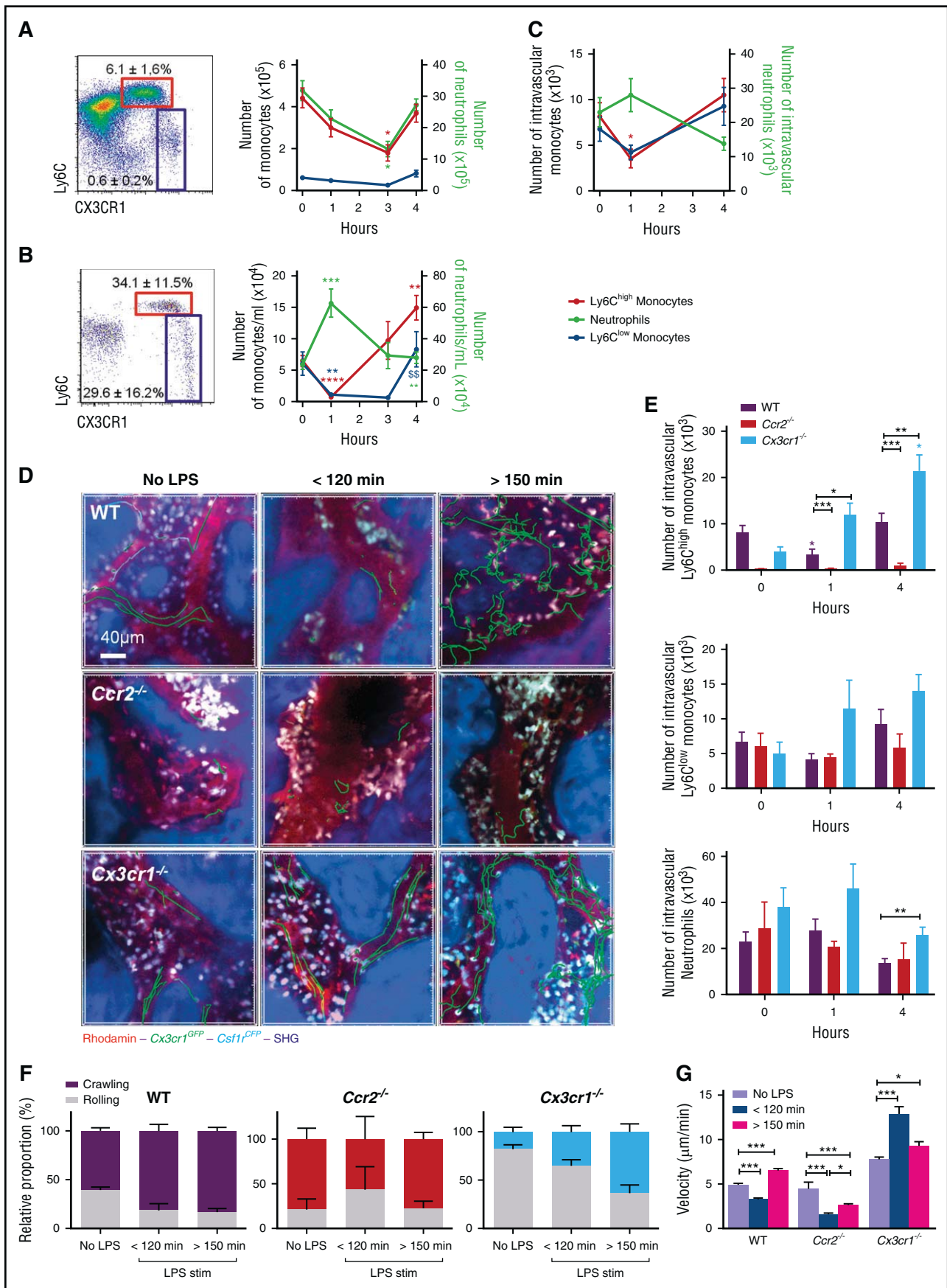
We concluded that in steady-state conditions, both Ly6C^{high}-Mo and Ly6C^{low}-Mo generate a consequent marginating pool in the BM sinusoids. This reservoir is abrogated in the absence of CCR2, and its behavior depends on CX3CR1-mediated adherence to the endothelium lumen.

CCR2 and CX3CR1 control BM parenchymal and vascular monocyte release following intraperitoneal LPS injection

We next investigated the behavior of this marginating pool upon inflammation. Toll-like receptor stimulation using LPS mimics

pathogen infection and permits study of the cell mobilization mechanism in a dose-dependent manner.⁵ Ly6C^{high}-Mo are rapidly released from the BM until 3 hours after intraperitoneal injection of LPS (100 ng/kg) (Figure 2A). At 4 hours, the number of Ly6C^{high}-Mo recovered in the BM suggests a rehoming of mobilized cells from the blood. Neutrophils followed the same mobilization profile as Ly6C^{high}-Mo in the BM, but the number of Ly6C^{low}-Mo in the BM was barely affected by LPS challenge (Figure 2A). Surprisingly, within the first hour, the number of both circulating Ly6C^{high}-Mo and Ly6C^{low}-Mo dropped by 88% ($6.5 \pm 6.1 \times 10^4$ to $0.74 \pm 1.2 \times 10^4$) and 81% ($6.1 \pm 13.6 \times 10^4$ to $1.1 \pm 1.2 \times 10^4$), respectively (Figure 2B). The monocytopenia at 1 hour was specific as neutrophils showed an almost mirrored mobilization kinetic in the blood. Reduced margination in BM sinusoids was also observed at 1 hour for Ly6C^{high}-Mo (57% reduction of in vivo CD45⁺ cells, from $8.2 \pm 7.7 \times 10^3$ to $3.5 \pm 3.4 \times 10^3$, $P = .04$) and to a smaller extent for Ly6C^{low}-Mo (Figure 2C). In contrast, BM-intravascular neutrophils tended to increase at 1 hour in accordance with their massive accumulation in the bloodstream (Figure 2C). The number of blood circulating Ly6C^{high}-Mo was recovered 3 hours post challenge and accumulated by fourfold ($14.9 \pm 14.2 \times 10^4$) after 4 hours according to BM release. Circulating Ly6C^{low}-Mo recovered only 4 hours after challenge, reaching approximately their number at steady state ($8.3 \pm 20.2 \times 10^4$) (Figure 2B). Circulating neutrophil numbers doubled in 1 hour and returned to basal levels at 3 hours after LPS injection. By 4 hours, the margination of both BM-intravascular Ly6C^{high}-Mo and Ly6C^{low}-Mo recovered (Figure 2C) but did not increase with the monocytosis and thus represented only $4.4\% \pm 3.6\%$ (median = 3.3%) and $11.3\% \pm 8.3\%$ (median = 8.6%), respectively, of the circulating monocytes of the peripheral blood (data not shown), arguing for a preferential release of Ly6C^{high}-Mo into the bloodstream. The sequential monocytopenia and monocytosis phases were observed in WT and *Cx3cr1^{-/-}* mice with a slight accumulation of circulating Ly6C^{high}-Mo in CX3CR1-deficient mice compared with WT mice (supplemental Figure 2A). As expected, the Ly6C^{high} monocytosis was abrogated in *Ccr2^{-/-}* mice (supplemental Figure 2A). Circulating Ly6C^{low}-Mo recovery 4 hours after LPS stimulation was not affected in both *Cx3cr1^{-/-}* and *Ccr2^{-/-}* mice (supplemental Figure 2A). Intravital imaging of the skull BM confirmed that marginating ECFP⁺ monocytes were cleared from the sinusoids in WT mice and recovered with time (Figure 2D; supplemental Video 3). In *Ccr2^{-/-}* mice, no accumulation of marginating ECFP⁺ cells was observed in the BM vasculature after LPS injection (Figure 2D-E; supplemental Video 3). In CX3CR1-deficient mice, an increased accumulation of BM-intravascular cells compared with WT mice was observed after 1 hour, and even greater numbers accumulated later on (Figure 2D-E; supplemental Video 3). The ratio of crawling to rolling cells increased rapidly after LPS treatment in WT mice (Figure 2F). The mean velocity first dropped down between 60 and 150 minutes after LPS stimulation due to rapid release of the fastest

Figure 1. Intravital imaging reveals a marginated pool of Ly6C^{high} and Ly6C^{low} monocytes in BM vasculature. (A) Representative 3-dimensional (3D) 2-photon laser scanning microscopy (3D-TPLSM) pictures showing medullar monocytes in the parenchymal and vascular BM compartments of the skull in MacBlue×*Cx3cr1^{gfp/+}* mice (original magnification ×573). (B) Representative tracks of vascular monocytes displaying arrested (blue; original magnification ×620), crawling (pink; original magnification ×546), and rolling (green; original magnification ×300) behaviors. Vasculature is labeled with 2-MDa Rhodamin-Dextran (red), and bone matrix is identified by SHG (blue). (C) Pie graphs represent the relative proportion of the different monocyte behaviors in each mouse strain (percent ± standard deviation [SD] from 3 to 5 independent experiments are indicated). (D) Relative frequency distribution of vascular monocyte mean velocity (data are pooled from at least 3 independent experiments; percent indicates the proportion of cells faster than 6 μm/min for each mouse strain, and Kruskal-Wallis with Dunn's multicomparisons test is performed. Statistical significance between the 2 mutants and WT mice is indicated). (E) Scheme illustrates cell behavior and intravascular staining in the BM sinusoids. Representative dot plot showing CD45 intravascular staining (red) overlaid with noninjected control mouse (black) in the blood and the BM. (F) Quantification of the blood/tissue partitioning of monocyte subsets in the different mouse strains. (G) Graphs represent the ratio of intravascular medullar monocytes in 1 thighbone to the total number of circulating monocytes. Black bars represent mean ± standard error of the mean (SEM). (Mice are pooled from at least 3 independent experiments; median is indicated in black, and Kruskal-Wallis with Dunn's multicomparison test is performed.) (H) Bar graphs show the respective marker expression (as mean fluorescence intensity [MFI]) on intravascular BM monocytes (CD45⁺ cells after in vivo staining), parenchymal BM monocytes (CD45⁻ after in vivo staining), and blood monocytes (CD45⁺ cells from the blood) in WT mice. (Bars represent mean ± SEM. n = 12-14 mice out of 2 to 3 independent experiments; Kruskal-Wallis with Dunn's multicomparisons test is performed.) * $P < .05$, ** $P < .01$, *** $P < .001$, **** $P < .0001$.



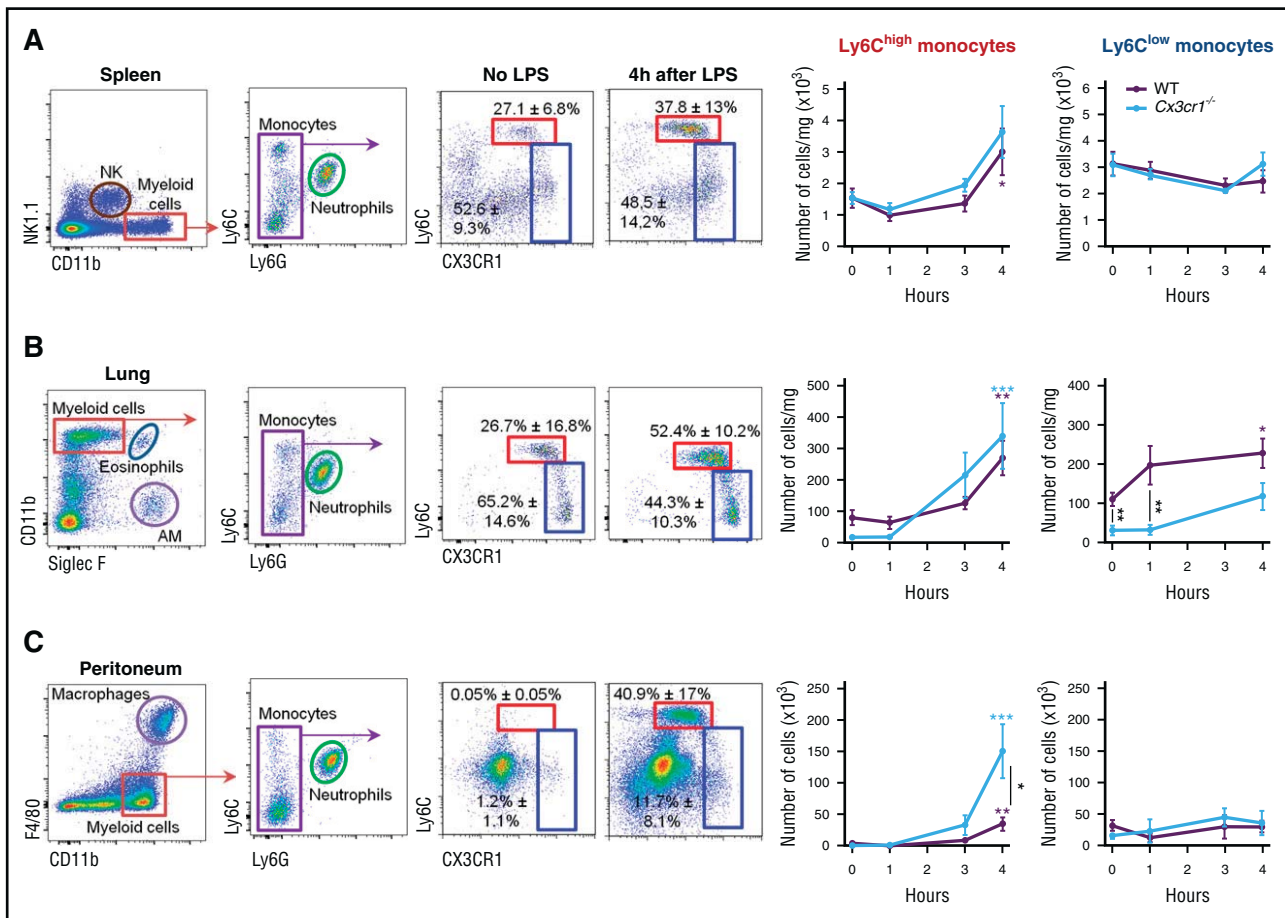


Figure 3. CX3CR1 reduces Ly6C^{high} monocyte release toward the peritoneal cavity during LPS-mediated peritonitis. Kinetics of Ly6C^{high} and Ly6C^{low} monocyte mobilization in the spleen (A), the lungs (B), and the peritoneal cavity (C) after intraperitoneal injection of 100 ng/kg LPS in MacBlue×*Cx3cr1^{gfp/+}* (WT) and MacBlue×*Cx3cr1^{gfp/gfp}* mice (*Cx3cr1^{-/-}*). Representative dot plots show the gating strategy to define Ly6C^{high} monocytes (red gate) and Ly6C^{low} monocytes (blue gate); percent ± SD are depicted. Graphs represent mean ± SEM of the absolute number per milligram of spleen or lungs and in total after peritoneal cavity lavage (n = 8-13 mice per group and per time point from at least 3 independent experiments). Kruskal-Wallis with Dunn's multicomparisons test is performed; the significance for each time point compared with untreated mice [t0] are indicated in colored *. Significance between mouse strains are indicated by black * for each time point, and Mann-Whitney test is performed). **P* < .05; ***P* < .01; ****P* < .001. AM, alveolar macrophages; NK, natural killer cells.

cells and increased above basal level after 150 minutes (Figure 2G). No change in the behavior of the few ECFP⁺ monocytes present in the BM sinusoids of *Ccr2^{-/-}* mice was observed, except a strong reduction in their mean velocity at early time points that persisted over time (Figure 2F-G). In *Cx3cr1^{-/-}* mice, the change in the ratio between crawling and rolling cells after LPS stimulation was delayed and reduced compared with WT mice (Figure 2F). Moreover, the mean velocity of *Cx3cr1^{-/-}* ECFP⁺ cells was much higher at all time points compared with WT mice (Figure 2G). Following LPS challenge,

parenchymal ECFP⁺ cells increased their mean velocity and straightness in accordance with the parenchymal mobilization and release toward the vasculature (supplemental Figure 2B; supplemental Video 4). This acceleration was not observed in *Ccr2^{-/-}* parenchymal ECFP⁺ cells but strongly increased in the absence of CX3CR1 (supplemental Figure 2B). Our results showed that CCR2 and CX3CR1 tightly regulate medullar monocyte release by controlling both parenchymal egress and the strength of vascular margination.

Figure 2. CCR2 and CX3CR1 control BM parenchymal and vascular monocyte release following intraperitoneal LPS injection. Kinetics of Ly6C^{high} (red), Ly6C^{low} monocytes (blue), and Ly6G⁺ neutrophils (green) mobilization in the BM (A) and the blood (B) after intraperitoneal injection of 100 ng/kg LPS in MacBlue×*Cx3cr1^{gfp/+}* mice. Dot plots are gated on CD11b⁺NK1.1⁻Ly6G⁻ cells (percent ± SD of the gated populations are indicated). (C) Graph shows the quantification of BM CD45⁺ monocytes and neutrophils after intravascular staining (for all graphs, data represent mean ± SEM of absolute numbers of each subset per thighbone or per milliliter of blood quantified by flow cytometry [n = 6-12 mice for each time point out of 3 independent experiments]; Kruskal-Wallis with Dunn's multicomparisons test is performed. Only the significance for each time point compared with untreated mice [t0] is indicated). (D) Representative 3D-TPLSM images of the skull BM from MacBlue×*Cx3cr1^{gfp/+}*, MacBlue×*Cx3cr1^{gfp/gfp}*, *Ccr2^{-/-}*, and MacBlue×*Cx3cr1^{gfp/gfp}* mice at different time points before and after LPS injection (original magnification ×115). Track paths of vascular ECFP⁺ cells are represented in green. BM sinusoids are labeled by Rhodamin-Dextran (red); bone matrix is detected by SHG (blue), and monocytes are in white/cyan. (E) Flow cytometry quantification of BM CD45⁺ monocytes and neutrophils after intravascular staining in WT, CCR2-, and CX3CR1-deficient mice bars represent mean ± SEM from 6-12 different mice per time point out of at least 3 independent experiments. Kruskal-Wallis with Dunn's multicomparisons test is performed. The significance for each time point compared with untreated mice [t0] is indicated by colored *. Significance compared to 1 h is indicated by colored \$\$ (*P* < .01). Significance between mouse strains is indicated by black * for each time point; Mann-Whitney test is performed. **P* < .05; ***P* < .01; ****P* < .001; *****P* < .0001). (F) Quantification of the relative proportion in the number of crawling and rolling monocytes in BM sinusoids. Bars represent mean ± SEM calculated from 2 to 5 different mice per group. (G) Mean velocity of ECFP⁺ vascular cells in the BM upon LPS injection (data are pooled from at least 3 different mice per group and per time point. One-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's multiple comparison tests is performed).

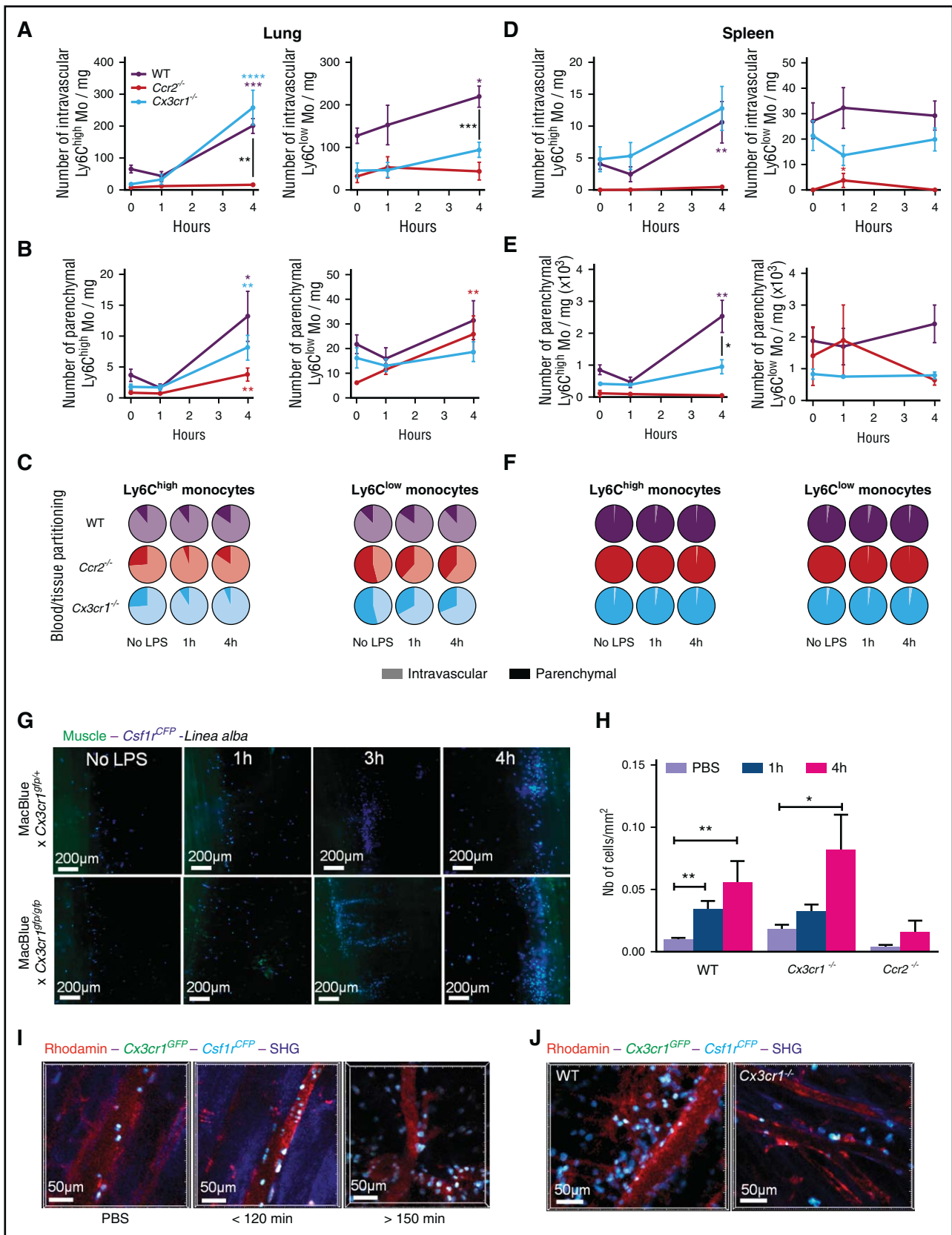


Figure 4. CCR2 and CX3CR1 control monocyte compartmentalization during inflammation. Blood/tissue partitioning of Ly6C^{high} and Ly6C^{low} monocytes in the lungs (A-C) and the spleen (D-F) are determined by in vivo CD45 intravascular staining in the different mouse strains after intraperitoneal injection of 100 ng/kg LPS in WT, CCR2-, and CX3CR1-deficient mice. (A,D) Graphs represent mean ± SEM of the absolute number per milligram of tissue of intravascular (CD45⁺) monocytes. (B,E) Graphs represent mean ± SEM of the absolute number of parenchymal (CD45⁻) monocytes. (C,F) Pie graphs represent the relative proportion of parenchymal (dark) and intravascular (clear) monocytes in indicated mouse strains and tissue for all graphs, n = 6-14 mice per group and per time point from at least 2 independent experiments.

CX3CR1 reduces Ly6C^{high} monocyte release toward the peritoneal cavity during LPS-mediated peritonitis

We next evaluated whether the reduced margination of CX3CR1-deficient Ly6C^{high}-Mo in the BM vasculature could have an impact on their systemic distribution.

A slight but nonsignificant reduction of Ly6C^{high}-Mo number was observed in the spleen of WT mice 1 hour after LPS injection; however, Ly6C^{high}-Mo recovered after 3 hours and further accumulated at 4 hours compared with basal value. CX3CR1 deficiency did not affect the kinetic of monocyte mobilization in the spleen (Figure 3A). The number of Ly6C^{low}-Mo in the spleen slightly diminished over time (Figure 3A). In steady-state lungs, the number of both Ly6C^{high}-Mo and Ly6C^{low}-Mo was impaired in *Cx3cr1*^{-/-} mice as previously observed.²³ One hour after LPS stimulation, Ly6C^{high}-Mo numbers remained stable but strongly accumulated at 4 hours (Figure 3B). In contrast, Ly6C^{low}-Mo accumulation was weaker. Accumulation of both Ly6C^{high}-Mo and Ly6C^{low}-Mo subsets was observed in the absence of CX3CR1; however, Ly6C^{low}-Mo did not reach the level of WT mice, suggesting an important role of CX3CR1 in the homing or survival of Ly6C^{low}-Mo in the lungs (Figure 3B).

Surprisingly, in the absence of CX3CR1, Ly6C^{high}-Mo accumulated by fourfold in the peritoneal cavity 4 hours after LPS treatment compared with WT monocytes. In contrast, Ly6C^{low}-Mo numbers displayed nonsignificant variation after LPS stimulation in both mouse strains (Figure 3C).

We concluded that CX3CR1 controls Ly6C^{high}-Mo accumulation into the peritoneal cavity upon LPS stimulation.

CCR2 and CX3CR1 control monocyte blood/tissue partitioning during inflammation

We speculated that strong accumulation of Ly6C^{high}-Mo in the peritoneal cavity of CX3CR1-deficient mice could be due to a defect in their margination to the endothelium of tissue vasculatures. We previously showed that the majority of lung monocytes were trapped in the microcapillaries and in direct contact with blood and airways.²³ Blood/tissue partitioning confirmed that >90% of the lung tissue monocytes are trapped in the lung capillaries and are still labeled by in vivo CD45 staining even 4 hours after LPS stimulation (Figure 4A-C). CX3CR1 deficiency did not affect the trapping of Ly6C^{high}-Mo after LPS stimulation but affected the Ly6C^{low}-Mo, resulting in a higher proportion of parenchymal cells (Figure 4A,C). Few Ly6C^{high}-Mo and Ly6C^{low}-Mo infiltrated the lungs even at 4 hours after LPS treatment (Figure 4B-C). As a control, lung-intravascular Ly6C^{high}-Mo and Ly6C^{low}-Mo did not accumulate in *Ccr2*^{-/-} mice, but the low Ly6C^{low}-Mo infiltration was still similar to WT mice (Figure 4A-C). In contrast to the lungs, the proportion of intravascular (in vivo CD45⁺) monocytes in the splenic reservoir was minor (Figure 4C,F). Spleen-intravascular Ly6C^{high}-Mo were similar in WT and *Cx3cr1*^{-/-} mice (Figure 4D); however, the splenic extravasation was slightly reduced at steady state but further significantly impaired at 4 hours in CX3CR1-

deficient mice ($P = .01$) (Figure 4E). The Ly6C^{high}-Mo defect in *Ccr2*^{-/-} mice was conserved in the 2 spleen compartments (Figure 4D-E). The number of spleen-intravascular Ly6C^{low}-Mo remained unchanged over time, and no significant infiltration into the spleen was observed in all mouse strains. Overall, the ratio between spleen-intravascular and spleen-parenchymal monocyte subsets was conserved over time (Figure 4F).

In order to exclude that monocyte accumulation in the peritoneal cavity of *Cx3cr1*^{-/-} mice could be due to a defect in their adherence to the peritoneal membrane, we performed histological analysis by fluorescent microscopy on fresh tissue of the inner side parietal sheet of the peritoneum along the linea alba (white line) from MacBlue×*Cx3cr1*^{gfp/+} and MacBlue×*Cx3cr1*^{gfp/gfp} mice (Figure 4G). ECFP⁺ cell accumulation was detectable as early as 1 hour after LPS treatment. By 3 to 4 hours after LPS injection, numerous dense clusters of ECFP⁺ monocytes accumulated along the linea alba (Figure 4H). Monocyte accumulation was similar in WT and CX3CR1-deficient mice, and as expected, completely abrogated in *Ccr2*^{-/-} mice (Figure 4H). Intravital imaging of the parietal sheet vasculature confirmed that circulating monocytes within the first hour following LPS injection margined locally in the vascular lumen and strongly accumulated over time (Figure 4I; supplemental Video 5). In *Cx3cr1*^{-/-} mice, this margination was almost completely abrogated and was associated with the massive accumulation in the peritoneal cavity (Figure 4J; supplemental Video 6). Our results show that inflammatory monocytes can reside in the vascular lumen of inflamed tissues and that extravasation is not a mandatory fate for monocytes.

CX3CR1 blockade induces systemic monocyte demargination

We previously showed that the F1²⁰ blocks monocyte CX3CR1-mediated monocyte adherence.¹¹ We used F1 to confirm that monocyte margination is CX3CR1 dependent and exclude potential mouse strain-associated effects. CX3CR1 blockade with F1 reduced monocyte adherence to BM endothelium 4 hours after LPS treatment, increased their mean velocity (Figure 5A-B; supplemental Video 7), and increased the number of BM-intravascular as well as circulating Ly6C^{high}-Mo compared with WT mice (Figure 5C). Monocyte margination in the proximal blood vessels of the peritoneum was also lost in F1-treated mice (Figure 5D; supplemental Video 7).

CX3CR1-dependent Ly6C^{high}-monocyte margination control monocyte deployment during CLP-induced peritonitis

We next investigated whether similar observation could be done after CLP, a more severe and clinically relevant model of sepsis. CLP induced an increased monocyte and neutrophil margination within 4 hours compared with sham-operated mice in the BM, the lungs, and the spleen (Figure 6A). BM margination was observed by real-time imaging on CLP-operated MacBlue×*Cx3cr1*^{gfp/+} mice (Figure 6B). F1 treatment led to reduced adherence of monocytes as depicted by increased velocity and straightness (Figure 6C). Monocyte margination in the peritoneal vasculature after CLP was also severely impaired

Figure 4 (continued) Kruskal-Wallis with Dunn's multicomparisons test is performed, and the significance for each time point compared with untreated mice [t0] is indicated in colored *. Significances between mouse strains are indicated by black * for each time point. Mann-Whitney test is performed. (G) Representative fluorescent wide field pictures of the inner side of the parietal sheet of the peritoneal membrane (green autofluorescence) at different time point after LPS injection in MacBlue×*Cx3cr1*^{gfp/+} and MacBlue×*Cx3cr1*^{gfp/gfp} mice show ECFP⁺ monocytes (cyan) accumulation along the linea alba (dark area; original magnification ×20). (H) Quantification of monocyte accumulation along the linea alba in the different mouse strains (n = 3-8 mice in each group, Kruskal-Wallis with Dunn's multicomparisons test is performed for each strain). * $P < .05$; ** $P < .01$; *** $P < .001$; **** $P < .0001$. (I) Representative time-lapse in vivo 3D images of the peritoneal membrane vasculature in MacBlue×*Cx3cr1*^{gfp/+} shows monocyte accumulation, adhering to the endothelium at different time points after LPS injection (original magnification ×20). Vessels are labeled by Rhodamin-Dextran injection prior to imaging session (red). SHG shows conjunctive tissue of the peritoneal membrane. (J) Comparative 3D-TPLSM images showing monocyte accumulation in the peritoneal vasculature 4 hours after LPS injection in MacBlue×*Cx3cr1*^{gfp/+} (WT) and MacBlue×*Cx3cr1*^{gfp/gfp} mice (*Cx3cr1*^{-/-}) (original magnification ×106).

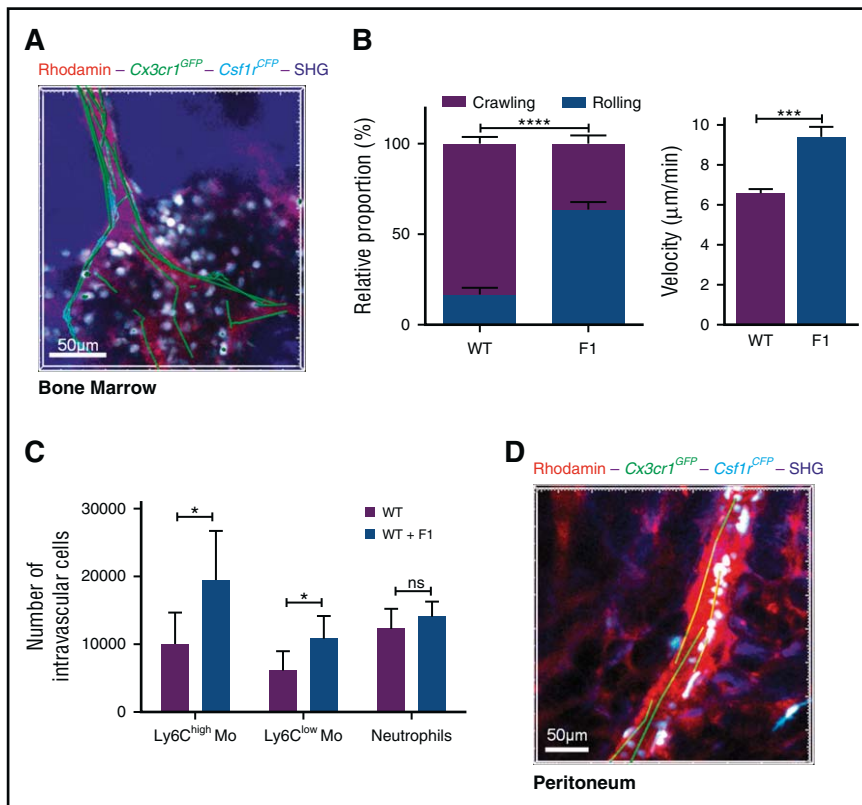


Figure 5. CX3CR1 blockade induces systemic monocyte demargination. (A) 3D-TPLSM image of the skull BM from MacBlue×*Cx3cr1^{gfp/+}* 4 hours after LPS treatment in the presence of F1 (50 μg injected intraperitoneally) (original magnification ×196). Track paths (green line) showing monocyte behavior in the vasculature (red) are represented. (B) Quantification of the relative proportion of crawling and rolling monocytes and their mean velocity in the vascular lumen of the BM sinusoids from MacBlue×*Cx3cr1^{gfp/+}* treated (F1) or not (WT) with CX3CR1 antagonism (bars represent mean ± SEM; data are pooled from different movies out of 2 independent experiments at least. Kruskal-Wallis with Dunn's multicomparison tests is performed). (C) Quantification by flow cytometry of intravascular Ly6C^{high}, Ly6C^{low} monocytes, and neutrophils in WT and treated (F1) after in vivo CD45 intravascular staining (bars represent mean ± SEM from at least 6 different mice per time point out of at least 2 independent experiments; Kruskal-Wallis with Dunn's multicomparisons test is performed). The significance between mouse strains is indicated by black * for each time point, and Mann-Whitney test is performed). **P* < .05; ****P* < .001; *****P* < .0001; ns, nonsignificant. (D) In vivo 3D-TPLSM image of the peritoneal vasculature showing the defect in ECFP⁺ monocyte adherence to endothelium (red) 4 hours after LPS treatment in the presence of F1 (see supplemental Video 7; original magnification ×150).

by F1 treatment (Figure 6D; supplemental Video 8). Finally, this F1-mediated demargination selectively affected Ly6C^{high}-monocyte distribution between the lungs and the peritoneal cavity, with a preferential relocation from the lungs toward the peritoneum compared with untreated CLP-operated mice (Figure 6E). We conclude that CX3CR1 is a key regulator of monocyte deployment during sepsis.

Discussion

Blood vessels have a central role in the regulation of monocyte distribution in steady state and in pathological conditions. Surprisingly, our knowledge of cell behavior in the vasculature is very limited as it is never considered a tissue of residency for leukocytes. Moreover, the characterization of blood cells is restricted to the circulating cells that are harvested from blood draw, cells adhering/marginating to the endothelial lumen being barely accessible. Three decades ago, considering the rate of BM production and the frequency of monocytes into the blood, despite a lack of experimental evidences, van Furth and Sluiter already suspected that blood monocytes might be distributed into a circulating and a marginating pool.¹² The frequency of patrolling monocytes identified by Auffray et al may represent approximately one-third of the total Ly6C^{low}-Mo pool of the vasculature,^{1,25} but this may not account for the pool of marginated cells estimated by van Furth. We combined intravital imaging and blood/tissue partitioning using intravascular leukocyte labeling to demonstrate that a massive pool of vascular monocytes is marginated in the BM sinusoids at steady state. These marginated monocytes include Ly6C^{high}-Mo and Ly6C^{low}-Mo subsets in similar proportions. We extrapolated that in 1 thighbone the number of marginated cells represented ~20% of the number of circulating Ly6C^{high}-Mo. Considering all the BM niches and the lung

capillaries that we have previously shown to sequester monocytes,²³ the proportion of marginated monocytes in the total vasculature of the body is increasingly being realized to be a major source of monocytes, as suggested by van Furth.¹² Interestingly, despite its role as a monocyte reservoir,⁴ the spleen vasculature does not represent an important site of monocyte margination, confirming that monocytes are stocked in the parenchymal red pulp.

Patrolling activity of Ly6C^{low}-Mo in the peritoneal vasculature was previously described to be dependent of the integrin CD11a lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1).¹ We compared the expression of the 3 integrins CD11a, b, and c between marginated and circulating monocytes but found no major difference in Ly6C^{high}-Mo, but did discover increased CD11b and CD11c expression between circulating and marginated Ly6C^{low}-Mo. CD11a neutralization using a specific antibody led to an almost complete depletion of both circulating and marginated monocyte subsets (data not shown). We thus could not conclude on a specific role of CD11a in monocyte margination. CX3CR1 has also been shown to be involved in the patrolling activity of Ly6C^{low}-Mo.^{1,25,26} So far, the CX3CR1 expression on the 2 mouse monocyte subsets has been evaluated based on the EGFP expression in the knock-in *Cx3cr1^{gfp/+}*. We compared on Ly6C^{high}-Mo and Ly6C^{low}-Mo the functional expression of CX3CR1 using CX3CL1-AF647 binding with EGFP expression reflecting transcriptional activity of *Cx3cr1* promoter. Although EGFP level was lower on Ly6C^{high}-Mo compared with Ly6C^{low}-Mo, we found similar specific binding of the chemokine on both blood subsets, suggesting that the role of CX3CR1 on Ly6C^{high} could have been underestimated so far. Indeed, we observed that BM-intravascular Ly6C^{high}-Mo displayed even more CX3CL1 binding than their circulating counterparts. This result was in accordance with a role of CX3CR1 in the adherence of Ly6C^{high}-Mo in the BM vasculature. Chemokine binding confers high sensitivity due to its strong affinity for the receptor and intracellular accumulation with

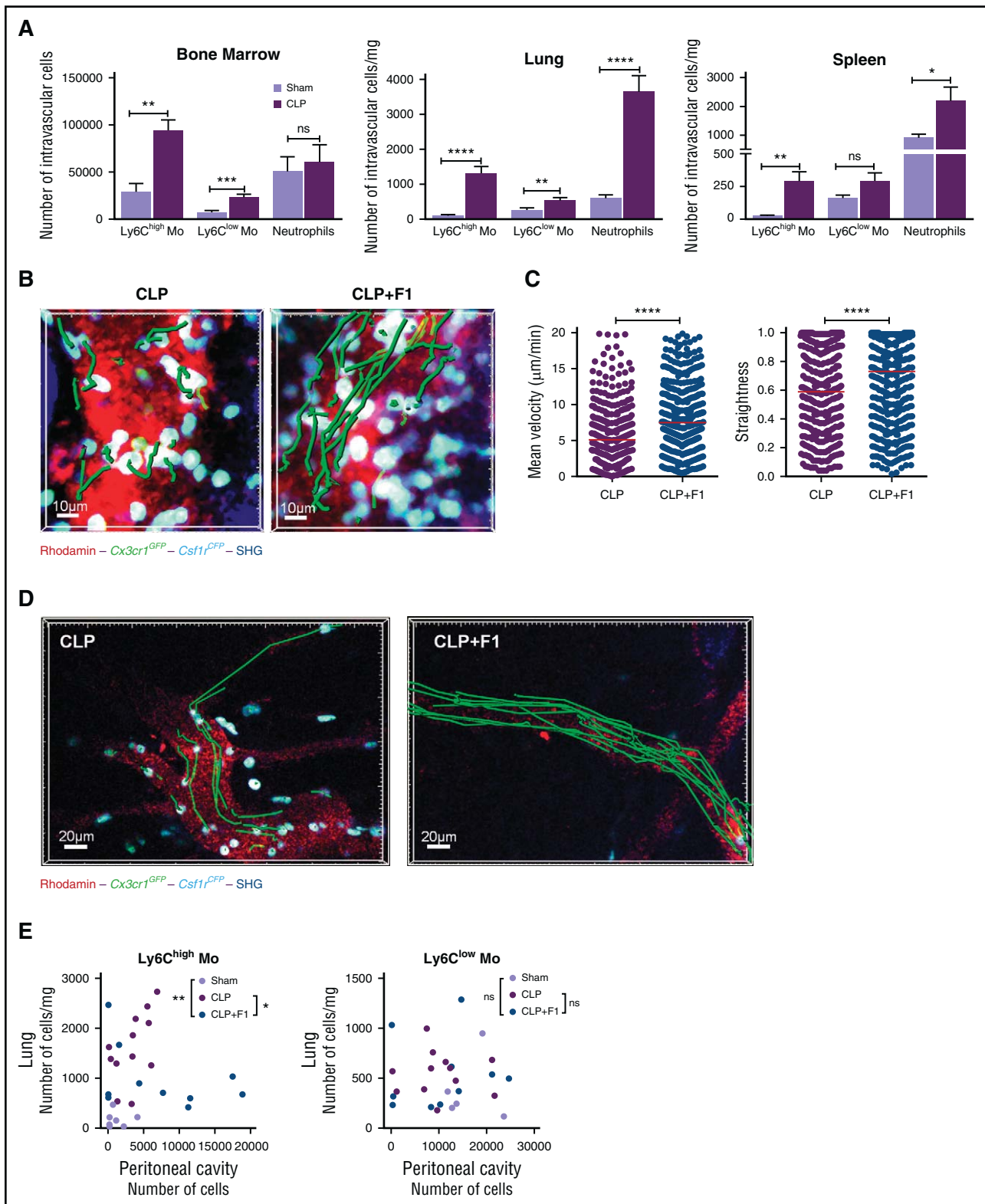


Figure 6. CX3CR1-dependent Ly6C^{high}-monocyte margination controls monocyte deployment during CLP-induced peritonitis. (A) Quantification by flow cytometry of BM, lung, and spleen-intravascular Ly6C^{high}, Ly6C^{low} monocytes, and neutrophils in Sham and CLP-operated after in vivo CD45 intravascular staining (bars represent mean \pm SEM from 7 to 11 different mice per time point out of 3 to 4 independent experiments; Mann-Whitney test is performed). * $P < .05$; ** $P < .01$; *** $P < .001$; **** $P < .0001$. (B) 3D-TPLSM images of the skull BM from MacBlue \times Cx3cr1^{GFP/+} 4 hours after CLP treated or not with the F1 (50 μg injected intraperitoneally) (original magnification $\times 440$). Representative track paths are represented in green. (C) Quantification of monocyte mean velocity and straightness in the vascular lumen of the BM sinusoids from MacBlue \times Cx3cr1^{GFP/+} mice treated or not with CX3CR1 antagonist (F1) 4 hours after CLP (median is indicated in red). Data are pooled from different movies out of 3 different mice. Mann-Whitney test is performed; **** $P < .0001$). (D) In vivo 3D-TPLSM image of the peritoneal vasculature showing ECFP⁺ monocyte adherence to endothelium 4 hours after CLP in the presence or not of F1 (original magnification $\times 230$). Representative track paths are represented in green (see supplemental Video 8). (E) Scatter plots show the distribution of the absolute number of Ly6C^{high} and Ly6C^{low} monocytes in the lung versus the peritoneal cavity in Sham, CLP, and CLP treated with F1 4 hours after operation. Statistical differences in the distribution have been measured by a 2-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison tests.

receptor turnover; this observation points out that EGFP expression does not purely reflect functional CX3CR1 expression on monocyte subsets and thus requires caution for future interpretations. Similar margination was not observed in steady-state peritoneum, suggesting that Ly6C^{high} adherence to the endothelium might be different considering the anatomical locality of the vessels. Within the first hour following low-dose LPS injection in the peritoneal cavity, a drastic monocytopenia occurred. This diminution was previously observed by Shi et al in the same model of peritonitis but was not examined.⁵ In contrast, the number of circulating neutrophils increased by threefold in the meantime. Interestingly, in lungs and spleen, Ly6C^{high}-Mo numbers tended to diminish at 1 hour after LPS challenge. Accumulation of Ly6C^{high}-Mo was only observed in the peritoneal membrane vasculature by in vivo imaging, suggesting a rapid relocalization of the marginated monocyte niches toward the peritoneal membrane. We thus demonstrated that BM marginated monocytes are the first released cells and (together with circulating monocytes) the most rapidly mobilized cells toward the inflammatory site. What regulates the relative proportion between circulating and marginated monocytes is unclear. High doses of LPS were shown to increase the sequestration in vascular beds,^{27,28} which as a consequence reduces the proportion of circulating cells.⁵

The expected outcome of cell margination is to undergo extravasation toward the inflammatory site through sequential expression of adherent selectin and integrins.^{29,30} More surprisingly, we observed that CX3CR1 expression participated in the retention of inflammatory monocytes into the endothelial lumen. This important observation led us to conclude that inflammatory monocyte infiltration into the inflamed tissue is not a mandatory fate and that blood retention might have regulatory function. In the course of cecal ligation and puncture-induced sepsis, we reported that CX3CR1-dependent Ly6C^{high}-Mo adherence to the renal endothelium exerts a protective effect against kidney injuries.¹⁹ Herein, we extended the role of CX3CR1 in the systemic distribution of Ly6C^{high}-Mo during the early phase of acute inflammation. It is likely that monocyte adherence to the endothelium is an important feature of the compensatory anti-inflammatory response syndrome,^{31,32} through interleukin-1 receptor alpha release for instance,¹⁹ and through the cleaning of amyloid β ,³³ dead cells, and potential pathogens in the vasculature.²⁵ Margination was still increased at day 7 in CLP-operated mice, suggesting that the regulation between marginated and circulating cells is not only a feature of acute inflammation (data not shown). In addition, we previously showed that F1 antagonist treatment can limit the development of atherosclerotic plaques by reducing monocyte

adherence, which, by contrast, demonstrate a deleterious effect of CX3CR1-dependent monocyte margination in a chronic disease.³⁴

Our results provide novel insights into the regulation of monocyte fate and deployment in steady-state or inflammatory conditions and, more specifically, into the role of CX3CR1 expression by the Ly6C^{high}-Mo subset. Regulating the CX3CR1/CX3CL1 axis represents an interesting approach to regulate the recruitment of inflammatory cells and modulate the outcome of the inflammatory response.

Acknowledgments

The authors thank Andrew J. Hutton for English editing of the manuscript and M. P. Rodero and C. Auffray for helpful discussions and the Plateforme Imagerie Pitié-Salpêtrière for assistance with the 2-photon microscope and the animal facility “Nouvelle Animalerie Commune.” The research leading to these results has received funding from INSERM, from Centre National de la Recherche Scientifique, from Université Pierre et Marie Curie, from Fondation pour la Recherche Médicale “Equipe labellisée,” from “Agence Nationale de la Recherche,” project CMOS (CX3CR1 expression on monocytes during sepsis) 2015 (ANR-EMMA-050). P.H. was supported by the “Ligue Contre le Cancer.”

Authorship

Contribution: P.H. designed, performed the experiments, analyzed and interpreted the data, and wrote the manuscript; P.-L.L., F.L., and C.B.d.C. performed some experiments; C.C. designed research and wrote the manuscript; A.B. supervised the study, designed and performed the experiments, analyzed and interpreted the data, and wrote the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

ORCID profiles: A.B., 0000-0002-7770-7210.

Correspondence: Alexandre Boissonnas, INSERM U1135, CNRS ERL8255, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses, 91 Boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France; e-mail: alexandre.boissonnas@upmc.fr.

References

- Auffray C, Fogg D, Garfa M, et al. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science*. 2007;317(5838):666-670.
- Yona S, Kim KW, Wolf Y, et al. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis [published correction appears in *Immunity*. 2013; 38(5):1073-1079]. *Immunity*. 2013;38(1):79-91.
- Sunderkötter C, Nikolic T, Dillon MJ, et al. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol*. 2004;172(7):4410-4417.
- Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, et al. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science*. 2009;325(5940):612-616.
- Shi C, Jia T, Mendez-Ferrer S, et al. Bone marrow mesenchymal stem and progenitor cells induce monocyte emigration in response to circulating toll-like receptor ligands. *Immunity*. 2011;34(4):590-601.
- Tsou CL, Peters W, Si Y, et al. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest*. 2007;117(4):902-909.
- Serbina NV, Pamer EG. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol*. 2006;7(3):311-317.
- Landsman L, Bar-On L, Zerneck A, et al. CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. *Blood*. 2009;113(4):963-972.
- Garton KJ, Gough PJ, Blobel CP, et al. Tumor necrosis factor- α -converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1). *J Biol Chem*. 2001; 276(41):37993-38001.
- Hermand P, Pincet F, Carvalho S, et al. Functional adhesiveness of the CX3CL1 chemokine requires its aggregation. Role of the transmembrane domain. *J Biol Chem*. 2008; 283(44):30225-30234.
- Jacquelin S, Licata F, Dorgham K, et al. CX3CR1 reduces Ly6C^{high}-monocyte motility within and release from the bone marrow after chemotherapy in mice. *Blood*. 2013;122(5):674-683.
- van Furth R, Sluiter W. Distribution of blood monocytes between a marginating and a circulating pool. *J Exp Med*. 1986;163(2):474-479.
- Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(11):762-774.
- Doherty DE, Downey GP, Schwab B III, Elson E, Worthen GS. Lipopolysaccharide-induced monocyte retention in the lung. Role of monocyte stiffness, actin assembly, and CD18-dependent adherence. *J Immunol*. 1994;153(1):241-255.

15. O'Dea KP, Young AJ, Yamamoto H, Robotham JL, Brennan FM, Takata M. Lung-marginated monocytes modulate pulmonary microvascular injury during early endotoxemia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172(9):1119-1127.
16. Charavaryamath C, Janardhan KS, Caldwell S, Singh B. Pulmonary intravascular monocytes/macrophages in a rat model of sepsis. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2006;288(12):1259-1271.
17. Jung S, Aliberti J, Graemmel P, et al. Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol.* 2000;20(11):4106-4114.
18. Ovchinnikov DA, van Zuylen WJ, DeBats CE, Alexander KA, Kellie S, Hume DA. Expression of Gal4-dependent transgenes in cells of the mononuclear phagocyte system labeled with enhanced cyan fluorescent protein using Csf1r-Gal4VP16/UAS-ECFP double-transgenic mice. *J Leukoc Biol.* 2008;83(2):430-433.
19. Chousterman BG, Boissonnas A, Poupel L, et al. Ly6Chigh monocytes protect against kidney damage during sepsis via a CX3CR1-dependent adhesion mechanism. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(3):792-803.
20. Dorgham K, Ghadiri A, Hermand P, et al. An engineered CX3CR1 antagonist endowed with anti-inflammatory activity. *J Leukoc Biol.* 2009;86(4):903-911.
21. Anderson KG, Mayer-Barber K, Sung H, et al. Intravascular staining for discrimination of vascular and tissue leukocytes. *Nat Protoc.* 2014;9(1):209-222.
22. Girgis NM, Gundra UM, Ward LN, Cabrera M, Frevert U, Loke P. Ly6C(high) monocytes become alternatively activated macrophages in schistosome granulomas with help from CD4+ cells. *PLoS Pathog.* 2014;10(6):e1004080.
23. Rodero MP, Poupel L, Loyher PL, et al. Immune surveillance of the lung by migrating tissue monocytes. *eLife.* 2015;4:e07847.
24. Sauter KA, Pridans C, Sehgal A, et al. The MacBlue binary transgene (csf1r-gal4VP16/UAS-ECFP) provides a novel marker for visualisation of subsets of monocytes, macrophages and dendritic cells and responsiveness to CSF1 administration. *PLoS One.* 2014;9(8):e105429.
25. Carlin LM, Stamatiades EG, Auffray C, et al. Nr4a1-dependent Ly6C(low) monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal. *Cell.* 2013;153(2):362-375.
26. Thomas G, Tacke R, Hedrick CC, Hanna RN. Nonclassical patrolling monocyte function in the vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35(6):1306-1316.
27. Andonegui G, Bonder CS, Green F, et al. Endothelium-derived Toll-like receptor-4 is the key molecule in LPS-induced neutrophil sequestration into lungs. *J Clin Invest.* 2003;111(7):1011-1020.
28. Andonegui G, Zhou H, Bullard D, et al. Mice that exclusively express TLR4 on endothelial cells can efficiently clear a lethal systemic Gram-negative bacterial infection. *J Clin Invest.* 2009;119(7):1921-1930.
29. Soehnlein O, Lindbom L, Weber C. Mechanisms underlying neutrophil-mediated monocyte recruitment. *Blood.* 2009;114(21):4613-4623.
30. Zuchtriegel G, Uhl B, Hossenauer ME, et al. Spatiotemporal expression dynamics of selectins govern the sequential extravasation of neutrophils and monocytes in the acute inflammatory response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35(4):899-910.
31. Petit-Bertron AF, Fitting C, Cavaillon JM, Adib-Conquy M. Adherence influences monocyte responsiveness to interleukin-10. *J Leukoc Biol.* 2003;73(1):145-154.
32. Adib-Conquy M, Cavaillon JM. Compensatory anti-inflammatory response syndrome. *Thromb Haemost.* 2009;101(1):36-47.
33. Michaud JP, Bellavance MA, Préfontaine P, Rivest S. Real-time in vivo imaging reveals the ability of monocytes to clear vascular amyloid beta. *Cell Reports.* 2013;5(3):646-653.
34. Poupel L, Boissonnas A, Hermand P, et al. Pharmacological inhibition of the chemokine receptor, CX3CR1, reduces atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(10):2297-2305.

Article 3 : “Implication of resident and recruited macrophages in lung metastasis development and response to cancer therapies”

Pierre-Louis Loyher*, Pauline Hamon*, Aïda Meghraoui-Kheddar, Elena Goncalves, Sara Torstensson, Nadège Bercovici, Camille Baudesson de Chanville, Béhazine Combadière, Ariel Savina, Christophe Combadière, Alexandre Boissonnas

Manuscrit soumis et en révision.

Contexte de l'étude

Les macrophages associés aux tumeurs (TAM) représentent une population hétérogène très abondante dans le microenvironnement tumoral (TME). Les TAM sont décrits comme étant d'origine monocyttaire. La découverte de l'origine embryonnaire des macrophages tissulaires ouvre de nouvelles perspectives sur la composition des TAM en fonction de leur origine. Dans les tumeurs du cerveau, Bowman et al. ont montré que les TAM avaient une double origine entre les microglies et les macrophages dérivés de monocytes. Ils ont aussi mis en évidence des profils d'expression et des marqueurs différents entre les deux populations (Bowman et al., 2016). De même, une étude menée dans le cancer du pancréas retrouve ces deux origines tissulaires et monocytaires et caractérise des fonctions différentielles entre les deux populations (Zhu et al., 2017).

Le poumon est l'un des sites métastatiques les plus importants pour de nombreuses tumeurs primaires. En condition physiologique, le poumon regroupe plusieurs sous-populations macrophagiques telles que les macrophages alvéolaires ou les macrophages interstitiels. Les monocytes sont aussi très présents et surveillent le tissu pulmonaire depuis le réseau vasculaire qui le compose. L'origine des macrophages dans les tumeurs pulmonaires et les fonctions qui leurs sont associées ont été peu étudiées.

Nous savons maintenant que de nombreuses thérapies anticancéreuses ont des effets secondaires sur le système immunitaire. Certaines chimiothérapies alkylantes comme le cyclophosphamide (CP) provoquent une myéloablation transitoire suivit d'un rebond massif de cellules, telles que les monocytes, en provenance de la moelle osseuse (Jacquelin et al., 2013). Les TAM peuvent diminuer l'efficacité de certaines chimiothérapies et participer à la rechute après traitement par des mécanismes encore peu connus. Des combinaisons thérapeutiques sont mises au point pour pouvoir pallier à ces effets indésirables. Par exemple, des chimiothérapies alkylantes combinées à des anticorps anti-VEGF sont utilisées comme traitement du cancer du sein métastatique ou du cancer du poumon non à petites cellules avancés (Montero et al., 2012) ; (Cohen et al., 2007).

Durant cette étude, nous avons défini l'origine des populations de TAM présentes dans des modèles de métastases pulmonaires entre macrophages résidents issus du tissu environnant et macrophages recrutés issus de l'infiltration et de la différenciation des monocytes grâce des souris transgéniques exprimant des rapporteurs de fluorescence des populations myéloïdes. Nous avons caractérisé la localisation et les fonctions de ces macrophages en utilisant des techniques d'imagerie *in situ*, des analyses transcriptomiques et de la cytométrie en flux multiparamétrique. Puis, nous nous sommes intéressés à la réponse des monocytes et des sous-populations de TAM après traitement par chimiothérapie seule ou combinée avec un anticorps anti-VEGF.

Principaux résultats

Les TAM dans les métastases pulmonaires ont une double origine entre TAM recrutés et TAM résidents

Les cellules tumorales de la lignée TC-1 sont issues d'un carcinome pulmonaire. Leur injection en intraveineux dans la souris leur permet de se loger naturellement dans le poumon

conduisant au développement de nodules métastatiques. Ces nodules sont composés de nombreuses populations myéloïdes différentes que nous avons pu caractériser grâce à la cytométrie en flux multiparamétrique et à de nombreux marqueurs spécifiques (Figure 1). Les nombres de monocytes Ly6C^{high} et de macrophages CD64⁺ augmentent avec la croissance tumorale alors que les monocytes Ly6C^{low} et les DC ne sont pas significativement impactés et que le nombre de macrophages alvéolaires diminue. Le nombre de monocytes Ly6C^{high} augmente en partie dû à une infiltration dans le tissu alors que les monocytes Ly6C^{low} restent majoritairement intravasculaires. Une analyse supervisée a mis en évidence l'apparition d'une population transitoire de monocytes Ly6C^{high} CD64⁺ principalement extravasculaire, qui pourrait correspondre à un intermédiaire dans la différenciation des monocytes Ly6C^{high} en macrophages. La corrélation positive entre les macrophages CD64⁺ et le nombre de nodules dans le poumon a permis de comprendre que les macrophages interstitiels étaient impliqués dans la croissance tumorale et devaient correspondre aux TAM.

Pour valider cette observation, nous avons croisé deux souches de souris transgéniques MacBlue x CX3CR1^{EGFP}. La souris MacBlue que j'ai présenté dans l'article 1, possède la particularité de n'exprimer l'ECFP que dans les monocytes et les cellules dérivées de monocytes et pas dans certains macrophages tissulaires à cause du promoteur tronqué du CSF-1R. Les souris CX3CR1^{EGFP} permettent de visualiser l'ensemble des monocytes et des macrophages. Dans les nodules pulmonaires, on dénombre des cellules ECFP/ECFP qui regroupent principalement des monocytes et des macrophages et des cellules EGFP qui sont principalement composés de macrophages. Ces deux sous-types de macrophages ont aussi été retrouvés dans un autre modèle de métastases pulmonaires par injection de cellules du carcinome pulmonaire de Lewis (LLC) et dans un modèle de métastases spontanées issues de tumeurs primaires mammaires PyMT. Les souris MacBlue x CX3CR1^{EGFP} combinées avec des souris invalidées pour le CCR2, dépourvues de monocytes circulants, ont un nombre de

macrophages ECFP/EGFP fortement diminué alors que le nombre de macrophages EGFP n'est pas modifié, ce qui suggère qu'ils se développent et prolifèrent indépendamment des monocytes. De même, des expériences de parabioses entre des souris MacBlue x CX3CR1^{EGFP} et des souris C57Bl/6 ont révélé que seules des cellules ECFP/EGFP étaient retrouvées dans les nodules des souris sauvages, confirmant leur origine de cellules du sang (Figure 2). Ainsi, nous avons pu distinguer deux origines de TAM. Les TAM ECFP/EGFP dits recrutés proviennent de l'infiltration et de la différenciation des monocytes Ly6C^{high} alors que les TAM EGFP dits résidents proviennent des macrophages interstitiels présents dans le tissu sain avant l'arrivée des cellules tumorales. De plus, ces TAM sont présents principalement au niveau des zones d'où proviennent les macrophages interstitiels comme la plèvre ou les voies aériennes.

Une analyse du transcriptome des deux populations de TAM a révélé que 604 gènes étaient différentiellement exprimés et qu'ils correspondaient principalement à des fonctions associées à la signalisation cellulaire, au développement cellulaire et tissulaire, à la mobilisation des cellules immunes et à la réponse inflammatoire. L'association du transcriptome à de l'imagerie *in situ* a permis de visualiser le comportement et la dynamique spécifique de chaque sous-type de TAM. Les TAM recrutés sont des cellules ovoïdes pouvant se déplacer rapidement et loin dans le tissu. Ils s'accumulent au niveau du front d'invasion tumoral et ils expriment des transcrits des protéines F7 (facteur de coagulation 7), THBS1 (Thrombospondine 1), MARCO (Macrophage Receptor with collagenous structure), MMP8 (metallopeptidase de la matrice) et TNFS14 (membre 14 de la superfamille du TNF). L'ensemble de ces résultats indiquent que les TAM recrutés participent au remodelage de la matrice extracellulaire et à l'invasion tumorale.

Les TAM résidents possèdent des dendrites et forment un réseau connecté dans le nodule. Ils ont une mobilité réduite, peuvent être périvasculaires et expriment VCAM1 (molécule d'adhésion avec l'endothélium vasculaire) permettant des interactions avec le système vasculaire. Ils sont associés au collagène du TME, ce qui s'accorde avec l'expression de transcrits de protéines telles que COL14A1 (collagène de type 14), ARAP3 (molécule impliquée dans le réarrangement du cytosquelette et la forme de la cellule) ou FGF-1 (Facteur de croissance des fibroblastes). Ils expriment aussi les transcrits pour le CCL2 et le CXCL13, ce qui peut impliquer des interactions avec les TAM recrutés, les monocytes et les autres cellules immunes. L'ensemble de ces données montrent le rôle des TAM résidents dans le recrutement cellulaire et la mise en place du TME (Figure 4).

La réponse à la chimiothérapie des TAM recrutés et résidents est différente

La molécule chimiothérapeutique utilisée dans ce modèle d'injection unique est le cyclophosphamide (CP). Il a un effet direct sur la déplétion des cellules tumorales et induit aussi la déplétion des cellules immunitaires. Les TAM résidents et recrutés sont détruits 3 jours après l'injection de CP. Les TAM recrutés sont rapidement reconstitués grâce au rebond de monocytes Ly6C^{high} et à leur infiltration du site tumoral entre 5 et 10 jours après traitements. La reconstitution des TAM résidents est beaucoup plus faible et retardée. Les TAM recrutés vont phagocyter les cellules tumorales détruites jusqu'à 15 jours après CP (Figure 5).

Le traitement anti-VEGF améliore l'efficacité de la chimiothérapie et réduit la survie des TAM

Le premier rôle du traitement anti-VEGF est de stopper l'angiogenèse pour diminuer la croissance tumorale. L'utilisation de cet anticorps injecté tous les 2 jours après l'injection de CP améliore l'efficacité de la chimiothérapie en traitant à des phases précoces et tardives du

développement tumoral (Figure 7). Nous avons montré que l'anti-VEGF seul pouvait cibler directement les 2 types de TAM qui expriment le récepteur du VEGF, FLT1. La combinaison thérapeutique stoppe la reconstitution des TAM sans empêcher le rebond et l'infiltration des monocytes.

Conclusion et perspectives

Cette étude a permis la mise en évidence d'une dualité dans l'origine des TAM dans le TME de métastases pulmonaires. Ce modèle d'injection en intraveineux permet aux cellules tumorales d'origine pulmonaire d'aller se loger par elles-mêmes dans le poumon, mimant ainsi le processus métastatique. Il est cependant vrai que ces métastases ne sont pas issues d'une tumeur primaire déjà présentes et ne subissent pas les difficultés d'adaptation que peuvent avoir les cellules d'un autre type tissulaire. C'est pourquoi nous avons validé notre modèle en utilisant les souris développant des métastases pulmonaires issues de tumeurs mammaires spontanées PyMT. Dans ces souris, nous retrouvons le même environnement tumoral et la même distribution et composition entre les monocytes et les TAM résidents et recrutés.

Dans les métastases pulmonaires, les TAM recrutés proviennent de l'infiltration et de la différenciation des monocytes Ly6C^{high} dépendant de l'axe CCL2/CCR2. Les TAM résidents sont issus des macrophages interstitiels (IM) déjà présents dans le tissu sain avant l'arrivée des cellules tumorales. Les IM sont peu étudiés dans le poumon et leur origine n'est pas certaine. Il semblerait tout de même qu'une partie d'entre eux soit d'origine embryonnaire, même si nous n'avons pas pu pour l'instant confirmer cette hypothèse. Une étude est parvenue à différencier trois sous-populations de macrophages interstitiels en se basant sur une analyse transcriptomique et fonctionnelle et il serait intéressant de savoir si une ou plusieurs de ces sous-populations est à l'origine des TAM résidents (Gibbins et al., 2017).

Cela nous donnerait de nouvelles données pour caractériser les TAM résidents et pour savoir comment les IM deviennent des TAM.

Nous nous sommes beaucoup intéressés aux phénomènes de phagocytose pendant le développement tumoral et la réponse à la chimiothérapie. Cependant, le rôle de la phagocytose dans la rechute tumorale n'est pas clair car on ne sait pas si cette fonction est associée à une réponse pro- ou anti-tumorale. Il reste encore à définir si elle permet de nettoyer les nodules pour créer des niches favorables à la croissance des cellules tumorales résistantes ou si elle conduit à de la présentation antigénique nécessaire pour induire une réponse T effectrice efficace. De plus, environ 10 jours après chimiothérapie, il y a une réorganisation du TME et il apparaît que certains TAM peuvent entourer les cellules tumorales vivantes. Ce phénomène pourrait être protecteur et participer à la rechute.

L'association de fonctions pro-tumorales avec l'origine des TAM apporte une nouvelle vision du rôle de ces macrophages dans le développement tumoral et affine notre compréhension sur la participation de ces cellules à la résistance aux thérapies anti-tumorales. La première cible de la combinaison thérapeutique avec l'anti-VEGF était la diminution de l'angiogenèse induite par le VEGF, très présente pendant la phase de rechute après traitement. Cette combinaison semble parallèlement réduire la survie des TAM, ce qui améliore l'efficacité de la chimiothérapie seule sans modifier le recrutement ni l'infiltration des monocytes. Ainsi, nous avons démontré l'implication que pouvait avoir ce traitement sur les TAM et proposé des éléments de réponses dans l'optimisation des traitements anti-cancéreux.

Implication of resident and recruited macrophages in lung metastasis development and response to cancer therapies

Pierre-Louis Loyher^{1*}, Pauline Hamon^{1*}, Aïda Meghraoui-Kheddar¹, Elena Goncalves¹, Sara Torstensson¹, Nadège Bercovici², Camille Baudesson de Chanville¹, Béhazine Combadière¹, Ariel Savina³, Christophe Combadière¹ and Alexandre Boissonnas¹.

¹ Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06 UMR_S1135, Institut universitaire de cancérologie (IUC), Inserm U1135, CNRS ERL8255, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses, 91 Boulevard de l'Hôpital, F-75013, Paris, France.

²Inserm, U1016, Institut Cochin, CNRS UMR8104, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France.

³Institut Roche, 30, Cours de l'Île Seguin, 92650 Boulogne-Billancourt Cedex, France.

Corresponding author: alexandre.boissonnas@upmc.fr

*P.L. and P.H. contributed equally to this work

Summary

Tissue-resident macrophages can self-maintain without contribution of bone marrow monocytes. Tumor-associated macrophages (TAMs), on the other hand, are considered to originate exclusively from adult monocytes. Herein we challenge this current concept showing that TAMs in mouse lung metastases are derived from both resident interstitial macrophages and CCR2-dependent recruited monocytes, each harboring specific transcriptomic profiles, cellular functions and dynamics. Resident TAMs formed a dense interconnected network surrounding tumor cells, collagen fibers and blood vessels, whereas recruited TAMs were more abundant at the tumor margin and enhanced metastasis expansion. Both cell subsets were sensitive to chemotherapy but recruited TAMs rapidly recovered and carried out phagocytosis-mediated tumor clearance. Interestingly, combined anti-VEGF treatment inhibited TAMs reconstitution without affecting monocyte infiltration and enhanced chemotherapy efficacy. Our results unveil distinctive roles of TAMs in metastasis development and impacts of cancer therapies relative to their ontogeny.

Introduction:

Tumor cells are surrounded by a complex cellular ecosystem of host cells and constantly interact with it. These host cells, the tumor cells, as well as, architectural components form the so-called tumor-microenvironment (TME), regulating malignant potential but also contributing to tumor heterogeneity. Tumor-associated macrophages (TAMs) are the most abundant host cells within the TME, forming a network of heterogeneous cells (Qian and Pollard, 2010).

Through their various cellular processes, TAMs build the collagenous niche of the TME (Afik et al., 2016), enhance invasiveness (Wyckoff et al., 2007), growth (Pollard, 2004), angiogenesis (Lewis et al., 2016), metastasis (Kitamura et al., 2015) and act as barrier against the anti-tumor response (Boissonnas et al., 2013; Broz et al., 2014). Their contribution to this pro-tumoral niche starts as soon as the arrival of pioneer metastatic cells in the lung interstitium for instance, allowing further metastasis establishment (Headley et al., 2016). TAMs are also implicated in chemoresistance, as well as, relapse after chemotherapy, although they can in some cases be required for optimal therapy response (De Palma and Lewis, 2013).

TAMs are believed to be derived from circulating monocytic precursors (Franklin et al., 2014). However, in many tissues, pools of resident macrophages have been identified; these originate from embryonic precursors and self-maintain independently of hematopoietic stem cells (Perdiguero et al., 2015). Distinct transcriptional programs initiated in embryonic, fetal or adult progenitors (Mass et al., 2016) and the exposure to specific tissue environments (Gosselin et al., 2014; Lavin et al., 2014) may explain the specialization and diversity of macrophages in healthy as well as neoplastic tissues. Whether tissue-resident macrophages have a specific contribution to tumor growth remains unknown.

Common chemotherapies aim to preferentially target neoplastic cells on the basis of their high proliferation rate. Inevitable side effects occur through the ablation of healthy proliferating cells, in particular those of the immune system. While beneficial effects have been observed on the stimulation of adaptive immune response by standard chemotherapies, complete tumor

rejection is rare (Galluzzi et al., 2015). Transient myeloablation induced by alkylating chemotherapy is followed by a rapid and massive recovery of both hematopoietic progenitors and mature monocytes through a mobilization from the bone marrow (Jacquelin et al., 2013). TAMs have been shown to limit the efficacy of chemotherapeutic agents (Ruffell et al., 2014) and to promote tumor relapse (Hughes et al., 2015). TAMs also contribute to tumor revascularization by promoting the release of proangiogenic factors such as VEGFA, which is known to play a pivotal role in tumor recurrence post-therapy (Motz and Coukos, 2011). Indeed, the anti-VEGF antibody Bevacizumab has been shown to improve treatment efficacy when combined to chemotherapy in metastatic breast cancer patients (Manso et al., 2015; von Minckwitz et al., 2014).

In this study, the sequence of monocyte extravasation and differentiation into TAMs along lung metastasis development was characterized. The TAM network in lung metastasis was further studied based on transgenic fluorescent reporter mice that enable the discrimination of the lung mononuclear phagocyte subsets according to their origin and localization (Rodero et al., 2015). We showed that it is intermingled by both tissue-resident and recruited macrophages, differentially represented in TME according to the anatomical site of tumor development and differentially involved in several cellular pathways according to their transcriptome. Finally, we highlight the respective implication of the different mononuclear phagocytic cell subsets on the response to chemotherapy and provide new insights into the mechanism of action of anti-VEGF treatment.

Results

Blood/Tissue partitioning reveals lineage differentiation sequence of TAMs

The transformed lung epithelial TC-1 cells, naturally and exclusively, home to the lung and form metastatic nodules after i.v. injection (Ji et al., 1998). The tumor-associated myeloid compartment was characterized according to previously described phenotypes (Misharin et al., 2013). Briefly; Ly6C^{high} and Ly6C^{low} monocyte (Mo) subsets (CD11b^{high}Siglec-F^{low}Ly6G^{low}Fc-gamma receptor 1 (CD64)), interstitial macrophages (CD11b^{high}Siglec-F^{low}Ly6G^{low}CD64⁺), alveolar macrophages (AMs) (CD11b^{low}CD11c^{high}Siglec-F^{high}), CD11b⁺ Dendritic cells (DC) (CD11b⁺I-Ab⁺ CD11c⁺Ly6C⁻CD64⁻) and CD11b⁻ DC (CD11b⁻I-Ab⁺CD11c⁺Ly6C⁻CD64⁻), neutrophils (CD11b^{high}Ly6G⁺) and eosinophils (CD11b^{high}Siglec-F^{int}) were all identified (**Figure S1A**). The anatomic distribution of these subsets was monitored by blood/tissue partitioning using intravascular CD45 staining (Rodero et al., 2015).

The tumor-associated myeloid signature and compartmentalization was monitored using a non-supervised viSNE analysis based on 12 parameters (**Figure 1A and Figure S2**) along tumor evolution. As we previously demonstrated (Rodero et al., 2015), in the absence of tumor Ly6C^{high}, Ly6C^{low}-Mo and neutrophils resides almost exclusively within lung vessels (intravascular CD45 bright) (**Figure 1A**) whereas AMs, resident interstitial and pleural Ly6C⁻CD64⁺ macrophages, as well as, CD11b⁺ DC and CD11b⁻ CD103⁺ DC subsets were detected in the lung parenchyma only. With tumor expansion, a signature of parenchymal Ly6C^{high}-Mo appeared together with a progressive and massive accumulation of cells in the CD64⁺ macrophage signature in accordance with the recruitment of monocyte-derived macrophage. In contrast, the Ly6C^{low}-Mo signature remained exclusively in the intravascular compartment during tumor growth (**Figure 1A**). A small CD206^{bright} CD11c^{low} macrophage subset was already detected in tumor-free lungs and also expanded with tumor growth suggesting that lung interstitial macrophages might participate in macrophage accumulation (**Figure 1A, Figure S2**). We next performed a supervised analysis based on Ly6C and CD64 expression excluding neutrophils and AMs and quantified their distribution between the vasculature and

the lung parenchyma (**Figure 1B-D**). As observed in the viSNE analysis, an increased proportion of Ly6C^{high}-Mo infiltrated the lung parenchyma in the presence of the tumor cells. Over time, CD64 upregulation by Ly6C^{high} cells was observed along with a progressive loss of Ly6C expression, suggesting that Ly6C^{high} CD64⁺ cell represents an intermediate precursor in the process of Ly6C^{high}-Mo differentiation into Ly6C⁻ CD64⁺ macrophages (**Figure 1B**). The Ly6C^{high} CD64⁺ intermediate was mainly parenchymal confirming a progressive differentiation ongoing with tumor infiltration (**Figure 1C**). The number and proportion of parenchymal Ly6C^{high}-Mo increased during the early time points (**Figure 1D**), whereas Ly6C^{low}-Mo numbers were not significantly modified and remained mostly intravascular, as shown by both supervised and non-supervised analysis. Nr4a1-GFP^{bright} cells were only detected in the vascular Ly6C^{low}-Mo confirming that this subset does not contribute to the CD64⁺ macrophage accumulation suggesting that Ly6C^{high}-Mo differentiation into Ly6C^{low}-Mo and interstitial macrophages is distinct (**Figure S1B**). On day 20, the number of Ly6C^{high} CD64⁻-Mo per mg of tissue dropped (**Figure 1D**) while the total number reached a plateau (**Figure S1C**). The total number of AM tended to diminish with tumor expansion suggesting that they do not contribute to tumor growth and therefore should not be considered as tumor-associated macrophages (TAMs) (**Figure S1C**). In contrast, the number of interstitial CD64⁺ macrophages increased exponentially with tumor growth. CD11b⁺ and CD11b⁻ DC subsets increased in number with tumor expansion but at a slower rate compared to CD64⁺ macrophages (**Figure S1C**). The count of interstitial macrophages per mg of tissue correlated with the number of metastatic nodules (**Figure 1E**), this subset will therefore be referred to as TAMs henceforth in this study, also designated elsewhere as metastasis-associated macrophages (Qian et al., 2009). Upon differentiation, the recruited TAMs harbored similar phenotype than the resident lung interstitial macrophages, we thus hypothesized that TAMs are composed of cells from both origin.

MacBlue x *Cx3cr1*^{EGFP/+} reporters discriminate TAMs of different origins

We previously demonstrated that MacBlue x *Cx3cr1*^{EGFP/+} mouse can be used to study monocyte and macrophage subsets in lungs. In this model, ECFP and EGFP expressions enable the discrimination of subsets in regard to origin, spatial organization and function (Rodero et al., 2015).

TC-1 pulmonary metastases were highly infiltrated by both EGFP⁺ positive and ECFP⁺EGFP⁺ double positive cells (**Figure S3A**). Flow cytometry confirmed that EGFP⁺ subsets were mainly composed of the previously defined TAMs (68%), while ECFP⁺EGFP⁺ subsets were mainly composed of AMs (16.6%), Ly6C^{high}-Mo (4.9%), Ly6C^{high} CD64⁺-Mo (8.8%) and TAMs (48.7%). These results demonstrate that the MacBlue x *Cx3cr1*^{EGFP/+} model enables a complete visualization of the TAM network where two subsets of TAMs can be clearly distinguished (**Figure S3B**). viSNE analysis of the tumor-bearing MacBlue x *Cx3cr1*^{EGFP/+} revealed that EGFP⁺ TAMs and ECFP⁺EGFP⁺ TAMs display similar heterogeneous expression of CD206, CD11c and IA-b, showing that the difference between the two subsets must be due to other factors than maturation or polarization state (**Figure 2A**). To gain more insight into the origin of TAMs, the distribution of EGFP⁺ or ECFP⁺EGFP⁺ TAMs in pulmonary metastasis of MacBlue x *Cx3cr1*^{EGFP/+} x *Ccr2*^{-/-} mice, which have a defective monocyte recruitment, were analyzed. In pulmonary nodules of WT mice the ratio of ECFP⁺EGFP⁺/EGFP⁺ cells was 0.57±0.1 whereas the corresponding ratio was 0.14±0.08 in *Ccr2*^{-/-} mice. Fluorescent cells detected on histological lung sections from the recipient C57Bl6 in tumor inoculated parabiont mice were almost exclusively ECFP⁺EGFP⁺ (ratio ECFP⁺EGFP⁺/EGFP⁺ = 0.96±0.07) (**Figure 2B**). FACS analysis confirmed that ECFP⁺EGFP⁺ TAMs and Ly6C^{high}-Mo were substantially reduced in *Ccr2*^{-/-} mice whereas levels of AMs and EGFP⁺ TAMs were unaffected (**Figure 2C**). These results demonstrate that ECFP⁺EGFP⁺ TAMs originate from recruited monocyte, whereas EGFP⁺ TAMs arise from local proliferation of resident interstitial macrophages. These two TAM subsets were also present in Lewis lung carcinoma pulmonary metastasis (**Figure S4A**) as well as in pulmonary metastasis from the spontaneous breast cancer of the MacBlue x *Cx3cr1*^{EGFP/+} x PyMT-ChOVA mouse model (**Figure S4B**), concluding that these distinct TAM

subsets are not specific to the TC-1 experimental model. We proceeded by investigating if the composition of resident and recruited TAMs depends on the anatomical location of the tumor. In metastasis located nearby the pleura, resident TAMs showed a relative distribution with a falling gradient with distance from the lung pleura, while the recruited TAMs distribution was equal (**Figure S4C**). In metastasis that developed in the central alveolar space of the lung, EGFP⁺ resident TAMs represented 40.5±7.8% of the total TAMs. In contrast, metastasis that developed near large airways, where EGFP⁺ interstitial macrophages are initially located in the healthy lung, displayed a higher representation of resident TAMs, namely 65±8.6% (**Figure S4D**). Subcutaneous injection of the cell line TC-1 generates solid tumors that almost exclusively are composed of ECFP+EGFP⁺ TAMs. In contrast, intradermal injection give rise to tumors composed of both ECFP+EGFP⁺ and EGFP⁺ TAMs (**Figure S4E**). This suggests that the relative composition of resident and recruited TAMs in the TME is determined by the specific site of tumor development and thus might differentially promote the anatomic expansion of tumor cells.

Recruited TAMs enhance metastasis expansion

TAMs have been implicated in the enhancement of tumor invasion and metastasis. Histological analysis showed that metastasis were smaller and more isolated in CCR2-deficient compared to WT mice (**Figure 3A**). This suggests that recruited TAMs enhance tumor expansion that may lead to the fusion of distant nodules in WT mice (**Figure 3B**). Overall, the relative distribution of metastasis in the lung pleura, nearby large airways and the alveolar space differed between WT and *Ccr2*^{-/-} mice (**Figure 3A**). Along with metastasis expansion, accumulation of recruited TAMs was observed at the tumor margin in accordance with their role in tumor invasiveness, whereas resident TAMs remained more numerous in the tumor core (**Figure 3C-D**). We conclude that recruited TAMs are associated with metastasis expansion.

Resident and recruited TAMs display different functional profiles.

In order to get a better understanding of the relative function of the two TAM subsets, EGFP⁺ and ECFP⁺EGFP⁺ TAMs were sorted and a whole transcriptome microarray analysis was performed. Up to 604 differentially expressed genes (either up or down, with a p-value <0.05 by student's *t* test) were identified between the two TAM subsets (**Figure 4A**).

Their association with functional groups were identified by the Ingenuity Knowledge Base and the most relevant groups with a cut-off value at p<0.01, given by the score from Fisher's Exact Test) were listed (**Figure 4B**). These functional groups were involved in cellular signaling, cell morphology and trafficking, tissue remodeling associated to cancer development. The majority of these genes presented direct or indirect relationships as displayed by the graphical representation of the molecular relationships of the top 4 functional networks, generated by the Ingenuity Pathway Analysis application (including more than 14 molecules in each network) (**Figure S5**). These networks involved several cytokines and growth factors, membrane receptors, intracellular signaling molecules and transcription regulators, demonstrating that the two TAM subsets react differentially to the tumor microenvironment and exert distinct functions (**Figure 4A-B and Figure S5**). Based on these results, the behavior of the two TAM subsets was analyzed by live imaging of explanted tumor-bearing lungs. The dynamics of ECFP⁺EGFP⁺ cells were heterogeneous; either with slow motility, displaying long interactions with the EGFP⁺ TAMs, or with higher velocity and track straightness (**Figure 4C-D and video 1**). EGFP⁺ cells harbored a more stellar-like morphology compared to ECFP⁺EGFP⁺ cells. They extended protrusions in between the tumor cells providing a surrounding dynamic interconnecting structure (**Figure 4C and video 1**), often intertwined with the collagen matrix (**Figure 4E**). Resident TAMs were also abundantly perivascular (**Figure 4F and video 2**). The transcriptomic signature linked to interactions with the extracellular matrix and the vasculature was compared between the TAMs subsets. The growth factor *Fgf1* and collagen *Col14a1* transcripts were all up-regulated in resident TAMs, as well as *Vcam1* and *Arap3*, involved in adhesion-dependent processes and angiogenesis (Gambardella et al., 2010), and *Plxna2* and

Plxna4 which represent important regulators of angiogenesis and metastatic spreading (Tamagnone, 2012) (**Figure 4G**). VCAM1 expression was confirmed at the protein level and defined a marker restricted to the resident TAM subset (**Figure 4H**). Resident TAMs also showed a propensity to express higher levels of *Ccl2* transcripts. Correspondingly, the transcripts *Marco*, *Mmp8*, *F7*, *Tnfs14* and *Thbs1*, were found to be expressed at higher levels in recruited compared to resident TAMs (**Figure 4G**). We concluded that while resident TAMs seem to be associated with structural organisation of the tumor environment, recruited TAMs are associated with matrix remodeling and tumor invasion.

Distinct sensitivity and recovery of recruited and resident TAMs after chemotherapy

The effect of alkylating-based chemotherapy on the two TAM subsets was next investigated. A single injection of cyclophosphamide (CP) led to a transient elimination of lung metastasis which relapsed 15 days after chemotherapy (**Figure 5A**). The number of circulating Ly6C^{high}-Mo was slightly reduced 2 days after chemotherapy, but recovered with a significant overshoot between day 5 and day 10 post therapy. Circulating Ly6C^{low}-Mo displayed a delayed recovery compared to Ly6C^{high}-Mo but both monocyte subsets finally dropped down at day 15 post CP correlating with tumor relapse (**Figure 5B**). In the lungs, intravascular Ly6C^{high} and Ly6C^{low} monocytes were also depleted 2 days after CP injection, whereas depletion of parenchymal Ly6C^{high} CD64⁺-Mo and TAMs occurred one day later. Ly6C^{high}-Mo and TAMs transiently rebounded respectively at day 5 and day 10 after CP treatment (**Figure 5C-D**). Resident and recruited TAMs were both depleted by CP treatment, however, during the recovery phase, recruited TAMs were enriched compared to resident TAMs in accordance with the massive rebound of Ly6C^{high}-Mo (**Figure 5E**). We concluded that chemotherapy depleted TAMs which are rapidly and mainly reconstituted from blood monocytes.

Recruited TAMs clear apoptotic tumor cells after chemotherapy

The role of recruited TAM following CP treatment was further investigated. Five days after chemotherapy, the density of tumor cells in metastasis was lower compared to untreated mice

(Figure 6A). At this time point, ECFP⁺EGFP⁺ cells were more numerous than EGFP⁺ cells compared to untreated mice and were surrounding living tumor cells **(Figure 6A)**. Accumulation of ECFP⁺EGFP⁺ cells was also seen in areas with apoptotic tumor bodies. The recruited cells displayed different morphologies; either round shaped with reduced motility or stellar with extending cytoplasmic protrusions **(Figure 6B and Video 3)**. Between 10 and 15 days after CP injection, neoplastic structures were progressively cleared of fluorescent tumor cells showing large accumulations of apoptotic bodies and phagocytic cells **(Figure 6A-C)**. Remaining live tumor cells were however still detectable at these time points, surrounded by numerous resident and recruited TAMs **(Video 4)**. Recruited TAMs represented the most abundant phagocytic subsets early after CP treatment **(Figure 6D)**.

Anti-VEGF targets TAM accumulation but not monocyte recruitment and enhance chemotherapy efficacy

The pro-angiogenic molecule VEGF has been implicated in vessel reconstruction and tumor relapse following chemotherapy (Hughes et al., 2015; Lewis et al., 2016). VEGF could act directly on TAMs, as they have been shown to express VEGFR1 (FLT1) in lung metastases (Qian et al., 2015). We next address whether anti-VEGF preferentially targets one TAM subset. Both subsets expressed similar level of FLT1 **(Figure 7A)**. FLT1 expression was already detected on Ly6C^{high} CD64⁺ cells, but the expression on Ly6C^{high} and Ly6C^{low}-Mo was low **(Figure S6A)**. VEGF was found mainly along blood vessels but also in the tumor parenchyma in close proximity to TAMs **(Figure S6B)**. Anti-VEGF treatment led to a significant reduction in the number of TAMs, but the proportion of resident and recruited TAMs was similar, suggesting that both macrophage subsets are targeted by this treatment **(Figure 7B)**. To further confirm that anti-VEGF does not affect TAM recruitment, we adoptively transferred bone-marrow monocytes in anti-VEGF or isotype treated WT mice. The relative proportion of recovered TAMs was significantly reduced at the expense of Ly6C^{high}-Mo while the extravasation (CD45⁺) of the latter was unchanged, indicating that anti-VEGF do not block monocyte infiltration but rather reduce their differentiation into TAMs and/or TAMs survival **(Figure 7C)**.

The combination of anti-VEGF with chemotherapy has shown greater efficacy than chemotherapy or targeted therapy alone in patients bearing non-small cell lung cancer and metastatic breast cancer (Cohen et al., 2007; Montero and Gluck, 2012). Anti-VEGF was injected from day 10 at the same time as cyclophosphamide, and was continued every two days until day 18 (**Figure 7D**). We determined the impact of the combined therapy on the myeloid signatures of the tumor microenvironment using the previously described viSNE analysis (**Figure 1A and S6C**). The combined regimen induced a specific reduction of the TAM signature (dark blue signature), while the parenchymal monocyte subset (red signature) persisted compared to single CP or anti-VEGF treatments (**Figure S6C**). Quantification of the number of cell/mg of tissue confirmed that the combination of CP and anti-VEGF blocked TAM recovery between days 15 and 20, whereas neither the Ly6C^{high}-Mo rebound nor their parenchymal infiltration were affected (**Figure 7D and S6D**). The efficacy of the combined therapy was evaluated on advanced stage of tumor development (Day 20 after tumor inoculation) and showed prolonged mice survival with normalization of the lung weight, compared to both treatment alone (**Figure 7E**).

Discussion

The lung environment is densely colonized by subsets of mononuclear phagocytic cells displaying various spatial organization, functions and dependence for blood monocytes in their maintenance. Elegant studies have highlighted the embryonic origins of most tissue-resident macrophages (Perdiguero et al., 2015). In contrast to alveolar macrophages (Guilliams et al., 2013) or lung DC (Thornton et al., 2012), little is known about the functions and origin of lung interstitial macrophages. A recent study indicates that a population of interstitial macrophages, seeded during embryonic development, persists in peripheral and perivascular regions of the adult lung. On the other hand, monocyte-derived cells diffuse throughout the interstitium only after birth (Tan and Krasnow, 2016). The origin of TAMs has not yet been fully established, and they are currently considered to be mainly derived from recruited monocytes. The implication of the chemokine receptor CCR2 in the recruitment of monocytes and on the subsequent differentiation of these into TAMs, is well established in both primary and metastatic sites of various tumor types. This CCR2/CCL2 axis contributes to an amplification loop of tumor progression (Franklin et al., 2014; Kitamura et al., 2015; Loyher et al., 2016). In situ proliferation has been demonstrated to contribute to the accumulation of macrophages in tumors (Tymoszuk et al., 2014). Based on the MacBlue x *Cx3cr1*^{EGFP/+} model, we unveiled an EGFP⁺ TAM subset that was unaffected by CCR2 deficiency and not reconstituted in parabiosis experiments, demonstrating that this subset originate from macrophages that were already present in the healthy lungs before tumor development. Lack of ECFP expression in subsets of CSFR1⁺ adult tissue-macrophages and tumor-associated macrophages was previously observed in the MacBlue mice. The differential utilization of the truncated CSFR1 promoter of the Macblue transgene in macrophages was proposed to reflect different survival dependency to CSF1 (Sauter et al., 2014). No doubt that the use of this reporter in other studies should reveal new insight into TAM biology. The presence of tissue-resident and monocyte-derived TAMs has recently been discovered in brain tumors (Bowman et al., 2016). Our study demonstrates that resident macrophages constitute an important fraction of the lung TAM compartment. Interestingly, only lung interstitial macrophages were involved in tumor

development while the AM pool progressively diminished with tumor growth and behave apparently excluded from tumor nodules (data not shown). Within metastatic nodules, the relative distribution and abundance of resident TAMs compared to the recruited ones were in accordance with the localization of interstitial macrophages prior to tumor development. However, we cannot directly conclude whether resident TAMs are of embryonic origin or long-lived adult monocyte-derived macrophages. Previous studies based on subcutaneously injected cell lines strongly argued in favor of an exclusive monocytic origin of TAMs (Cortez-Retamozo et al., 2012; Shand et al., 2014), which we also observed when TC-1 cells were injected by the same route. Contrariwise, when injected in the resident-APC rich dermis for instance, we could detect the presence of EGFP⁺ TAMs. Tissue-resident macrophages could contribute to the heterogeneity of different TME according to the anatomical site of tumor development. Nonetheless, in lung metastasis, monocyte-derived TAMs were slightly more abundant than their resident counterpart. Based on blood/tissue partitioning we have been able to characterize the sequence of monocyte infiltration and progressive differentiation into TAMs. We combined this technic with a large panel of surface antibody to efficiently discriminate the various lung mononuclear phagocytic cells and their compartmentalization. Early during lung metastasis development we observed an increase in the number of Ly6C^{high} monocytes. Extravasated Ly6C^{high}-Mo seemed to up-regulate CD64 leading to the appearance of an intermediate TAM precursor. At later time points, TAMs became from far the most abundant population and correlated with the number of metastatic nodules. Ly6C^{low}-Mo did not seem to extravasate, indicating that their recently described role in surveillance of metastasis is performed intravascularly (Hanna et al., 2015) and that these cells do not participate in TAM accumulation. The absence of GFP upregulation in the Nr4a1^{EGFP} reporter mouse suggests that the process of monocyte differentiation into TAM is Nr4a1-independent.

In situ imaging combined with transcriptomic comparison provided insight into the relative function of resident vs recruited TAMs. Resident macrophages formed a sessile, interconnected network embedded in collagen rich matrix. Collagen type XIV production by macrophages has recently been associated with the building of tumor collagenous matrix (Afik

et al., 2016). Indeed, resident TAMs displayed an upregulation of the *Col14a1* transcript but also transcripts associated with cell clustering and interaction with extracellular matrix. Their enhanced expression of *Vcam1* and *Plxna2-4* could be linked to their perivascular origin. Finally, a 3 fold enrichment in *Ccl2* transcript in resident TAMs argue in favor of a role in further monocyte recruitment to the TME. Recruited TAMs displayed increased motility, in accordance to enrich cellular movement associated pathways, and turn up to accumulate at the tumor margin. In this regard, *Mmp8* and *Tnfsf14* enrichment (implicated in airway remodeling (Doherty et al., 2011)) could argue for a licensing of recruited TAMs for the remodeling of the surrounding environment thereby enhancing metastasis expansion.

The appearance of pulmonary metastasis remains a lethal determinant in many cancers and various combinations have been implemented to improve the outcome of conventional therapies. The targeting of VEGF in combination with chemotherapy is approved by FDA for instance. Although TAMs have clearly been shown to participate to the processes of angiogenesis within tumor (Lewis et al., 2016), few studies have investigated the impact of this therapeutic combination on the immune cellular composition of the TME. Moreover, FLT1 expression and signaling by pulmonary TAMs is implicated in their protumoral activity partly via downstream regulation of the master macrophage regulator CSF1 (Qian et al., 2015). After a significant depletion of both resident and recruited TAMs, alkylating chemotherapy induced a massive rebound of bone marrow derived monocytes. This resulted in a more rapid CCR2-dependent reconstitution of recruited TAMs. VEGF has been proposed to act as a chemoattractant factor for monocytes (Grunewald et al., 2006; Kaplan et al., 2005) but the beneficial effect of anti-VEGF combination was associated with drastic reduction of both recruited and resident TAMs without affecting tumor-monocyte infiltration, suggesting that VEGF contribute to monocyte differentiation and TAM survival. Indeed, FLT1 expression was increased upon monocyte to macrophage differentiation, in accordance with previous studies (Barleon et al., 1996; Qian et al., 2015). The clinical relevance of our results lie in the fact that anti-VEGF could improve chemotherapy efficacy through functions that go beyond its main expected role on angiogenesis. Increasing knowledge into the impact of such molecule on

tumor-associated cells might allow to further develop and improve anticancer regimen's dosages and combinations, notably those simultaneously targeting the TME.

Author contribution

PL.L., P.H. designed, performed the experiments, analysed and interpreted the data and wrote the manuscript, A.MK., E.G. and B.C. analysed and interpreted the data, S.T. and C.BC. performed some experiments and wrote the manuscript. N.B. provided reagent and wrote the manuscript, A.S. and C.C. provided reagent, designed research. A.B. supervised the study, designed, performed the experiments, analysed and interpreted the data and wrote the manuscript.

Acknowledgments

The authors wish to thank the Plateforme Imagerie Pitié-Salpêtrière (PICPS) for assistance with the two-photon microscope, the animal facility "NAC" for mice breeding assistance and sequencing platform GENOM'IC (Institut Cochin, Paris, France). The authors also thanks M. Lambert for the tdTomato viral construct. A. Boissonnas received funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement n°304810 – RAIDs, Inserm, Roche, la "Ligue contre le cancer", and "Fondation ARC pour la recherche sur le cancer". P. Hamon is funded by la "Ligue contre le cancer". PL. Loyher is funded by "Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer".

Conflict of interest

Ariel Savina is employed by Roche.

References

- Afik, R., Zigmond, E., Vugman, M., Klepfish, M., Shimshoni, E., Pasmanik-Chor, M., Shenoy, A., Bassat, E., Halpern, Z., Geiger, T., *et al.* (2016). Tumor macrophages are pivotal constructors of tumor collagenous matrix. *J Exp Med* *213*, 2315-2331.
- Amir el, A. D., Davis, K. L., Tadmor, M. D., Simonds, E. F., Levine, J. H., Bendall, S. C., Shenfeld, D. K., Krishnaswamy, S., Nolan, G. P., and Pe'er, D. (2013). viSNE enables visualization of high dimensional single-cell data and reveals phenotypic heterogeneity of leukemia. *Nat Biotechnol* *31*, 545-552.
- Barleon, B., Sozzani, S., Zhou, D., Weich, H. A., Mantovani, A., and Marme, D. (1996). Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* *87*, 3336-3343.
- Boissonnas, A., Licata, F., Poupel, L., Jacquelin, S., Fetler, L., Krumeich, S., Thery, C., Amigorena, S., and Combadiere, C. (2013). CD8+ tumor-infiltrating T cells are trapped in the tumor-dendritic cell network. *Neoplasia* *15*, 85-94.
- Bowman, R. L., Klemm, F., Akkari, L., Pyonteck, S. M., Sevenich, L., Quail, D. F., Dhara, S., Simpson, K., Gardner, E. E., Iacobuzio-Donahue, C. A., *et al.* (2016). Macrophage Ontogeny Underlies Differences in Tumor-Specific Education in Brain Malignancies. *Cell Rep* *17*, 2445-2459.
- Broz, M. L., Binnewies, M., Boldajipour, B., Nelson, A. E., Pollack, J. L., Erle, D. J., Barczak, A., Rosenblum, M. D., Daud, A., Barber, D. L., *et al.* (2014). Dissecting the tumor myeloid compartment reveals rare activating antigen-presenting cells critical for T cell immunity. *Cancer Cell* *26*, 638-652.
- Chen, T. J., and Kotecha, N. (2014). Cytobank: providing an analytics platform for community cytometry data analysis and collaboration. *Curr Top Microbiol Immunol* *377*, 127-157.
- Cohen, M. H., Gootenberg, J., Keegan, P., and Pazdur, R. (2007). FDA drug approval summary: bevacizumab (Avastin) plus Carboplatin and Paclitaxel as first-line treatment of advanced/metastatic recurrent nonsquamous non-small cell lung cancer. *Oncologist* *12*, 713-718.
- Cortez-Retamozo, V., Etzrodt, M., Newton, A., Rauch, P. J., Chudnovskiy, A., Berger, C., Ryan, R. J., Iwamoto, Y., Marinelli, B., Gorbato, R., *et al.* (2012). Origins of tumor-associated macrophages and neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 2491-2496.
- De Palma, M., and Lewis, C. E. (2013). Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies. *Cancer Cell* *23*, 277-286.
- Doherty, T. A., Soroosh, P., Khorram, N., Fukuyama, S., Rosenthal, P., Cho, J. Y., Norris, P. S., Choi, H., Scheu, S., Pfeffer, K., *et al.* (2011). The tumor necrosis factor family member LIGHT is a target for asthmatic airway remodeling. *Nat Med* *17*, 596-603.
- Engelhardt, J. J., Boldajipour, B., Beemiller, P., Pandurangi, P., Sorensen, C., Werb, Z., Egeblad, M., and Krummel, M. F. (2012). Marginating dendritic cells of the tumor microenvironment cross-present tumor antigens and stably engage tumor-specific T cells. *Cancer Cell* *21*, 402-417.
- Franklin, R. A., Liao, W., Sarkar, A., Kim, M. V., Bivona, M. R., Liu, K., Pamer, E. G., and Li, M. O. (2014). The cellular and molecular origin of tumor-associated macrophages. *Science* *344*, 921-925.
- Galluzzi, L., Buque, A., Kepp, O., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2015). Immunological Effects of Conventional Chemotherapy and Targeted Anticancer Agents. *Cancer Cell* *28*, 690-714.
- Gambardella, L., Hemberger, M., Hughes, B., Zudaire, E., Andrews, S., and Vermeren, S. (2010). PI3K signaling through the dual GTPase-activating protein ARAP3 is essential for developmental angiogenesis. *Sci Signal* *3*, ra76.
- Gosselin, D., Link, V. M., Romanoski, C. E., Fonseca, G. J., Eichenfield, D. Z., Spann, N. J., Stender, J. D., Chun, H. B., Garner, H., Geissmann, F., and Glass, C. K. (2014). Environment drives selection and function of enhancers controlling tissue-specific macrophage identities. *Cell* *159*, 1327-1340.
- Grunewald, M., Avraham, I., Dor, Y., Bachar-Lustig, E., Itin, A., Jung, S., Chimenti, S., Landsman, L., Abramovitch, R., and Keshet, E. (2006). VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell* *124*, 175-189.

Guilliams, M., De Kleer, I., Henri, S., Post, S., Vanhoutte, L., De Prijck, S., Deswarte, K., Malissen, B., Hammad, H., and Lambrecht, B. N. (2013). Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *J Exp Med* *210*, 1977-1992.

Hamon, P., Loyher, P. L., Baudesson de Chanville, C., Licata, F., Combadiere, C., and Boissonnas, A. (2016). CX3CR1-dependent endothelial margination modulates Ly6Chigh monocyte systemic deployment upon inflammation in mice. *Blood*.

Hanna, R. N., Cekic, C., Sag, D., Tacke, R., Thomas, G. D., Nowyhed, H., Herrley, E., Rasquinha, N., McArdle, S., Wu, R., *et al.* (2015). Patrolling monocytes control tumor metastasis to the lung. *Science* *350*, 985-990.

Headley, M. B., Bins, A., Nip, A., Roberts, E. W., Looney, M. R., Gerard, A., and Krummel, M. F. (2016). Visualization of immediate immune responses to pioneer metastatic cells in the lung. *Nature* *531*, 513-517.

Hughes, R., Qian, B. Z., Rowan, C., Muthana, M., Keklikoglou, I., Olson, O. C., Tazzyman, S., Danson, S., Addison, C., Clemons, M., *et al.* (2015). Perivascular M2 Macrophages Stimulate Tumor Relapse after Chemotherapy. *Cancer Res* *75*, 3479-3491.

Jacquelin, S., Licata, F., Dorgham, K., Hermand, P., Poupel, L., Guyon, E., Deterre, P., Hume, D. A., Combadiere, C., and Boissonnas, A. (2013). CX3CR1 reduces Ly6Chigh-monocyte motility within and release from the bone marrow after chemotherapy in mice. *Blood* *122*, 674-683.

Ji, H., Chang, E. Y., Lin, K. Y., Kurman, R. J., Pardoll, D. M., and Wu, T. C. (1998). Antigen-specific immunotherapy for murine lung metastatic tumors expressing human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Int J Cancer* *78*, 41-45.

Jung, S., Aliberti, J., Graemmel, P., Sunshine, M. J., Kreuzberg, G. W., Sher, A., and Littman, D. R. (2000). Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol* *20*, 4106-4114.

Kaplan, R. N., Riba, R. D., Zacharoulis, S., Bramley, A. H., Vincent, L., Costa, C., MacDonald, D. D., Jin, D. K., Shido, K., Kerns, S. A., *et al.* (2005). VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* *438*, 820-827.

Kitamura, T., Qian, B. Z., Soong, D., Cassetta, L., Noy, R., Sugano, G., Kato, Y., Li, J., and Pollard, J. W. (2015). CCL2-induced chemokine cascade promotes breast cancer metastasis by enhancing retention of metastasis-associated macrophages. *J Exp Med* *212*, 1043-1059.

Lavin, Y., Winter, D., Blecher-Gonen, R., David, E., Keren-Shaul, H., Merad, M., Jung, S., and Amit, I. (2014). Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment. *Cell* *159*, 1312-1326.

Lewis, C. E., Harney, A. S., and Pollard, J. W. (2016). The Multifaceted Role of Perivascular Macrophages in Tumors. *Cancer Cell* *30*, 365.

Loyher, P. L., Rochefort, J., Baudesson de Chanville, C., Hamon, P., Lescaille, G., Bertolus, C., Guillot-Delost, M., Krummel, M. F., Lemoine, F. M., Combadiere, C., and Boissonnas, A. (2016). CCR2 Influences T Regulatory Cell Migration to Tumors and Serves as a Biomarker of Cyclophosphamide Sensitivity. *Cancer Res* *76*, 6483-6494.

Manso, L., Moreno, F., Marquez, R., Castelo, B., Arcediano, A., Arroyo, M., Ballesteros, A. I., Calvo, I., Echarri, M. J., Enrech, S., *et al.* (2015). Use of bevacizumab as a first-line treatment for metastatic breast cancer. *Curr Oncol* *22*, e51-60.

Mass, E., Ballesteros, I., Farlik, M., Halbritter, F., Gunther, P., Crozet, L., Jacome-Galarza, C. E., Handler, K., Klughammer, J., Kobayashi, Y., *et al.* (2016). Specification of tissue-resident macrophages during organogenesis. *Science* *353*.

Montero, A., and Gluck, S. (2012). Long-Term Complete Remission with nab-Paclitaxel, Bevacizumab, and Gemcitabine Combination Therapy in a Patient with Triple-Negative Metastatic Breast Cancer. *Case Rep Oncol* *5*, 687-692.

Moran, A. E., Holzapfel, K. L., Xing, Y., Cunningham, N. R., Maltzman, J. S., Punt, J., and Hogquist, K. A. (2011). T cell receptor signal strength in Treg and iNKT cell development demonstrated by a novel fluorescent reporter mouse. *J Exp Med* *208*, 1279-1289.

Motz, G. T., and Coukos, G. (2011). The parallel lives of angiogenesis and immunosuppression: cancer and other tales. *Nat Rev Immunol* 11, 702-711.

Ovchinnikov, D. A., van Zuylen, W. J., DeBats, C. E., Alexander, K. A., Kellie, S., and Hume, D. A. (2008). Expression of Gal4-dependent transgenes in cells of the mononuclear phagocyte system labeled with enhanced cyan fluorescent protein using Csf1r-Gal4VP16/UAS-ECFP double-transgenic mice. *J Leukoc Biol* 83, 430-433.

Perdiguero, E. G., Klapproth, K., Schulz, C., Busch, K., de Bruijn, M., Rodewald, H. R., and Geissmann, F. (2015). The Origin of Tissue-Resident Macrophages: When an Erythro-myeloid Progenitor Is an Erythro-myeloid Progenitor. *Immunity* 43, 1023-1024.

Pollard, J. W. (2004). Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 4, 71-78.

Qian, B., Deng, Y., Im, J. H., Muschel, R. J., Zou, Y., Li, J., Lang, R. A., and Pollard, J. W. (2009). A distinct macrophage population mediates metastatic breast cancer cell extravasation, establishment and growth. *PLoS One* 4, e6562.

Qian, B. Z., and Pollard, J. W. (2010). Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141, 39-51.

Qian, B. Z., Zhang, H., Li, J., He, T., Yeo, E. J., Soong, D. Y., Carragher, N. O., Munro, A., Chang, A., Bresnick, A. R., *et al.* (2015). FLT1 signaling in metastasis-associated macrophages activates an inflammatory signature that promotes breast cancer metastasis. *J Exp Med* 212, 1433-1448.

Rodero, M. P., Poupel, L., Loyher, P. L., Hamon, P., Licata, F., Pessel, C., Hume, D. A., Combadiere, C., and Boissonnas, A. (2015). Immune surveillance of the lung by migrating tissue monocytes. *Elife* 4, e07847.

Ruffell, B., Chang-Strachan, D., Chan, V., Rosenbusch, A., Ho, C. M., Pryer, N., Daniel, D., Hwang, E. S., Rugo, H. S., and Coussens, L. M. (2014). Macrophage IL-10 blocks CD8+ T cell-dependent responses to chemotherapy by suppressing IL-12 expression in intratumoral dendritic cells. *Cancer Cell* 26, 623-637.

Sauter, K. A., Pridans, C., Sehgal, A., Bain, C. C., Scott, C., Moffat, L., Rojo, R., Stutchfield, B. M., Davies, C. L., Donaldson, D. S., *et al.* (2014). The MacBlue binary transgene (csf1r-gal4VP16/UAS-ECFP) provides a novel marker for visualisation of subsets of monocytes, macrophages and dendritic cells and responsiveness to CSF1 administration. *PLoS One* 9, e105429.

Shand, F. H., Ueha, S., Otsuji, M., Koid, S. S., Shichino, S., Tsukui, T., Kosugi-Kanaya, M., Abe, J., Tomura, M., Ziogas, J., and Matsushima, K. (2014). Tracking of intertissue migration reveals the origins of tumor-infiltrating monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 7771-7776.

Tamagnone, L. (2012). Emerging role of semaphorins as major regulatory signals and potential therapeutic targets in cancer. *Cancer Cell* 22, 145-152.

Tan, S. Y., and Krasnow, M. A. (2016). Developmental origin of lung macrophage diversity. *Development* 143, 1318-1327.

Thornton, E. E., Looney, M. R., Bose, O., Sen, D., Sheppard, D., Locksley, R., Huang, X., and Krummel, M. F. (2012). Spatiotemporally separated antigen uptake by alveolar dendritic cells and airway presentation to T cells in the lung. *J Exp Med* 209, 1183-1199.

Tymoszek, P., Evens, H., Marzola, V., Wachowicz, K., Wasmer, M. H., Datta, S., Muller-Holzner, E., Fiegl, H., Bock, G., van Rooijen, N., *et al.* (2014). In situ proliferation contributes to accumulation of tumor-associated macrophages in spontaneous mammary tumors. *Eur J Immunol* 44, 2247-2262.

von Minckwitz, G., Puglisi, F., Cortes, J., Vrdoljak, E., Marschner, N., Zielinski, C., Villanueva, C., Romieu, G., Lang, I., Ciruelos, E., *et al.* (2014). Bevacizumab plus chemotherapy versus chemotherapy alone as second-line treatment for patients with HER2-negative locally recurrent or metastatic breast cancer after first-line treatment with bevacizumab plus chemotherapy (TANIA): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 15, 1269-1278.

Wyckoff, J. B., Wang, Y., Lin, E. Y., Li, J. F., Goswami, S., Stanley, E. R., Segall, J. E., Pollard, J. W., and Condeelis, J. (2007). Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. *Cancer Res* 67, 2649-2656.

Figure Legends

Figure 1: Blood/Tissue partitioning reveals lineage differentiation sequence of TAMs

(A) Representative tSNE dimension 1 and 2 plots of the lung myeloid compartment evolution after TC1 cell intravenous inoculation. Cell subsets are color grouped according to their biased definition described in Figure S1 (upper panel). Lower panels delineate cell blood/tissue partitioning over time. **(B)** Dot plots show Ly6C and CD64 expressions by CD11b^{high} Siglec-F⁻ Ly6G⁻ lung cells over time after tumor inoculation. **(C)** Histogram show blood/tissue partitioning of each subset at different time points (lower panels). For all plots, the mean percentage \pm SD are indicated. **(D)** Blood/tissue partitioning monitoring of lung monocytes and macrophages during tumor growth (Bars represent mean of the absolute number \pm SEM/mg of tissue). For all panels n=6-8 mice per time point out of 3 independent experiments, Two-way ANOVA with Bonferroni multiple comparisons test was performed. Only statistical differences compared to tumor-free mice day 0 are indicated for each compartment. *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001). **(E)** Linear regression of the correlation between the number of TAMs and the number of tumor nodules. See also Figures S1 and S2.

Figure 2: MacBlue x *Cx3cr1*^{EGFP/+} reporters discriminate TAMs of different origins

(A) Non-supervised tSNE dimension 1 and 2 analysis indicate the ECFP⁺EGFP⁺ (cyan gate) and EGFP⁺ (green gate) TAM signatures according to the relative expression intensity of each indicated phenotypic markers in TC-1 tumor-bearing MacBlue x *Cx3cr1*^{EGFP/+} mice at D15. **(B)** Lung cryo-sections show the distribution of ECFP⁺EGFP⁺ and EGFP⁺ cells in tumor-bearing MacBlue x *Cx3cr1*^{EGFP/+} (WT), MacBlue x *Cx3cr1*^{EGFP/+} x *Ccr2*^{-/-} (*Ccr2*^{-/-}) mice and C57Bl6 host parabiont with MacBlue x *Cx3cr1*^{EGFP/+} mice, 15 days after TC-1 inoculation. Right panel shows the quantification based on histological analysis. Each dot represents a distinct field of tumor nodules, data are pooled from 3 to 7 mice. ANOVA with Bonferroni multiple comparisons test was performed, ***: p<0.001. **(C)** Dot plots show the relative proportion of TAM subsets (left) and bars show the mean of the absolute number \pm SEM/mg of tissue (right) in tumor-bearing MacBlue x *Cx3cr1*^{EGFP/+} (WT) and MacBlue x *Cx3cr1*^{EGFP/+} x *Ccr2*^{-/-} (*Ccr2*^{-/-}) mice at day 15.

Data are pooled from 10 mice from 3 independent experiments. Two-way ANOVA with Bonferroni multiple comparisons test was performed, *: $p < 0.05$; ****: $p < 0.0001$. See also Figure S3 and S4.

Figure 3: Recruited TAMs enhance metastasis expansion

(A) Wide field image of a whole lung cryo-section 15 days after TC-1 inoculation in WT and *Ccr2*^{-/-} mice. White mask indicate metastasis size and distribution. Graphs show the quantification of nodule areas (left) (data are pooled from $n = 3-4$ mice in each group, Mediane with interquartile ranges are indicated, Mann-Whitney test was performed) and relative frequency of metastases in the different anatomical niches of the lungs in WT and *Ccr2*^{-/-} mice (right) (Bars indicated mean \pm SEM of 5 mice in each group. Two-way ANOVA with Bonferroni multiple comparisons test was performed). **(B)** Lung cryo-sections of TC-1 tumor-bearing MacBlue x *Cx3cr1*^{EGFP/+} (WT) or MacBlue x *Cx3cr1*^{EGFP/+} x *Ccr2*^{-/-} (*Ccr2*^{-/-}) mice at day 15. **(C)** Lung cryo-sections from TC-1^{tdtomato} tumor-bearing MacBlue x *Cx3cr1*^{EGFP/+} show recruited TAM accumulation at the progressing front of lung metastases at day 20 and **(D)** quantification of the abundance of resident and recruited TAMs in the tumor core or at the periphery. Bars represent mean \pm SEM of data pooled from 3 mice at each day. For all panels *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$.

Figure 4: Resident and recruited TAMs display different functional profiles

(A) Hierarchical clustering of differentially regulated transcripts distinguishes recruited and resident TAMs ($n = 4$ independent cell preparation in each group, each sorting where performed from a pool of 2 to 3 mice). **(B)** Enriched function groups that distinguished recruited and resident TAMs based on Ingenuity Pathways Analysis with a p value < 0.01 . **(C)** Time-lapse TPLSM image sequence showing the dynamic of resident EGFP⁺ TAMs interconnections (dashed circle). **(D)** Quantification of time-lapse TPLSM of the behavior of recruited and resident TAMs. Scatter plots represent the mean velocity and the track straightness of the TAM

subsets in lung metastasis at day 15 and the proportion of cell above the indicated threshold (dashed line). Data are pooled from 4 to 5 mice, Median with interquartile ranges are indicated, Mann Whitney tests have been performed **: $p < 0.01$; ****: $p < 0.0001$. **(E)** TPLSM images with 3D-rendering masks, show the close contact of resident EGFP⁺ TAMs with collagen fibers detected by second harmonic generation (SHG) and the interconnected network formed in-between the TC-1^{tdTomato} cells. See also video 1. **(F)** (Left) Lung cryo-sections from TC-1 tumor-bearing MacBlue x Cx3cr1^{EGFP/+} at day 15 show TAM subsets distribution regarding tumor vasculature using CD31 staining. Close interactions of EGFP⁺ TAMs with the vasculature are indicated (white arrows) and (right) TPLSM 3D reconstruction show the perivascular location of the EGFP⁺ resident TAM network within a metastatic nodule. See also video 2. **(G)** Heatmap shows a selection of transcripts involved in extracellular matrix interaction and remodeling, differentially expressed between resident and recruited TAMs. **(H)** Representative histogram plot of VCAM1 expression by resident and recruited TAMs (left) and quantification of the percentage of VCAM1⁺ cells in each subsets. Data are pooled from 6 mice out of 2 independent experiments, Mean with SEM are indicated, unpaired Student t-test has been performed, ****: $p < 0.0001$. See also Figure S5.

Figure 5: Distinct sensitivity and recovery of recruited and resident TAMs after chemotherapy

The impact of CP treatment on tumor growth was monitored over time. **(A)** Represents the monitoring of tumor growth by bioluminescence imaging after Luciferase-expressing TC1 inoculation and CP treatment (n=10 mice per group). **(B)** Graphs represent the kinetic of Ly6C^{high} and Ly6C^{low}-Mo recovery in the blood, after CP treatment (Mean absolute number/ml of blood±SEM are represented, n=6-10 mice out of 2-4 independent experiments, Two-way ANOVA with Bonferroni multiple comparisons test was performed, only statistical differences compared to day 0 after chemotherapy are indicated for each compartment). **(C)** Dot plots show Ly6C and CD64 expressions of Siglec-F⁻CD11b⁺Ly6G⁻ lung cells over time after CP treatment. Mean percentage±SD in each quadrant are indicated. **(D)** Blood/tissue partitioning

monitoring of lung monocytes and macrophages during tumor growth (Bars represent mean of the absolute number \pm SEM/mg of tissue, n=6-10 mice per time point out of 2-4 independent experiments, Two-way ANOVA with Bonferroni multiple comparisons test was performed. Only statistical differences compared to tumor-free mice day 0 are indicated for each compartment). **(E)** Representative FACS dot plot (upper panel) and quantification (lower panel) of recruited and resident TAMs from MacBlue x *Cx3cr1*^{EGFP/+} mice treated or not with CP (Graph represent mean \pm SEM of the percentage of recruited TAMs within total TAMs, n=4-10 mice per time point, Two-way ANOVA with Bonferroni multiple comparisons test was performed). For all panels *: p<0.05; **: p <0.01; ***: p<0.001; ****: p<0.0001.

Figure 6: Recruited TAMs clear apoptotic tumor cells after chemotherapy

(A) Lung cryo-section from TC-1^{tdTomato} tumor bearing MacBlue x *Cx3cr1*^{EGFP/+} mice show TAM subsets distribution and interaction with tumor cells along tumor growth and following CP treatment. **(B)** TPLSM 3D reconstructions show TAM interactions with TC-1^{tdTomato} tumor cells and phagocytosis following CP treatment. **(C)** Dot plots show TC-1^{tdTomato} phagocytosis by the indicated mononuclear phagocyte subsets (red). Fluorescent background from non-fluorescent TC-1 tumor is overlaid (black). **(D)** Pie chart shows the relative proportion of mononuclear phagocyte subsets among tdTomato⁺ phagocytic cells 15 days after CP treatment. Mean \pm SEM of 9 mice out of 3 independent experiments are indicated, one-way ANOVA with Bonferroni multiple comparisons test was performed. See also video 3-4.

Figure 7: Anti-VEGF targets TAM accumulation but not monocyte recruitment and enhance chemotherapy efficacy

(A) Representative histogram plot of FTL1 expression by resident and recruited TAMs, mean percentage \pm SD of 6 mice from 2 independent experiments are indicated. **(B)** Scheme of the protocol used (Left). Middle panel show the number of TAMs in tumor free, isotype or anti-VEGF treated mice. Right panel show the relative proportion of resident TAMs among total TAMs in control mice and after anti-VEGF treatment. Bars represent mean \pm SEM of 6 mice per group out of 2 experiments (Right panel). **(C)** Bone marrow monocytes from MacBlue mice

were adoptively transferred in tumor-bearing WT mice treated or not with anti-VEGF. Scheme of the protocol used (higher left panel) and representative dot plots (lower left panel). Adoptively transferred cells were recovered 24 hours later and their differentiation was evaluated (middle panel). The proportion of Ly6C^{high} Mo infiltration was evaluated by blood/tissue partitioning (right panel), Bars represent mean±SEM, n=7 mice from two independent experiments, Two-way ANOVA with Bonferroni multiple comparisons test was performed). **(D)** Scheme of the protocol and quantification of the number of cell/mg of tissue at day 15 and 20 of the indicated therapies. Bars represent mean±SEM n=8-10 mice out of 3 independent experiments, Two-way ANOVA with Bonferroni multiple comparisons test was performed. **(E)** Survival curve show the efficacy of combined therapy started from day 20 (n=7 mice per group, data are representative of 2 experiments, Log-rank (Mantel-cox) test was performed to compare each survival curve with the one of CP+Anti-VEGF). Corresponding lung weights are quantified (one-way ANOVA with Bonferroni multiple comparisons test was performed). For all panels *: p<0.05; **: p <0.01; ***: p<0.001; ****: p<0.0001; ns = non-significant. See also Figure S6.

STAR Methods

Mice

C57Bl6 mice were purchased from JANVIER LABS (Le Genest, Saint Isle, France). *Cx3cr1*^{EGFP/+} (Jung et al., 2000), *Csf1r*-Gal4VP16/UAS-ECFP (MacBlue)(Ovchinnikov et al., 2008), and *Ccr2*^{-/-} mice were intercrossed to generate MacBlue x *Cx3cr1*^{EGFP/+}, MacBlue x *Cx3cr1*^{EGFP/+} x *Ccr2*^{-/-} mouse strains. These strains, *Nr4a1*^{EGFP/+} (Moran et al., 2011) and MMTV PyMT-P2A-mCherry-P2A-OVA (PyMT-ChOVA) mice (Engelhardt et al., 2012) were bred at Pitié-Salpêtrière animal facility. All mice were used between 8 and 14 weeks old except for PyMT that develop primary breast tumor and lung metastasis at around 25 weeks.

Ethical statement

All experiment protocols were approved by the French animal experimentation and ethics committee and validated by “Service Protection et Santé Animales, Environnement” with the number A-75-2065 for tumor experiments and A-75-1315 for parabiosis experiments. Sample sizes were chosen to assure reproducibility of the experiments and according to the 3Rs of animal ethic regulation.

Parabiosis

C57Bl6 female host parabionts were generated with MacBlue x *Cx3cr1*^{EGFP/+} females. Blood T cell chimerism was tested after 2 weeks and was between 40-60% as previously described (Rodero et al., 2015). At this time, both animals were injected with TC1 cells and analyzed 15 days later.

Cells

The TC-1 tumor cell line was derived from primary lung epithelial cells of a C57BL/6 mouse co-transformed with HPV-16 oncoproteins E6 and E7 and c-Ha-ras oncogene (Ji et al., 1998). TC-1 cells expressing Luciferase (TC-1-Luc) were kindly provided by Pr. Wu (Johns Hopkins

University). TC-1^{tdTomato} cell line was generated by infection of TC-1 cells with a tdTomato-lentivirus (kindly provided by M. Lambert, Institut Cochin, Paris, France). Cells were expanded and sorted with BD FACS AriaIII (platform CyBio, Institut Cochin, Paris, France). TC1^{tdTomato} cells were >97% pure.

All cell lines were cultured in Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 with 10% fetal bovine serum, Na-Pyruvate, anti-biotic and anti-mitotic (Gibco, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and incubated at 37°C in 5% CO₂. For in vivo experiments, 5x10⁵ cells were injected intravenously in the tail vein to generate lung metastasis.

Blood/tissue partitioning

Intravascular CD45 labelling was performed as previously described (Hamon et al., 2016; Rodero et al., 2015). Mice were injected intravenously with 1µg of anti-CD45 (clone 30-F11). Two minutes after injection blood was drawn and mice were sacrificed. Lungs were harvested and bathed in a large volume of PBS.

Anti-cancer therapies

Cyclophosphamide (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) treatment was performed by a single intraperitoneal injection diluted in phosphate-buffered saline (PBS) at 175mg/kg at 10 days after tumor inoculation or at 20 days for advanced cancer treatment protocols. The anti-VEGF antibody (B20-4.1.1) and isotype control were supplied by Genentech, San Francisco, CA, USA. Antibodies were administered intraperitoneally at 5mg/kg, three times a week after chemotherapy.

Flow Cytometry

Blood was drawn via retro-orbital puncture with heparin and directly stained with antibodies. After staining, erythrocytes were lysed with buffer containing 0.15M NH₄Cl, 0.01mM KHCO₃ and 0.1mM EDTA and resuspended in FACS buffer containing, PBS 0.5% BSA EDTA 2mM.

Lungs were harvested and digested in RPMI medium (Gibco, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) with 1mg/mL collagenase IV (Sigma) for 30min at 37°C and filtered through a 40-µm-pore cell strainer (Becton Dickinson, Rungis, France). 1/10th of the cell suspension was incubated with 1µg/mL purified anti-CD16/32 (2.4G2, BD Biosciences) for 10min at 4°C then surface staining was performed by additional 20min incubation with appropriate dilution of the surface marker antibodies. Cells were then washed once in FACS buffer and analysed directly by flow cytometry. The panel of antibodies used was: anti-CD11b (clone M1/70), anti-Ly6C (clone AL-21), anti-Ly6G (clone 1A8), anti-NK1.1 (clone PK136), F4/80 (clone BM8), anti-IAb (clone AF6-120.1), anti-CD11c (clone HL3), anti-Siglec-F (clone E50-2440), anti-CD103 (clone M290), anti-CD45 (clone 30-F11), anti-CD64 (clone X54-5/7.1 ; Pharmingen, BD Bioscience), anti-Flt1 (clone 141522;R&D Systems), anti-CD206 (clone C068C2 ; Biolegend), anti-VCAM1 (clone 429; BD Biosciences). Calculation of absolute cell number was performed by adding to each vial a fixed number (10.000) of non-fluorescent 10µm polybead@carboxylate microspheres (Polysciences, Niles, IL, USA) according to the formula: Nb of cells = (Nb of acquired cells x 10.000) / (Nb of acquired beads). Number of cells obtained for each sample was normalized per mg of tissue or per mL of blood. Flow cytometry acquisition was performed on the flow cytometer FACS LSRFortessa X-20® (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) with DIVA® Flow Cytometry software. Flow cytometry data was analysed with FlowJo software (Tree Star, Inc, Ashland, OR, USA) and when indicated, visualized using viSNE (Amir el et al., 2013), a dimensionality reduction method which uses the Barnes-Hut acceleration of the t-SNE algorithm. viSNE was implemented using Cytobank (Chen and Kotecha, 2014).

Multi-photon Imaging

Lung experiments were performed on freshly explanted tissue according to our previously work (Rodero et al., 2015). Lungs were carefully collected and were immobilized in an imaging chamber perfused with oxygenated (95% O₂ plus 5% CO₂) RPMI medium containing 10% FCS. Local temperature was monitored and maintained at 37°C. To define the tumor vasculature 2MDa tetramethylrhodamine-Dextran (Invitrogen) was injected I.V prior to the

imaging session. The Two-Photon Laser Scanning Microscopy (TPLSM) set-up used was a Zeiss 7MP (Carl Zeiss, Germany) coupled to a Ti:Sapphire Crystal multiphoton laser (Coherent ChameleonU, CA, USA) which provides 140fs pulses of NIR light, selectively tunable between 680nm and 1050nm and an optical parametric oscillator (OPO-MPX, Coherent) selectively tunable between 1050 and 1600nm. The system included a set of external non-descanned detectors in reflection with a combination of a LP-600nm followed by LP-462nm and LP-500nm dichroic mirrors to split the light and collect the SHG signal with a 417/60nm emission filter, ECFP with a 480/40nm emission filter, EGFP with a 525/50nm emission filter and tdTomato with a 624/40nm emission filter. The excitation wavelength was 850nm for the NLO beam and 1100nm for the OPO beam. Cell motility was measured every 30s by 5 consecutive 3 μ m z spacing stacks (total 12 μ m thickness) using a plan apochromat x20 (NA = 1) water immersion objective. Fluorescent cells were monitored over time with 3-dimensional automatic tracking and manual correction with Imaris software (Bitplane, Zurich, Switzerland). The acquisition and analysis protocols for all experimental conditions to be compared were identical. Velocity and straightness were determined using Imaris. The track straightness corresponds to the ratio of the distance between the initial and the final positions of each cell to the total distance covered by the same cell. 3D mask rendering image were generated with Imaris.

Histological analysis

Briefly, organs were harvested and fixed in 10% formalin for 4 hours then incubated in 30% sucrose-PBS overnight at 4°C before being embedded in Tissue-Tek OCT compound (Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, Netherlands) and frozen at -80°C. Sectioning was completed on a HM550 Cryostat (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at -20°C; 5- μ m sections were collected on Superfrost® Plus Slides (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) and stored at -20°C until use. Slides were counterstained and mounted with Vectashield Mounting Medium with DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole; Vector Laboratories). Tissue sections were rehydrated with 0.5% Triton-PBS during 10min. A first block step was realised with 3% BSA solution during 30min followed by 1 hour incubation at 37°C with the primary antibodies Rat

anti-mouse CD31 PE (clone MEC 13.3) (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) or the rat IgG2a, κ isotype control (clone eBR2a) (eBioscience, San Diego, CA, USA) and anti-VEGF clone B20-4.1.1 or isotype control (Genentech, San Francisco, CA, USA) at the appropriate dilution. The slides were then incubated with Avidin/Biotin Blocking Kit (SP-2001) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) following manufacturer protocol. Biotinylated secondary antibody binding (donkey anti-rat IgG for CD31 staining and AF647 anti-mouse IgG2a for VEGF staining, (Biolegend, San Diego, CA, USA)) was then performed during 30min at room temperature followed by Cy3-conjugated Streptavidin staining during 30min at room temperature (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA). Slides were mounted with Vectashield Mounting Medium with DAPI and Images were acquired with a Zeiss Axio Z1 fluorescent microscope (Carl Zeiss, Germany). Cell quantification was performed by counting manually the number of ECFP⁺EGFP⁺ and EGFP⁺ cells in each field. Between 5 and 10 different fields were chosen from whole lung sections of at least 3 mice and separated according to their anatomical location; in contact with the lung pleura, in contact with airways, visible by the large autofluorescent epithelial cells and in the alveolar space within the tumor parenchyma.

In vivo TC-1-Luciferase cell luminescence

In vivo bioluminescence imaging was conducted on the IVIS spectrum in vivo imaging system (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA), using the Living Image acquisition and analysis software (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Prior imaging, mice were injected with D-luciferin intraperitoneally (150mg/kg, 100 μ L/mouse) and anesthetized with isoflurane. The radiance from the lung region was quantified with the same software and the intensity of all images was adjusted with the minimum and maximum of intensity between each groups.

Transcriptomic analysis

Twenty days after inoculation of TC-1 cells in Macblue x *Cx3cr1*^{EGFP/+}, CD11b⁺CD64⁺Ly6C⁻EGFP⁺EGFP⁺ recruited and CD11b⁺CD64⁺Ly6C⁻EGFP⁺ resident TAMs were sorted using BD FACSAria® (BD, Franklin Lakes, NJ, USA). Cells were sorted from 4 independent biological replicates and total RNA was extracted using RNeasy Micro Kit (QUIAGEN) and quality was monitored with the Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA). Each biological replicate was hybridize to Affimetrix PICO V2 MouseGene2.OST microarrays. Raw data will be deposited upon manuscript acceptance.

Analysis of gene-expression profiles was performed using Multi Experiment Viewer (MeV) which provides bioinformatics tools for integrative data analysis. We generated HeatMap with this microarray data analysis tool incorporating sophisticated algorithms. 25429 genes have been identified in macrophage transcriptome. T-test was applied on resident and recruited macrophages transcriptomic data and we obtained 604 significant differentially expressed genes between these two conditions with a p-value of 0.05 based on t-distribution with overall alpha (critical p-value) and the variance assumption was welch approximation (unequal group variances). Hierarchical Clustering was carried out on significant genes only with gene tree and sample tree then with optimize gene and sample leaf order. Pearson Correlation was the distance metric used to perform HCL, with complete linkage clustering. Data have been adjusted with median center genes/rows, median center samples/column and to the end unlog2 data transformation was applied. Within the context of biological systems Ingenuity Pathway Analysis (IPA®) brings powerful analysis and allowed us to determine relevant bio functions and networks about the 604 differentially expressed genes.

Adoptive transfer experiment

Ten days after inoculation of TC-1 cells mice were treated with isotype control or anti-VEGF every 2 days. On day 14 after tumor inoculation, 10⁷ bone marrow cells isolated from Macblue mice were adoptively transferred and the recovered cells were analyzed by FACS 24 hours later.

Statistical Analysis

All statistical analysis were performed with Graphpad Prism. Each sample values were first tested for Gaussian distribution by D'Agostino & Pearson omnibus normality test. Accordingly, multigroup analysis of variances were performed, one-way or two-way ANOVA tests followed by Bonferroni post tests for Gaussian distribution or Kruskal Wallis followed by Dunn's multiple comparisons for non-Gaussian distribution. For simple comparison analysis, student t test was performed to compare parametric distribution and Mann-Whitney for non-parametric distribution. Symbols used *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$; ns=not significant.

Video Legends

Video 1. Related to Figure 4: Live imaging of TAM subsets in lung metastasis

3D live imaging movie shows the behaviors of distinct TAM subsets in explanted lung of MacBlue x *Cx3cr1*^{EGFP/+} mouse 15 days after TC-1^{tdTomato} inoculation. Notice the dynamic of recruited TAMs and resident TAM interconnections. The ECFP signal is cyan, the EGFP signal is green and tdTomato is red.

Video 2. Related to Figure 4: Perivascular macrophages

3D live imaging movie shows the network of resident TAMs around tumor blood vessels in explanted lung of MacBlue x *Cx3cr1*^{EGFP/+} mouse 15 days after TC1 inoculation. The ECFP signal is cyan, the EGFP signal is green and blood vessels are labeled by rhodamine dextran (red).

Video 3. Related to Figure 6: TAM subset behaviors in apoptotic tumor nodules after chemotherapy

3D live imaging movie shows TAM behaviors in apoptotic tumor cell area, 5 days post chemotherapy in explanted lung of MacBlue x *Cx3cr1*^{EGFP/+} mouse. The ECFP signal is white, the EGFP signal is green and the tdTomato signal is red.

Video 4. Related to Figure 6: TAM behaviors in chemo-resistant tumor nodules

3D live imaging movie shows TAM interactions with chemoresistant tumor cells in explanted lungs of MacBlue x *Cx3cr1*^{EGFP/+} mouse 15 days post chemotherapy. The ECFP signal is cyan, the EGFP signal is green and the tdTomato signal is red.

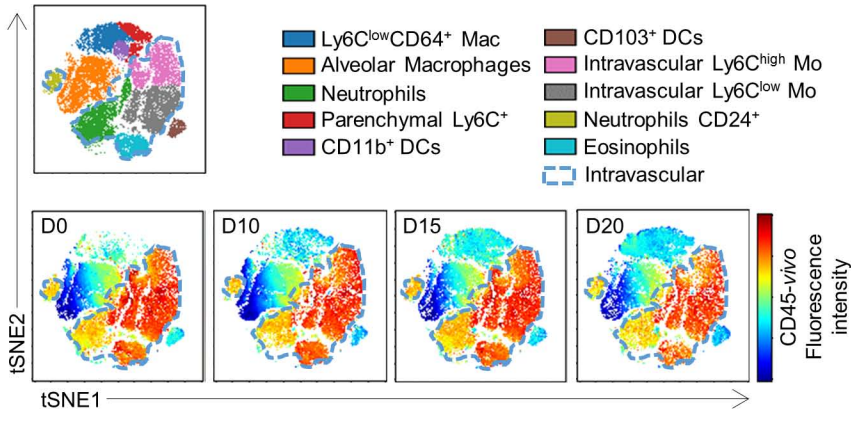
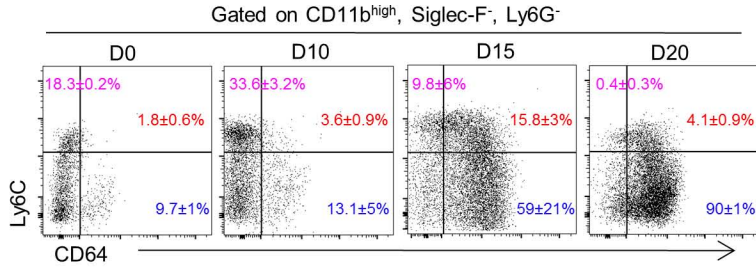
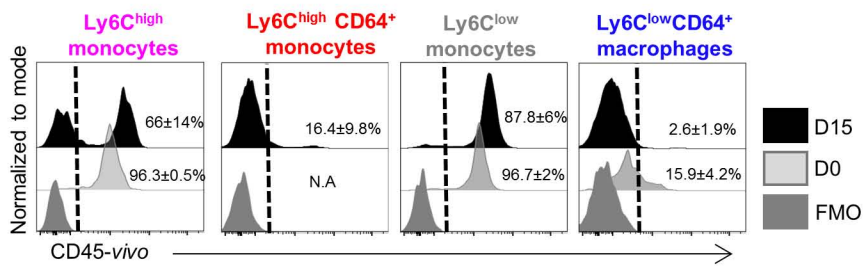
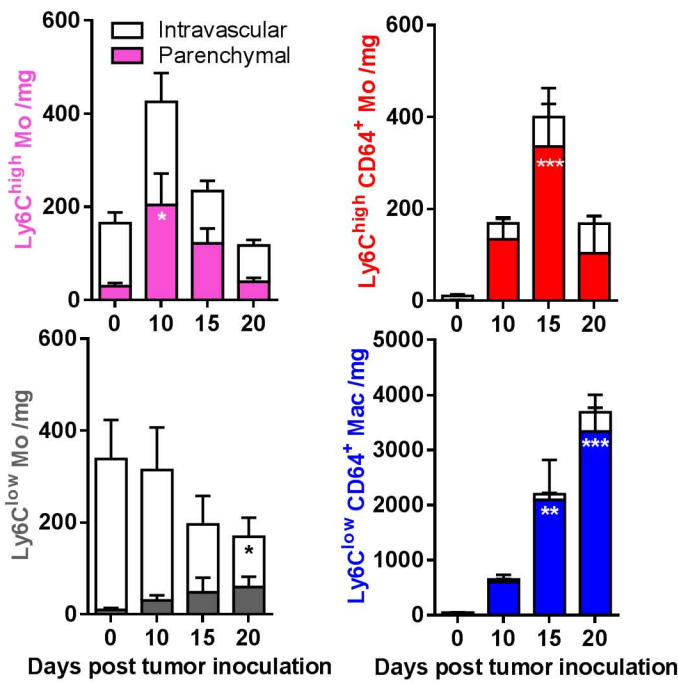
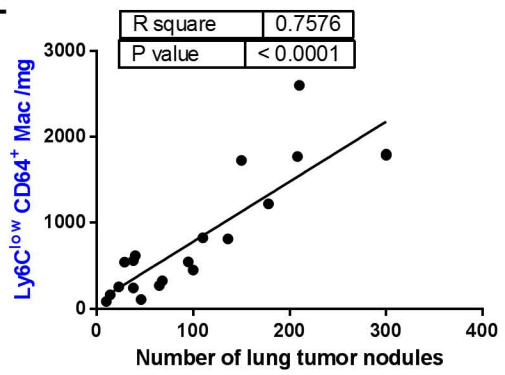
A**B****C****D****E**

Figure 1: Blood/Tissue partitioning reveals lineage differentiation sequence of TAMs

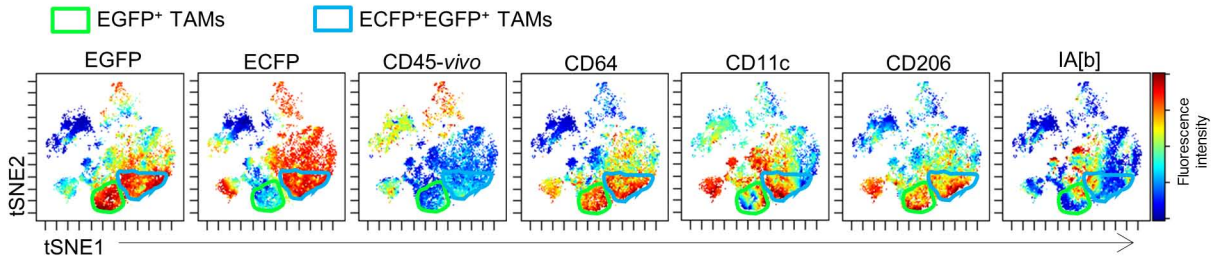
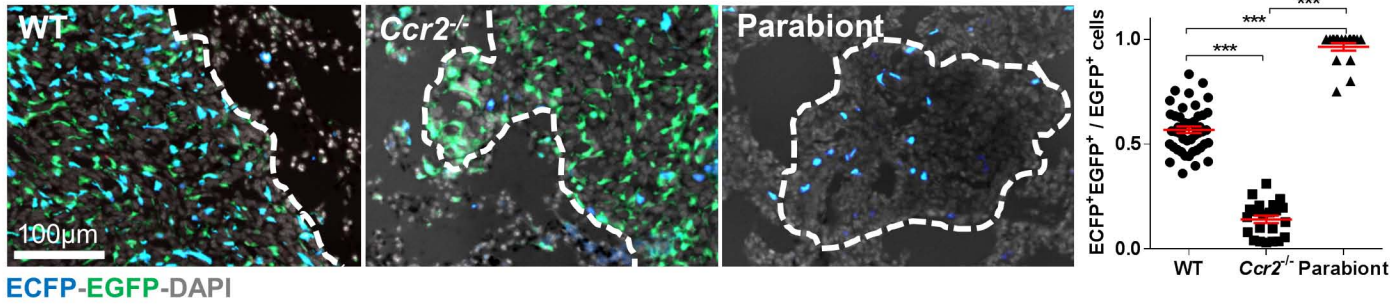
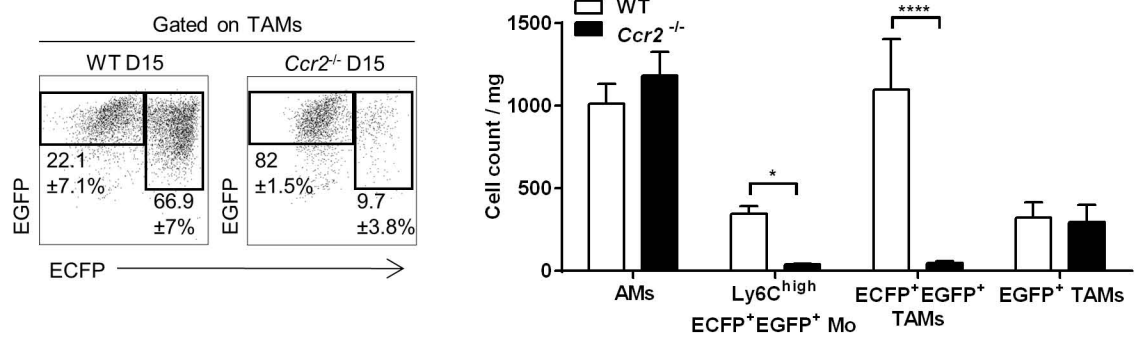
A**B****C**

Figure 2: MacBlue x *Cx3cr1*^{EGFP/+} reporters discriminate TAMs of different origins

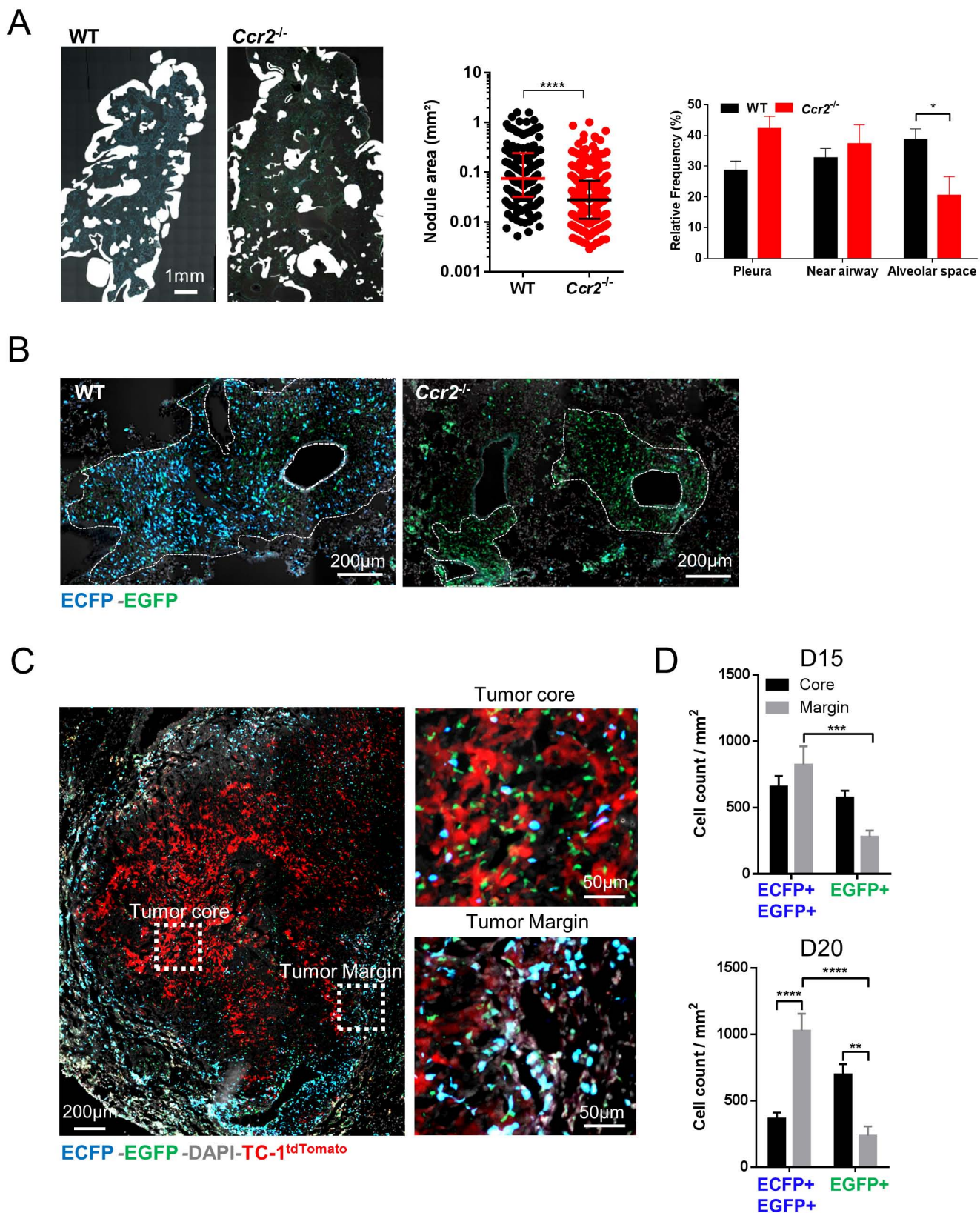


Figure 3 : Recruited TAMs enhance metastasis expansion

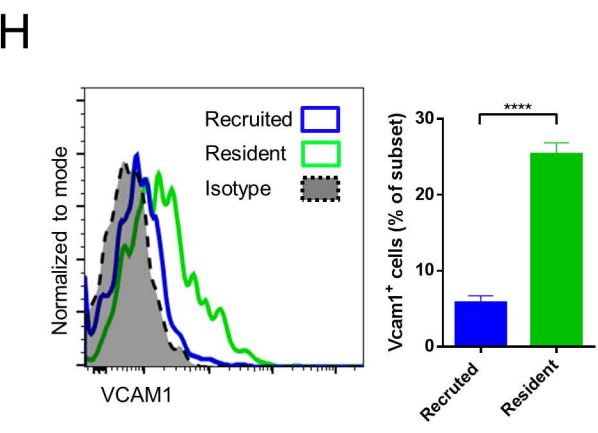
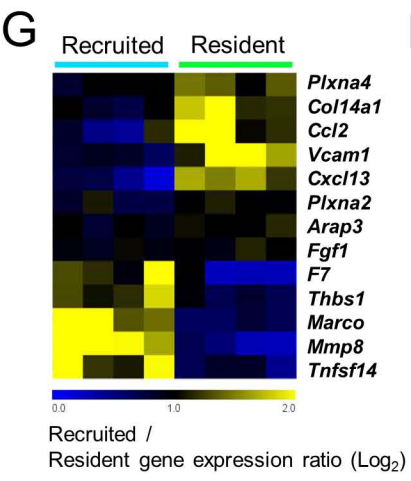
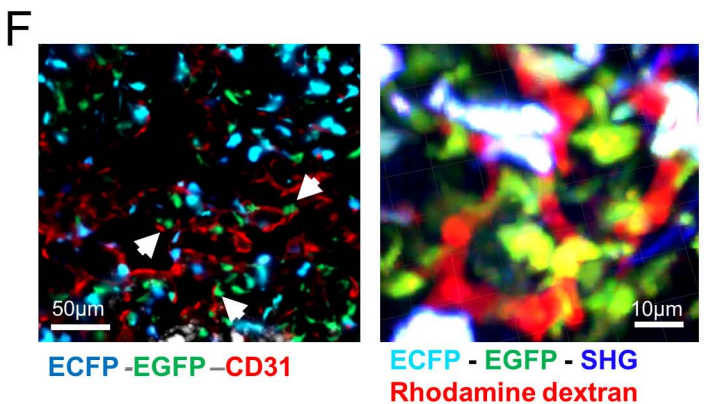
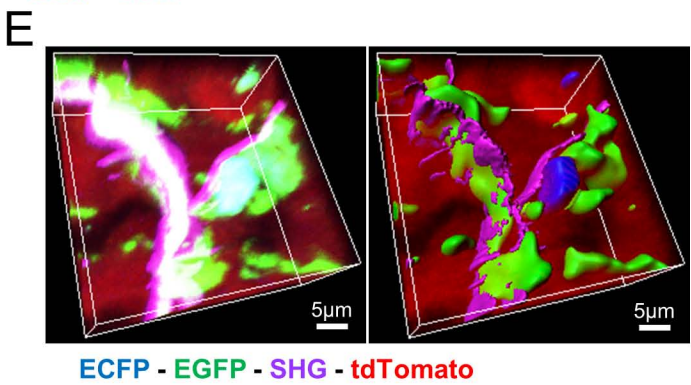
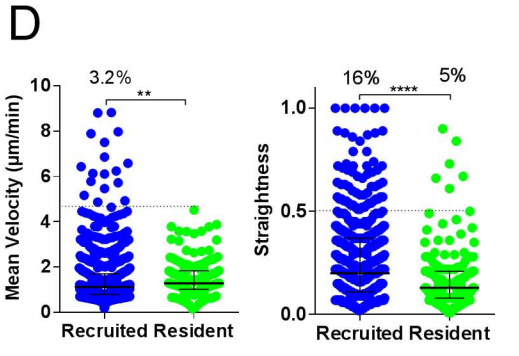
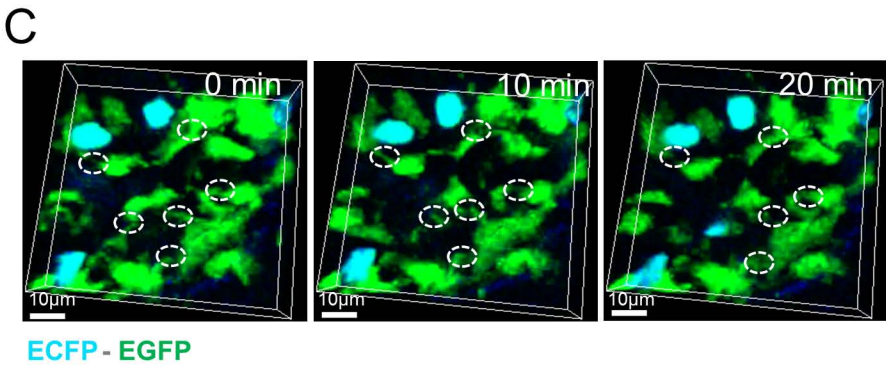
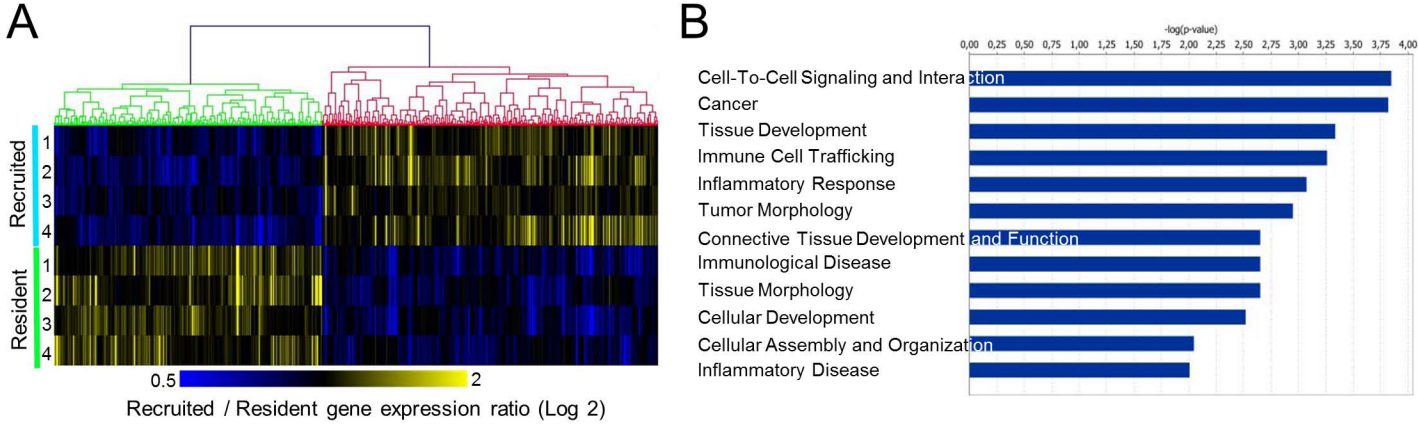


Figure 4 : Resident and recruited TAMs display different functional profiles

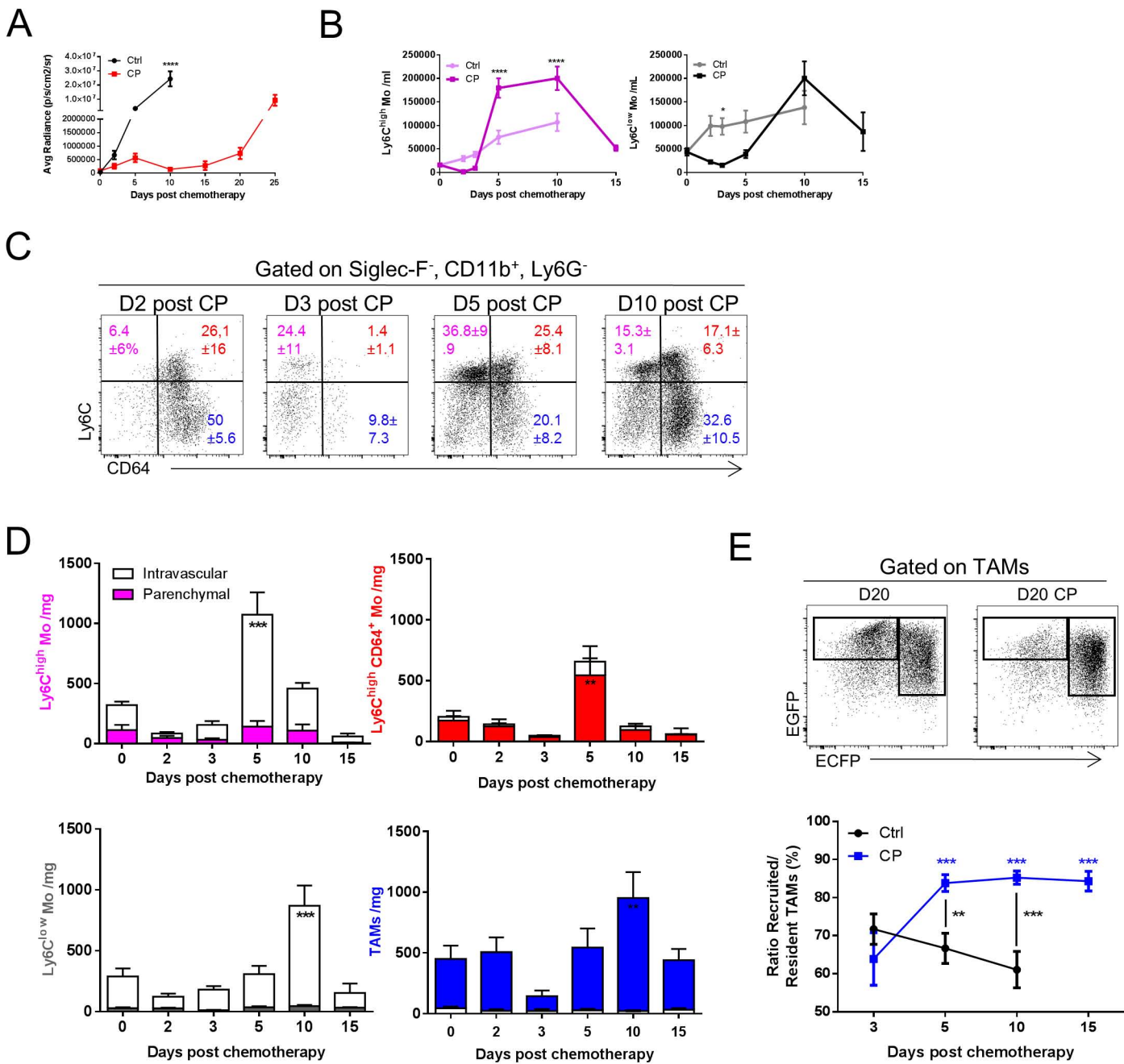


Figure 5: Distinct sensitivity and recovery of recruited and resident TAMs after chemotherapy

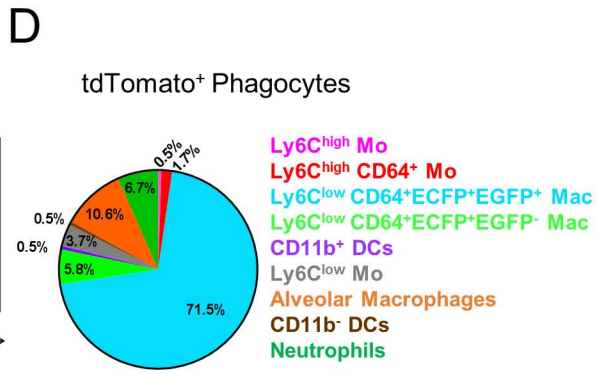
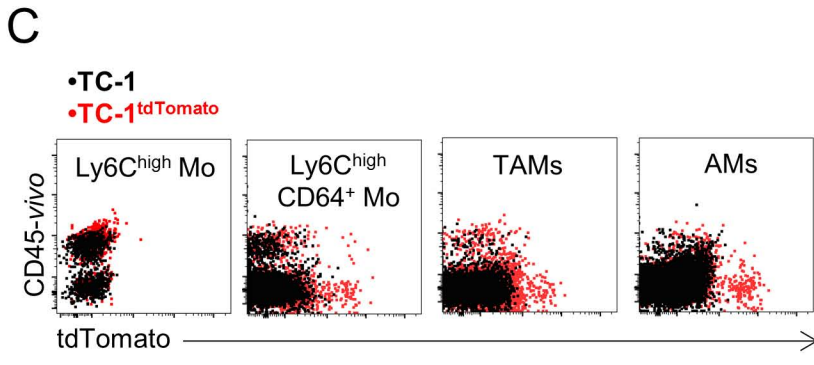
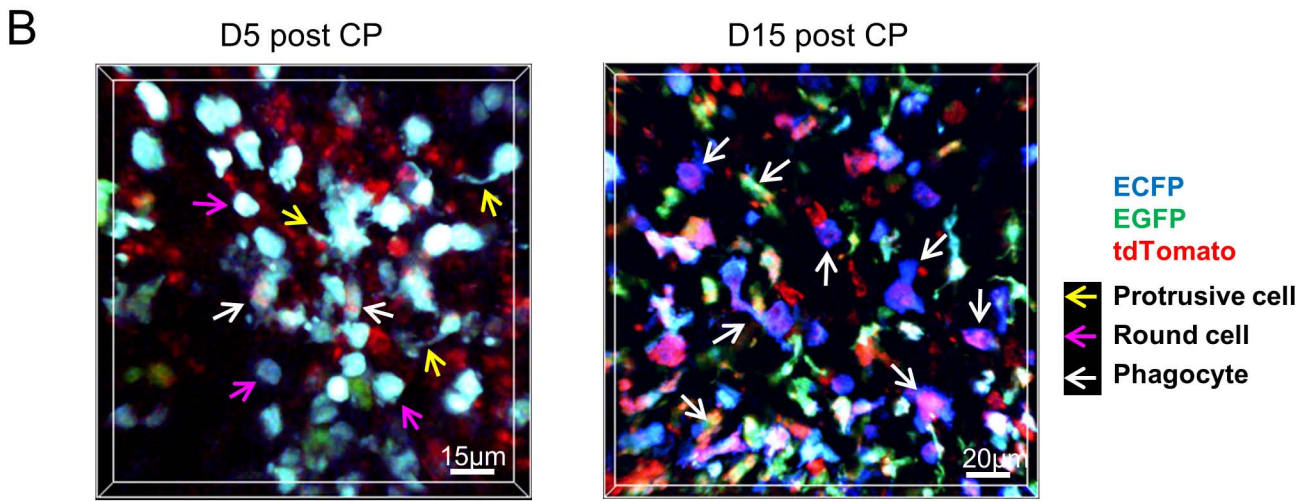
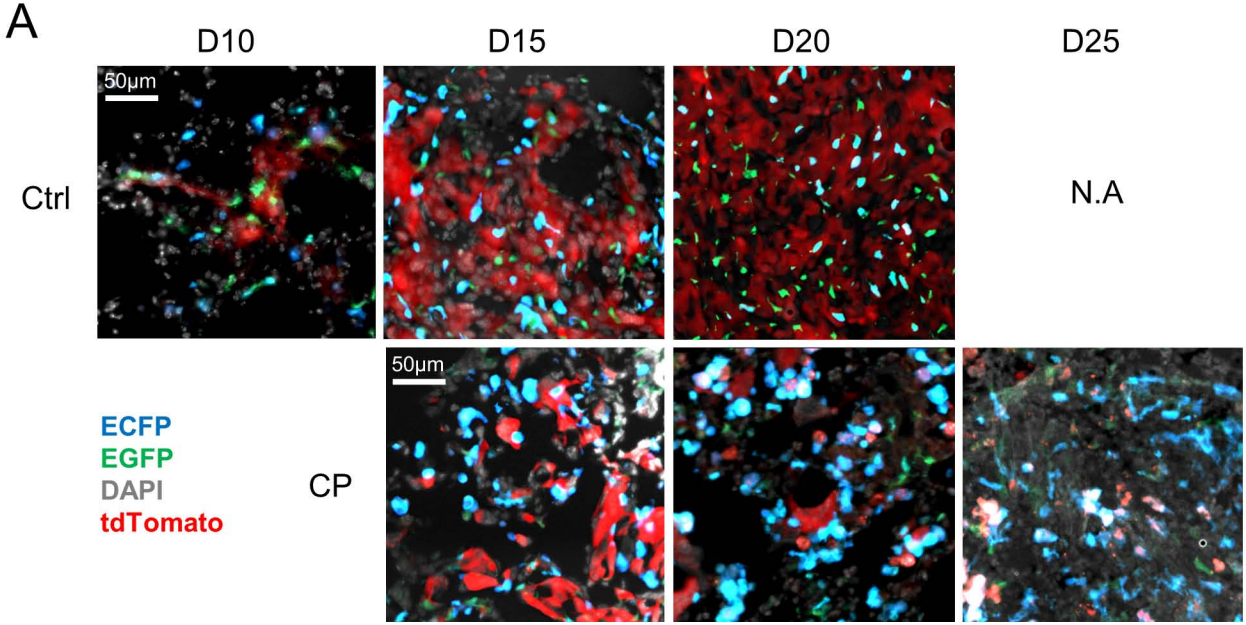


Figure 6: Recruited TAMs clear apoptotic tumor cells after chemotherapy

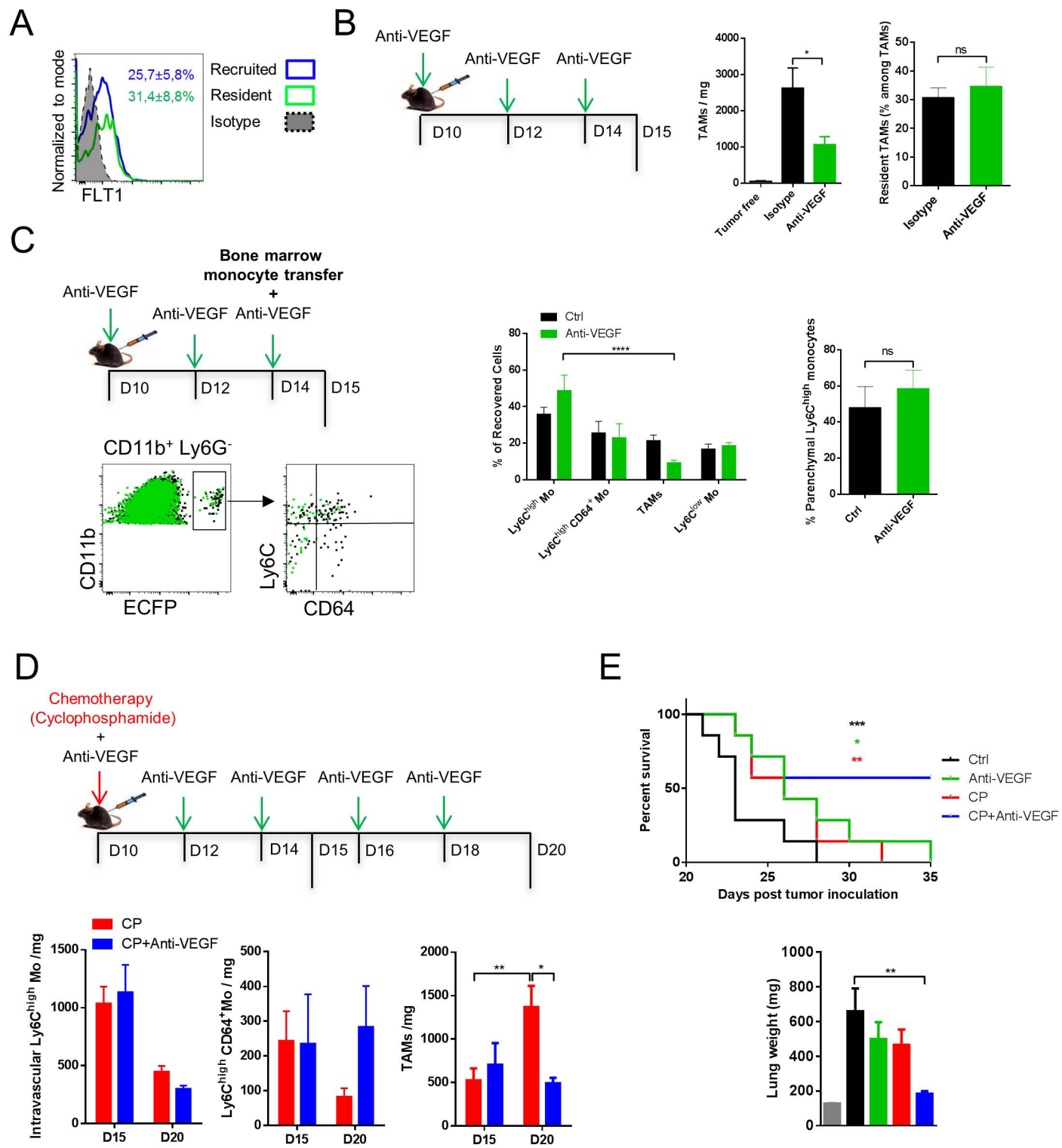


Figure 7: Anti-VEGF targets TAM accumulation but not monocyte recruitment and enhance chemotherapy efficacy

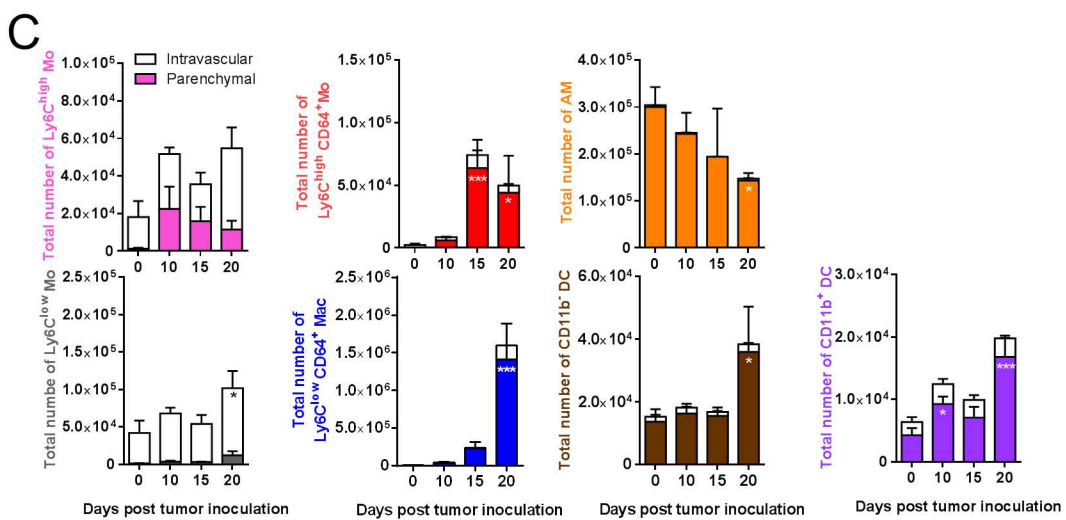
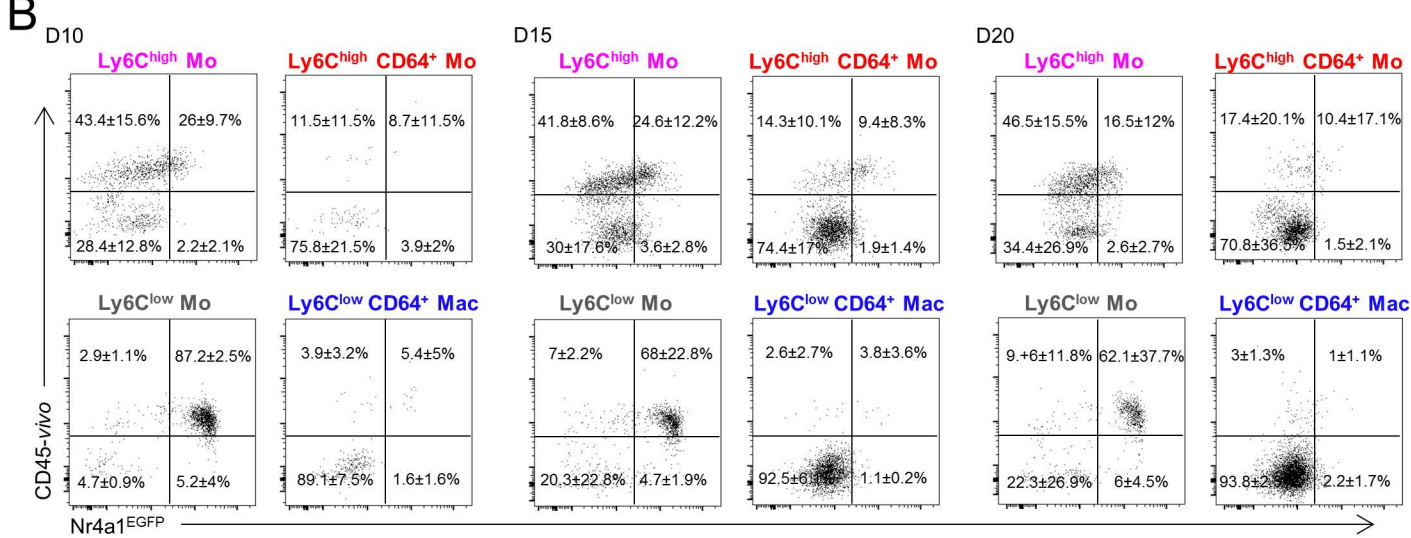
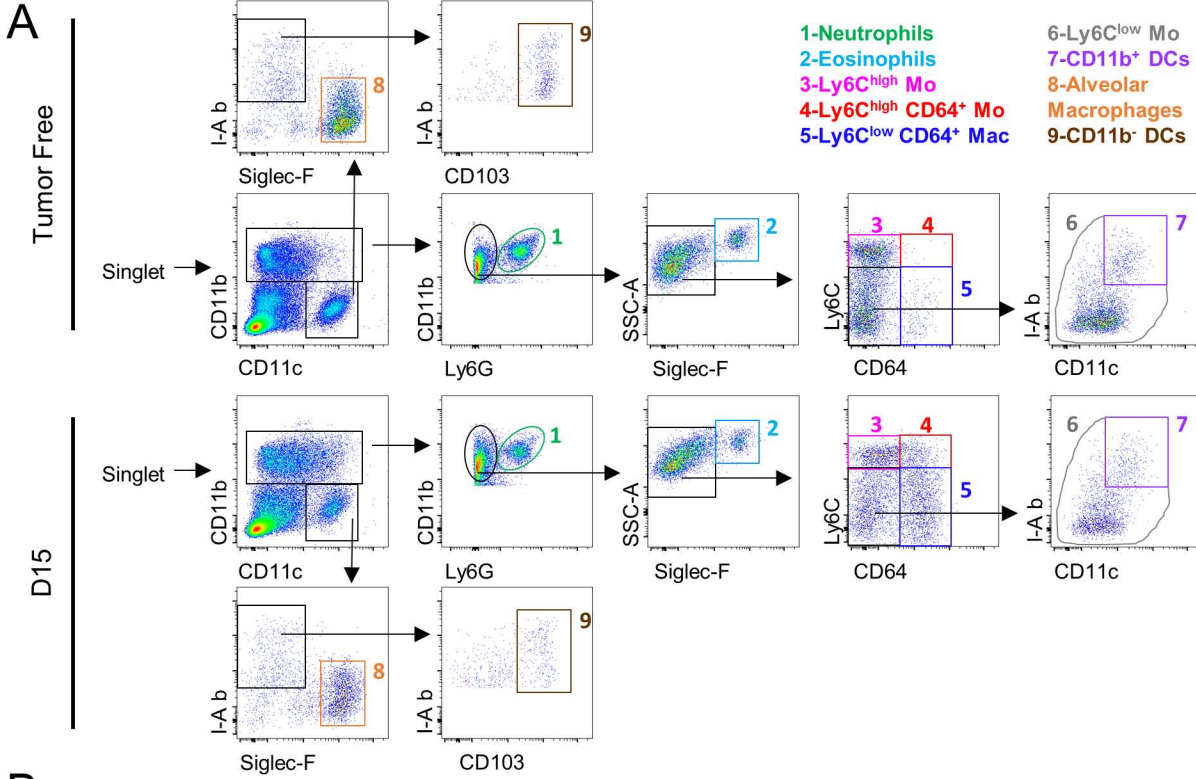


Figure S1. Related to Figure 1

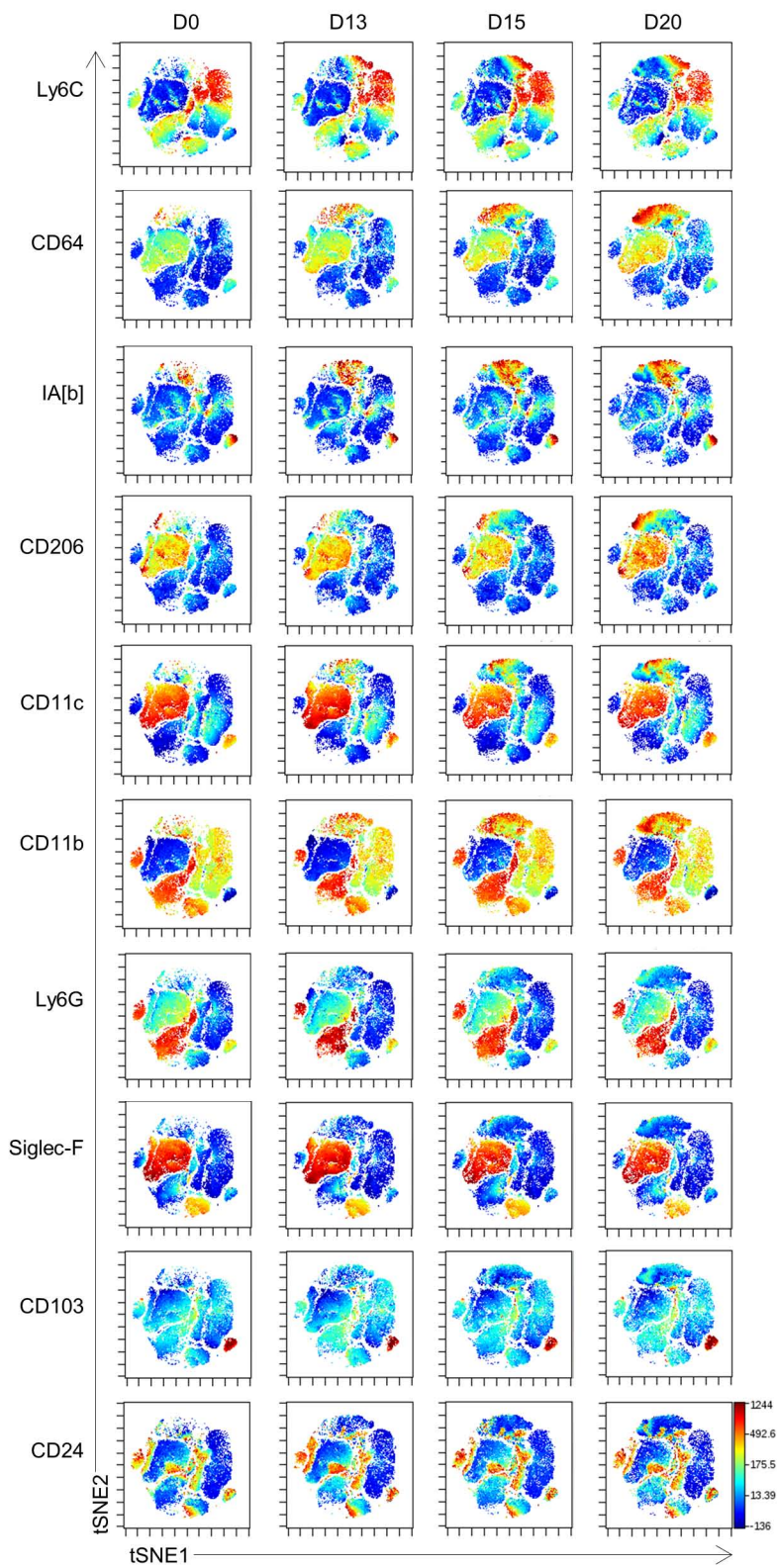


Figure S2. Related to Figure 1

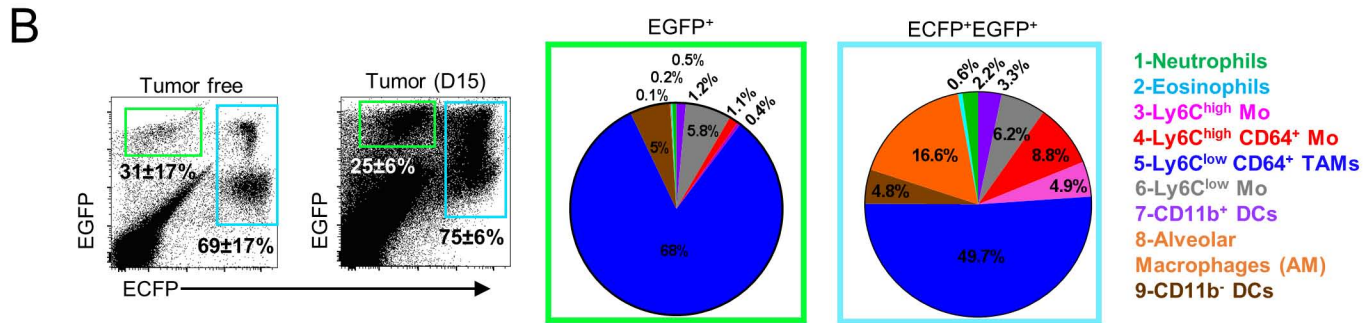
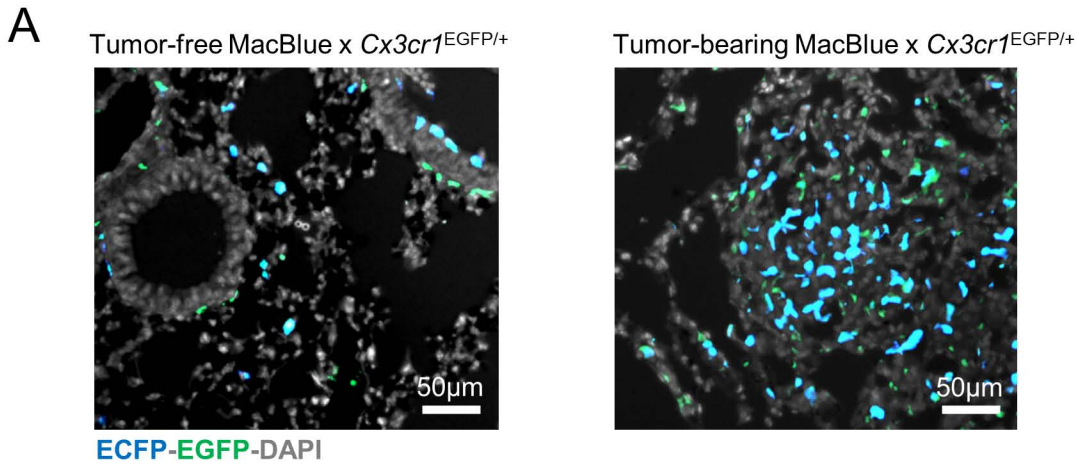


Figure S3. Related to Figure 2

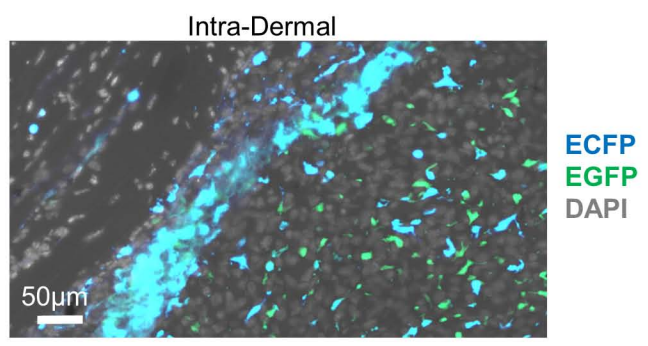
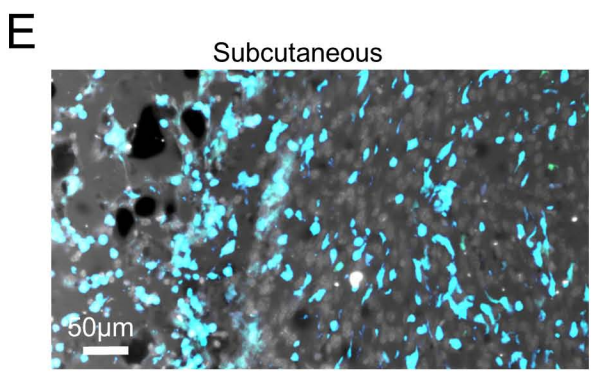
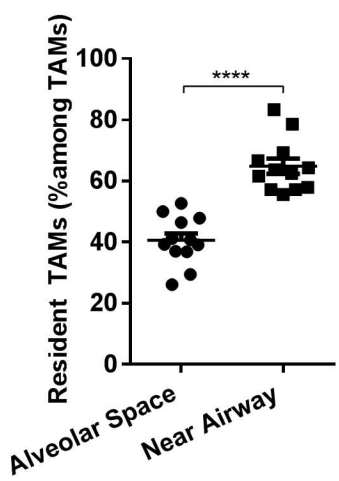
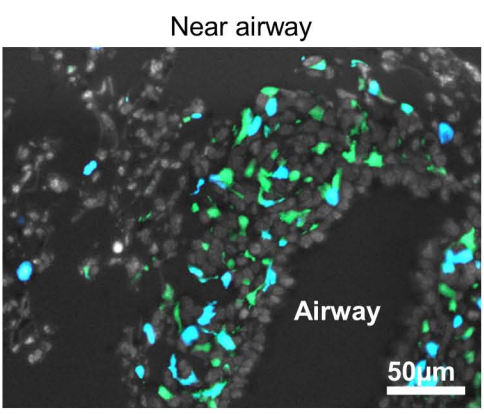
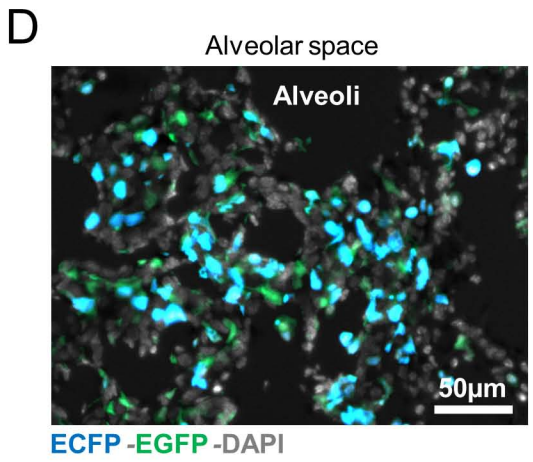
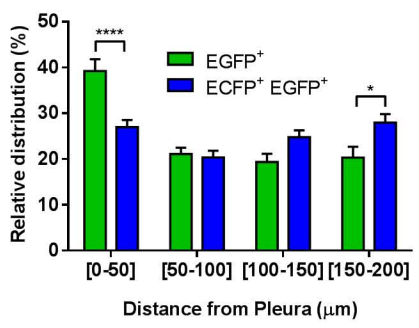
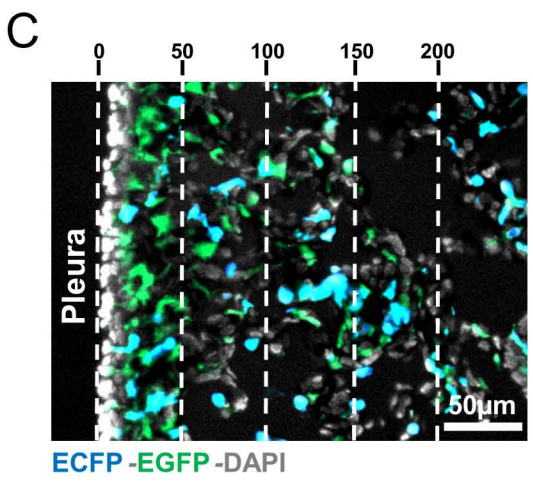
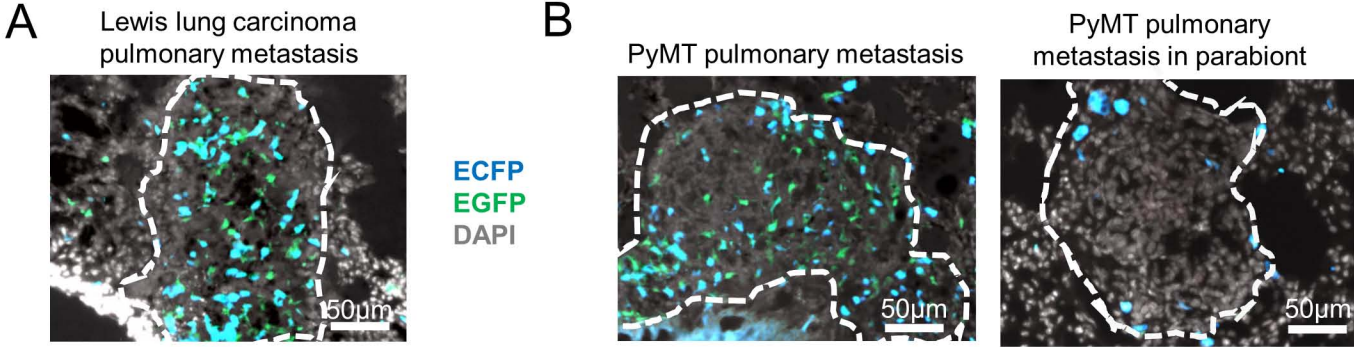
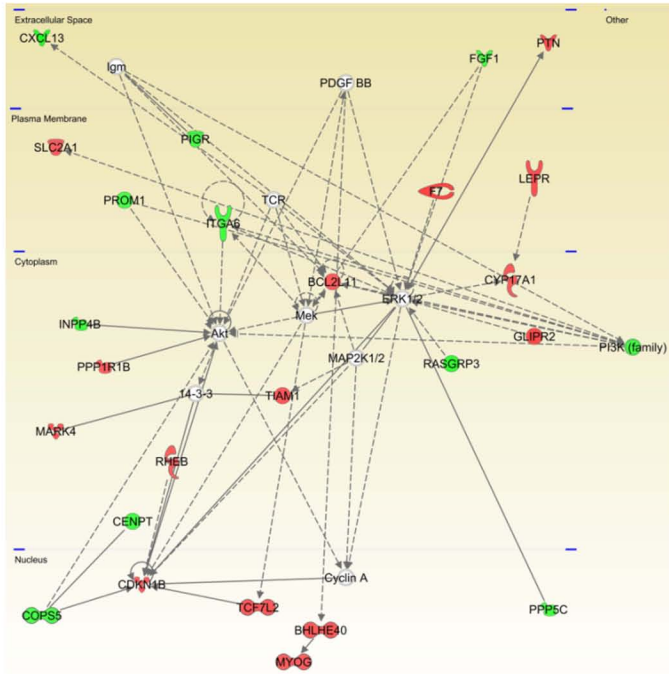
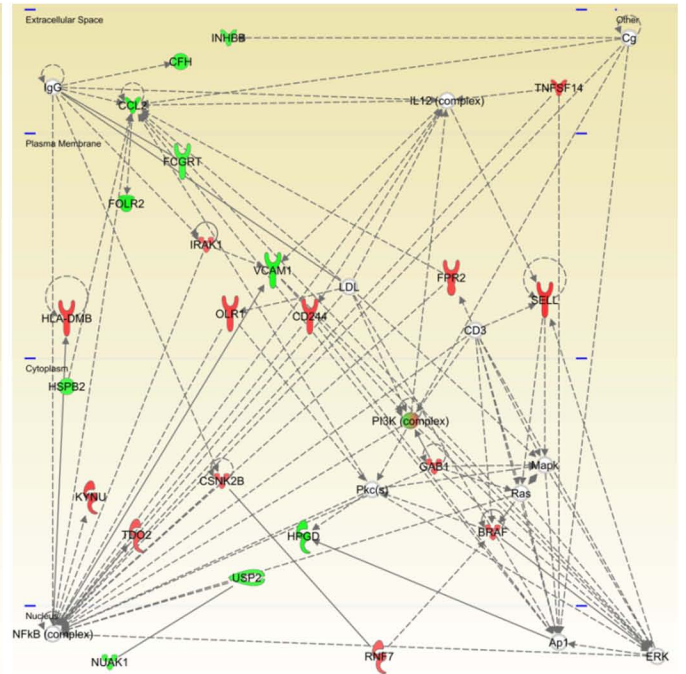


Figure S4. Related to Figure 2

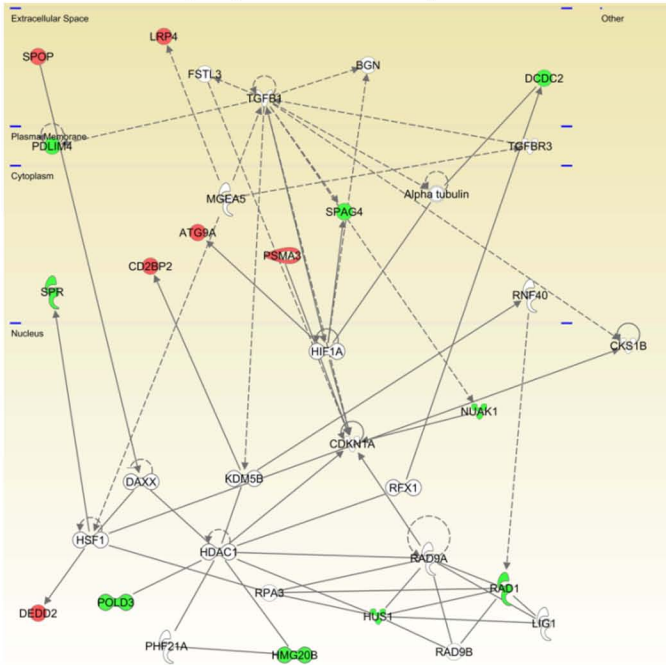
1. Cell Morphology, Cancer, Organismal Injury and Abnormalities



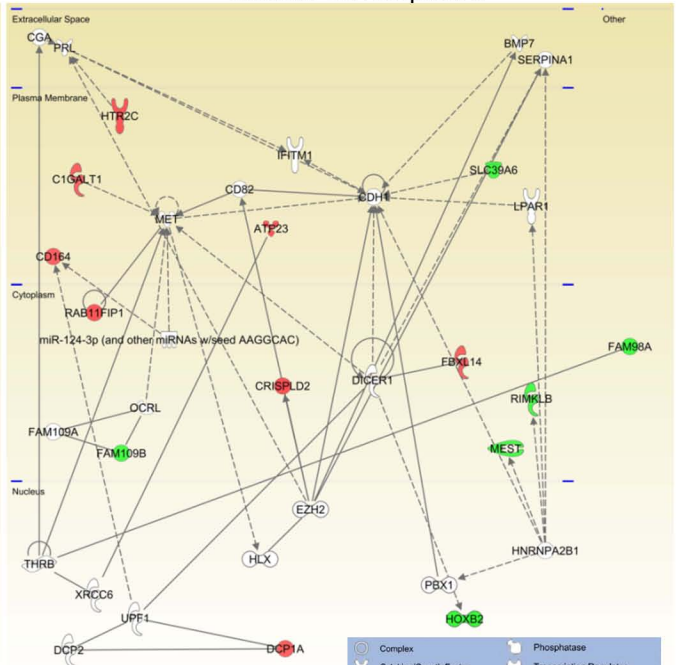
2. Cell to Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function, Immune Cell Trafficking



3. Cell Cycle, DNA Replication, Recombination, and Repair, Cellular Development



4. Cellular Movement, Cell Morphology, Cellular Development



	Complex		Phosphatase
	Cytokine/Growth Factor		Transcription Regulator
	Enzyme		Transmembrane Receptor
	Group/Complex		Transporter
	Growth factor		Other
	Kinase		Direct Relationship
	Peptidase		Indirect Relationship
	Higher exp. in Resident TAMs		Higher exp. in Recruited TAMs

Figure S5. Related to Figure 4

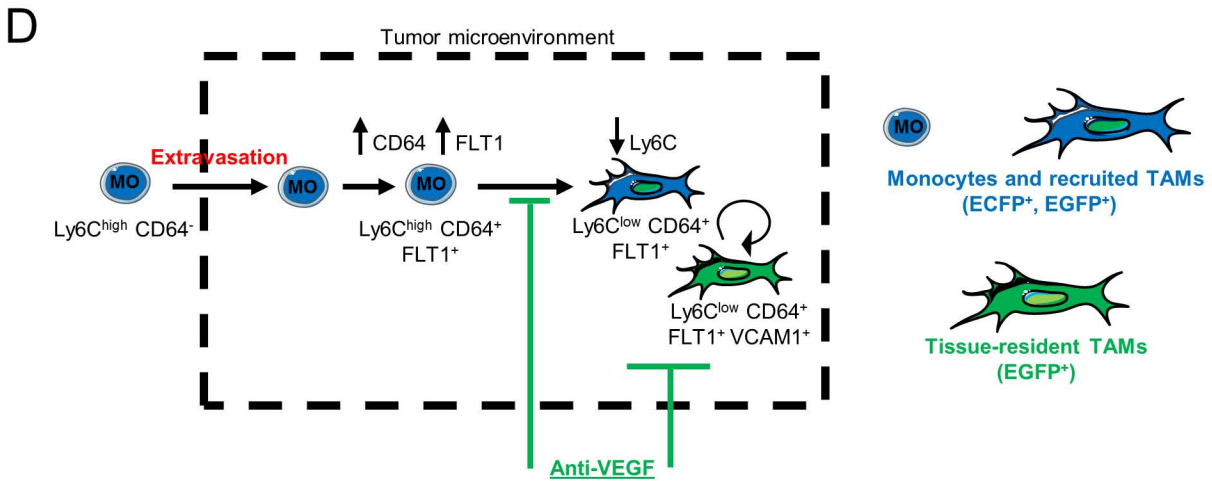
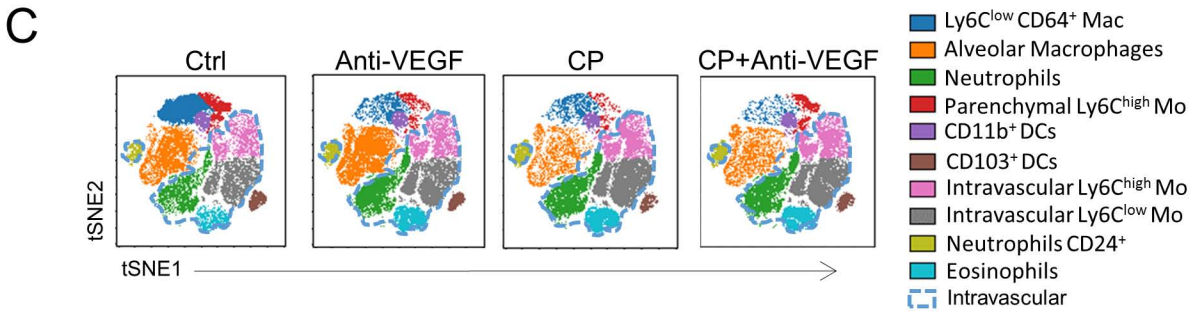
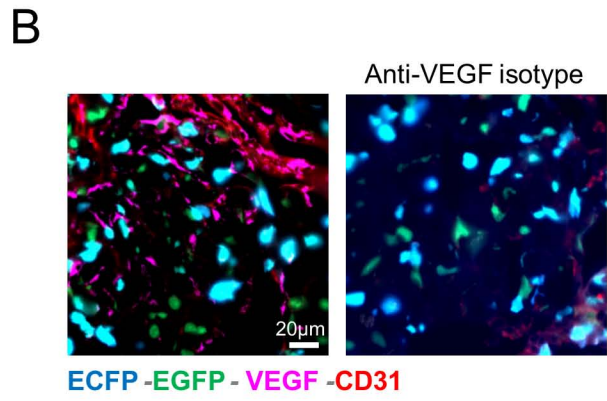
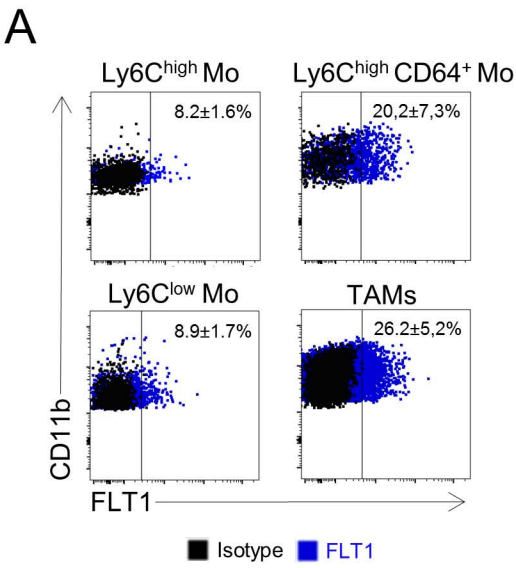


Figure S6. Related to Figure 6

Supplemental Figure Legends

Figure S1. Related to Figure 1: Characterization of the lung tumor-associated mononuclear phagocyte system

(A) Flow cytometry dot plots show the gating strategy to discriminate lung mononuclear phagocytes in tumor-free and tumor-bearing animals. (B) Dot plots show the monitoring of Nr4a1 activation on the different monocytes and macrophages of tumor-bearing Nr4a1^{EGFP} transgenic mice. Mean percentage \pm SD in each quadrant are indicated. (C) Blood/tissue partitioning monitoring of lung monocytes and macrophages during tumor growth (Bars represent mean of the total number of cell \pm SEM). For all panels n=6-8 mice per time point out of 3 independent experiments, Two-way ANOVA with Bonferoni multiple comparisons test was performed. Only statistical differences compared to tumor-free mice day 0 are indicated for each compartment. *: p<0.05; ***: p<0.001.

Figure S2. Related to Figure 1: viSNE analysis of the lung tumor-associated mononuclear phagocyte system

tSNE dimension 1 and 2 plots of the lung myeloid compartment show relative expression intensity of each indicated phenotypic marker at different time point after TC1 cell intravenous inoculation.

Figure S3. Related to figure 2: MacBlue x Cx3cr1^{EGFP/+} reporters allows the visualization of the TAM network

(A) Lung cryo-sections from tumor-free and tumor-bearing (D15 after TC-1 inoculation) MacBlue x Cx3cr1^{EGFP/+} mice show ECFP⁺EGFP⁺ cells (cyan), EGFP⁺ cells (green) and DAPI (grey). (B) Dot plot shows the relative expression of ECFP and EGFP among total lung cells (mean percentage \pm SD of ECFP⁺EGFP⁺ cells (cyan gate) and EGFP⁺ cells (green gate) are indicated). Pie charts indicate the cellular composition of the ECFP⁺EGFP⁺ cell gating (cyan) and EGFP⁺ cell gating (green) 15 days after TC-1 injection. Mean percentage from n= 4 mice are indicated.

Figure S4. Related to Figure 2: Resident and recruited TAMs harbor different anatomical distribution

(A) Lung cryo-section shows the distribution of ECFP⁺EGFP⁺ and EGFP⁺ cells in Lewis-lung carcinoma-bearing MacBlue x Cx3cr1^{EGFP/+}. (B) Lung cryo-section shows the distribution of ECFP⁺EGFP⁺ and EGFP⁺ cells in spontaneous pulmonary metastasis from MacBlue x Cx3cr1^{EGFP/+} x PyMT-ChOVA mouse bearing primary breast cancer (Left panel). Right panel shows the lack of EGFP⁺ cells in pulmonary metastasis from C57Bl6 PyMT-ChOVA host parabiont bearing primary breast cancer, with MacBlue x Cx3cr1^{EGFP/+} x PyMT-ChOVA mouse. (C) Lung cryo-section shows the distribution of ECFP⁺EGFP⁺ and EGFP⁺ cells in TC-1 pulmonary metastasis located in the vicinity of the pleura. Graph represents the relative distribution of EGFP⁺ resident TAMs and ECFP⁺EGFP⁺ recruited TAMs as a function of the deepness from the surface (pleura) (Data are pooled from 3-4 mice, Two-way ANOVA with Bonferroni multiple comparisons test was performed). (D) Lung cryo-section shows the distribution of ECFP⁺EGFP⁺ and EGFP⁺ cells pulmonary metastases located in the alveolar space or near large airways 15 days after TC-1 inoculation. Graph represents the percentage of resident TAMs among total TAMs in each sub-anatomic compartment quantified by histological analysis (Data are pooled from 3-4 mice, unpaired Student t test was performed). *: p<0.05; ****: p <0.001. (E) Images show the distribution of ECFP⁺EGFP⁺ and EGFP⁺ cells in solid tumor cryo-section from MacBlue x Cx3cr1^{EGFP/+}, 10 days after subcutaneous or intradermal inoculation of TC-1 cell line (Data are representative of 3 mice).

Figure S5. Related to Figure 3: Top 4 differentially regulated functional networks in resident and recruited TAMs

Representation of the molecular relationships of the top 4 functional networks calculated by the Ingenuity Pathway Analysis. Molecule transcripts that display higher and lower expression in recruited TAMs compared to resident TAMs are indicated in red and green respectively. Molecules are organized regarding their sub-cellular compartment, extracellular space, plasma membrane, cytoplasm and nucleus.

Figure S6. Related to Figure 6: TAMs express FLT1 and are found in close proximity to VEGF in metastatic nodules

(A) Dot plots show the expression of FLT1 (VEGF receptor 1) on the indicated subsets. Isotype control staining is overlaid in black. Percent \pm SD are indicated; n=8 mice. **(B)** Lung cryo-section from tumor-bearing MacBlue x *Cx3cr1*^{EGFP/+} mouse shows TAM distribution regarding the expression of VEGF in tumor metastasis. Anti-VEGF isotype staining is represented (right image). **(C)** Representative tSNE dimension 1 and 2 plots show the impact of the different therapies on the myeloid signature between D15 and D20. Cell subsets are color grouped according to their biased definition described in Figure S1. Dashed blue gate delineate cell blood/tissue partitioning. **(D)** Scheme of the development program of TAMs within lung metastases and the impact of anti-VEGF.

Travaux annexes

Article 1 : “Immune surveillance of the lung by migrating tissue monocytes”

Mathieu P. Rodero*, Lucie Poupel*, Pierre-Louis Loyher*, Pauline Hamon, Fabrice Licata, Charlotte Pessel, David A. Hume, Christophe Combadière, Alexandre Boissonnas.

Elife 2015

Les monocytes sont décrits principalement comme étant des cellules circulant dans le sang avant d’infiltrer les tissus et se différencier en macrophages ou en DC. Il apparaît maintenant de plus en plus que les monocytes ont un rôle de surveillance des tissus et qu’ils exercent des fonctions effectrices sans engager de processus de différenciation (Jakubzick et al., 2013). Le but de cette étude a été de caractériser les différentes populations de phagocytes mononucléés et leur contribution respective par rapport à celle des monocytes dans la surveillance du poumon en condition physiologique grâce à l’imagerie *in situ* en temps réel, le blood/tissue partitionning et aux souris MacBlue x CX3CR1^{EGFP}.

Les phagocytes mononucléés du poumon ont des localisations différentes en fonction du type cellulaire. Les macrophages alvéolaires sont dans la lumière des alvéoles, les macrophages interstitiels principalement le long de la plèvre et autour des voies aériennes et les monocytes sont majoritairement marginés dans le réseau vasculaire du poumon (intravasculaire). Les monocytes sont capables de phagocyter des billes injectées en intraveineuse de par leur localisation mais sont aussi capables de capter des billes injectées directement dans les voies aériennes du poumon comme le font les macrophages interstitiels et les DC.

Cette étude a permis d’apporter de nouvelles notions fondamentales dans la compréhension de la surveillance du tissu pulmonaire, soumis sans arrêt à des interactions avec l’environnement extérieur. Elle a aussi permis de démontrer l’importance des monocytes, qui se trouvent en

réalité dans le réseau vasculaire du tissu mais qui parviennent tout de même à surveiller les vaisseaux, le tissu et les voies aériennes du poumon.

Article 2 : “*In vivo* imaging reveals a pioneer wave of monocyte recruitment into mouse skin wounds”

Mathieu P. Rodero, Fabrice Licata, Lucie Poupel, Pauline Hamon, Kiarash Khosrotehrani, Christophe Combadière, Alexandre Boissonnas.

Plos One 2014

Les phagocytes mononucléés sont très importants dans la guérison des plaies. Seulement, les mécanismes de recrutement de ces cellules dans les premières heures qui suivent la lésion sont encore mal connus. Cette étude a permis l’optimisation d’une technique d’imagerie intravitale en temps réel de la plaie grâce aux souris MacBlue x CX3CR1^{EGFP} permettant le suivi du recrutement monocytaire.

Dans les heures qui suivent la blessure, une vague transitoire de monocytes Ly6C^{high} est recrutée. De façon intéressante, ces monocytes arrivent en même temps que les neutrophiles même s’ils sont moins nombreux. Les monocytes pénètrent dans la plaie selon un mécanisme actif au niveau des microhémorragies vasculaires et non par un processus de migration transendothéliale. A ce niveau, les monocytes migrent rapidement vers le cœur de la plaie grâce au réseau de collagène avant de s’arrêter pour exercer leurs fonctions et participer à la guérison.

Cette étude apporte de nouveaux éléments dans la compréhension des différentes étapes du recrutement des cellules de l’immunité innée durant le processus de guérison d’une blessure. Elle permet aussi de pallier à la difficulté de suivre les cellules dans la plaie alors que le tissu granuleux ne s’est pas encore formé.

Article 3 : “CCR2 influences T regulatory cell migration to tumors and serves as a biomarker of cyclophosphamide sensitivity”

Pierre-Louis Loyher, Juliette Rochefort, Camille Baudesson de Chanville, Pauline Hamon, Géraldine Lescaille, Chloé Bertolus, Maude Guillot-Delost, Matthew F. Krummel, François M. Lemoine, Christophe Combadière, Alexandre Boissonnas.

Cancer Research 2016

Cette étude a mis en évidence la présence d'une sous-population de Treg CCR2⁺ produite dans le ganglion lymphatique et majoritairement recrutée sur le site tumoral via l'axe CCR2/CCL2. Ces Treg CCR2⁺ sont positivement associés au développement tumoral et ont un phénotype activé et immunosuppresseur (production d'IL-10). Ainsi, l'axe CCL2/CCR2 a un nouvel intérêt en plus du contrôle sur le recrutement monocytaire qui remet en question les nombreux résultats obtenus auparavant grâce à l'étude des souris déficientes en CCR2. Il permet aussi d'envisager des interactions entre les monocytes et les Treg, que l'on commence à étudier au laboratoire.

Travaux collaboratifs

Durant ma thèse, j'ai été amenée à collaborer avec des équipes extérieures. Dans les deux articles qui suivent, j'ai apporté mon expertise dans la réalisation et le suivi de parabioses afin de mettre en évidence la présence de sous-populations de lymphocytes T résidents dans les ganglions lymphatiques en condition physiologique.

Article 1 : "Macrophages induce long-term trapping of $\gamma\delta$ T cells with innate-like properties within secondary lymphoid organs in the steady state"

Alexandra Audernard-Verger, Matthieu Rivière, Aurélie Durand, Elisa Peranzoni, Vincent Guichard, Pauline Hamon, Nelly Bonilla, Thomas Guilbert, Alexandre Boissonnas, Cédric Auffray, Gérard Eberl, Bruno Lucas, Bruno Martin.

Journal of Immunology 2017

Article 2 : "Characterization of resident T cells within secondary lymphoid organs in the steady state"

Aurélie Durand, Alexandre Audemard-Verger, Vincent Guichard, Raphaël Mattiuz, Arnaud Delpoux, Pauline Hamon, Nelly Bonilla, Matthieu Rivière, Jérôme Delon, Bruno Martin, Cédric Auffray, Alexandre Boissonnas, Bruno Lucas.

Manuscrit soumis et en révision.

DISCUSSION

Durant ma thèse, je me suis efforcée d'apporter une vision plus globale du rôle des phagocytes mononucléés dans les réponses inflammatoires. Ces cellules sont présentes dans la totalité de l'organisme et peuvent circuler d'un organe vers un autre en des temps très courts. Pour envisager les réponses de ces cellules dans leur ensemble, il a donc fallu adopter une vision spatio-temporelle plus large. Là où des études sont focalisées sur le site de la pathologie, nous avons suivi les phagocytes mononucléés dans plusieurs organes. Ceci nous a permis d'observer qu'un recrutement monocyttaire dans les heures qui suivent l'injection de faibles doses de LPS conduit à la mobilisation de cellules présentes dans le réseau vasculaire mais aussi dans la moelle osseuse, les poumons et la rate. Les cinétiques de mobilisation des monocytes nous ont aussi permis de découvrir qu'en moins d'une heure les monocytes circulants pouvaient totalement disparaître d'un prélèvement de sang et que une heure supplémentaire était suffisante pour une reconstitution partielle grâce à la sortie de nouveaux monocytes de la moelle osseuse et à la recirculation de certains monocytes marginés.

L'actuelle classification des monocytes se fait par leur profil d'expression de différents marqueurs membranaires. Certaines études les définissent aussi par leur localisation et considèrent les monocytes uniquement comme étant des cellules mononucléées présentes dans le sang. Elles proposent que l'on se réfère ensuite aux monocytes qui infiltrent un tissu comme à des cellules dérivées de monocytes (Randolph et al., 2008). Si la différenciation des monocytes a bien lieu, en particulier en condition inflammatoire, elle ne concerne pas la totalité des monocytes. L'utilisation du blood/tissue partitionning a permis d'observer que les monocytes considérés comme tissulaires se trouvaient en partie dans le réseau vasculaire de l'organe. Dans le poumon par exemple, en condition physiologique, plus de 90% des monocytes sont présents dans les vaisseaux. Ils ne se limitent donc pas à un compartiment et

doivent être défini comme une population cellulaire à part entière sans limite de localisation. De plus, la caractérisation des monocytes dans le compartiment vasculaire des tissus ouvre de nouvelles voies dans l'étude de la biologie de ces cellules. Les différences fonctionnelles entre monocytes intravasculaires et monocytes infiltrés restent encore à étudier.

En plus de leur marqueur d'expression, les sous-populations monocytaires se distinguent par leurs fonctions en conditions homéostatiques et inflammatoires, comme la surveillance des endothéliums vasculaires par les monocytes Ly6C^{low}. L'étude de la compartimentation des monocytes entre tissulaires, marginés et circulants a permis de montrer que les monocytes inflammatoires peuvent résider dans les vaisseaux en conditions homéostatiques dans les mêmes proportions que les monocytes Ly6C^{low}. Si les monocytes inflammatoires sont décrits comme les premiers à être recrutés sur le site inflammatoire en réponse au chimiotactisme dépendant de CCL2, nos résultats indiquent que ces cellules ne vont pas toutes infiltrer le tissu ou engager de processus de différenciation.

Chez la souris, la dénomination des monocytes Ly6C^{low} comme monocytes résidents est controversée. Elle suggère la capacité de ces monocytes à résider dans les vaisseaux où ils exercent leur fonction de surveillance. Or, ces monocytes sont tout à fait capables d'infiltrer les tissus, en particulier pour la réparation tissulaire (Nahrendorf et al., 2007). Ceci s'applique aussi au terme de patrouilleur (patrolling monocyte) qui limite les monocytes Ly6C^{low} à leur fonction dans le sang. Dans d'autres études, le nom de « macrophages du sang » est proposé car la diminution de l'expression du Ly6C et du CCR2 et les fonctions qu'ils exercent dans le sang rapprochent ces monocytes d'un phénotype de macrophages (Ginhoux and Jung, 2014). Cependant, encore une fois ces cellules ne sont pas limitées au compartiment sanguin et ont des profils transcriptionnels différents de ceux des macrophages et plus proche de ceux des monocytes inflammatoires. Aucun des noms proposés n'est donc entièrement cohérent, c'est

pourquoi j'ai choisi de garder l'association avec leur expression du Ly6C qui les définit en tant que monocytes différents des monocytes Ly6C^{high} (Hanna et al., 2011).

La classification des sous-populations monocytaires entre l'homme et la souris se base en partie sur l'expression des récepteurs de chimiokines CCR2 et CX3CR1. L'analogie entre les deux espèces doit cependant être faite avec beaucoup de précaution car les différences de proportions dans la circulation sanguine et les différences de recrutement sur le site inflammatoire sont très importantes. Ainsi, les homologies entre les fonctions des sous-populations monocytaires de ces espèces restent encore à établir.

De même, pour les macrophages ou les cellules dendritiques, la complexité des sous-populations existantes et des fonctions immunes qui leur sont propres peut rendre compliqué l'analogie entre les espèces précliniques et l'homme. La nouvelle classification proposée par Williams *et al.* ouvre de nouvelles perspectives sur l'homologie des populations entre les espèces (Williams et al., 2014).

Le paradoxe des macrophages est de façon étonnante la capacité d'une même population cellulaire à exercer des fonctions diamétralement opposées. Les macrophages sont capables d'interagir en relation très étroite avec leur environnement et ils sont sensibles à un très grand nombre de perturbations de cet environnement. En fonction de la zone où ils se situent, de la voie qui a conduit à leur recrutement où des cellules avec lesquelles ils communiquent, les macrophages peuvent modifier les fonctions immunes qu'ils exercent.

De nombreuses questions restent encore sans réponse pour comprendre comment ces cellules parviennent à répondre de façon la plus optimale possible aux modifications de leur environnement et comment au sein d'un même environnement ces cellules peuvent avoir des fonctions si opposées. En plus de la dimension temporelle, il semble donc essentiel d'affiner

la dimension spatiale de l'étude des macrophages car leur plasticité est sans doute liée à des changements infimes que l'on ne peut pas détecter à l'échelle tissulaire. Dans l'ensemble, la mobilité des phagocytes mononucléés est une voie d'étude majeure pour affiner notre compréhension des fonctions immunes exercées par ces cellules après leur recrutement spécifique dans des tissus où des zones particulières (hypoxie, apoptose...).

La mobilisation des monocytes et de l'ensemble des leucocytes par les chimiokines peut parfois être compliquée à étudier *in vivo* à cause de la redondance des chimiokines et de leur récepteur. Malgré cela, l'utilisation d'antagonistes ciblant des axes chimiokiniques représente un potentiel thérapeutique important dans le traitement des pathologies inflammatoires. La complexité du réseau permet d'envisager que le traitement spécifique et ponctuel d'une chimiokine ciblera certaines fonctions du système immunitaire, tout en préservant son mode de fonctionnement général.

Le couple CX3CL1/CX3CR1 est particulièrement intéressant dans le cycle de vie des monocytes et des macrophages. Tout d'abord, ils sont chacun l'unique ligand et récepteur de l'autre, ce qui permet d'optimiser leur étude. D'autre part, les deux formes du CX3CL1 lui confèrent des fonctions variées dont les mécanismes sont encore peu connus. En effet, nous savons que la forme membranaire a un rôle dans la rétention des monocytes dans le parenchyme médullaire et dans la survie des monocytes. De même, la forme soluble est très importante pour la migration des monocytes dans la circulation sanguine et dans les tissus. Cependant, il est parfois compliqué de savoir quelle forme est impliquée dans quels mécanismes. Le « patrolling » des monocytes Ly6C^{low} est dépendant de LFA-1, mais il y a peu d'élément de réponse sur les mécanismes liés au CX3CL1 (Auffray et al., 2007). La chimiokine est impliquée dans cette fonction, mais nous ne savons pas si la forme membranaire participe à la liaison à l'endothélium ou si c'est la forme soluble qui permet le

déplacement des monocytes en combinaison avec LFA-1 et qui permet la surveillance de l'ensemble de l'endothélium vasculaire, indépendamment du flux sanguin.

L'axe CX3CL1/CX3CR1 est très important pour l'adhérence de monocytes marginés grâce à l'expression du CX3CL1 par les cellules endothéliales. Nous savons aussi que l'expression du ligand Notch Delta-like 1 par les cellules endothéliales permet la différenciation des monocytes inflammatoires en monocytes Ly6C^{low} dans des niches particulières de la moelle osseuse ou de la rate (Gamrekelashvili et al., 2016). Ainsi, il est possible que la margination participe à cette différenciation via le CX3CR1. En effet, la margination permet de maintenir les monocytes dans les niches et les souris déficientes en CX3CR1 ont moins de monocytes Ly6C^{low} potentiellement parce que les monocytes inflammatoires adhèrent moins dans les niches pour se différencier. Cela apporterait un nouveau rôle indirect du CX3CR1 dans la différenciation des monocytes en condition basale.

L'aboutissement des recherches sur les mécanismes associés à chaque forme de CX3CL1 serait un moyen de cibler directement des fonctions spécifiques des monocytes. Par exemple, un inhibiteur de la chimiokine membranaire pourrait cibler directement la rétention dans la moelle osseuse et la survie des monocytes et des macrophages dans les tissus alors que des antagonistes de la forme soluble permettraient de limiter uniquement le recrutement des monocytes dans les tissus.

La contribution du CX3CR1 a été peu étudiée dans le rôle des macrophages au sein de la tumeur. Il représente pourtant une cible intéressante puisqu'il est impliqué dans la survie et le recrutement des monocytes et des macrophages en conditions physiologique et inflammatoire. Il est aussi très important pour les fonctions anti-tumorales des NK (Lavergne et al., 2003).

Dans l'ensemble, les axes de recherche sur la découverte de nouveaux traitements anti-cancéreux sont très variés. Les molécules ciblant des protagonistes du système immunitaire en sont une partie et peuvent elles aussi toucher plusieurs voies dans le développement tumoral, que ce soit le recrutement des cellules, leur activation ou inhibition, l'immunorégulation ou la cytotoxicité directe et indirecte. Tout est mis en œuvre pour pouvoir optimiser les traitements déjà présents et chaque étude utilise les spécificités connues de chaque type tumoral en fonction du tissu et du stade d'avancement. Les nouveaux traitements sont souvent compliqués à valider et à tester cliniquement. Mais nul doute que certains d'entre eux rencontreront le succès d'une efficacité seul ou en combinaison. D'autre part, ces recherches ont aussi mené à la découverte de marqueurs nécessaires au diagnostic et très utiles pour optimiser le choix du traitement. Par exemple, nous avons montré que l'expression de CCR2 par les Treg pouvait servir comme biomarqueur de la réponse à la chimiothérapie (Loyher et al., 2016).

Les thérapies ciblées sont en nette progression grâce à l'ensemble des recherches menées pour comprendre les mécanismes de développement des tumeurs. Ainsi, sur les 43 thérapies ciblées autorisées depuis 2015, 65% l'ont été entre 2012 et 2015 (Source : Institut National du Cancer). En revanche, ces thérapies sont attribuées à une minorité de patients en raison de la localisation tumorale ou de l'identification d'altération moléculaire. Ces dernières sont associées à la moitié des thérapies ciblées de façon très précise telles que HER2 dans le cancer du sein, BRAF dans le mélanome ou encore ALK et EGFR dans les cancers du poumon. Le coût de ces thérapies est aussi très élevé ce qui limite leur mise à disposition. Malgré cela, l'expansion des thérapies ciblées continue et les connaissances du développement tumoral et du microenvironnement tumoral vont permettre l'amélioration du choix des traitements.

L'association entre l'inflammation et le développement tumoral a été une avancée majeure dans la recherche de traitements anti-tumoraux. Les effets pro-tumoraux de l'inflammation comme la prolifération, la survie et les métastases sont issus de mécanismes déjà connus dans d'autres pathologies inflammatoires. Ceci a permis d'identifier de nouvelles cibles pour lutter contre ces mécanismes au sein de la tumeur. De même, les cellules tumorales sont capables de détourner certaines fonctions des cellules présentes dans leur environnement. En ce sens, les macrophages sont très importants dans les mécanismes d'angiogenèse et d'invasion tumorale.

Le rôle des monocytes inflammatoires dans le développement tumoral est encore peu connu. Nous savons qu'une fois qu'ils infiltrent la tumeur, ils peuvent se différencier en macrophages. En revanche, leur impact propre est mal défini. Ces monocytes pourraient exercer une fonction anti-tumorale transitoire avant d'engager un processus de différenciation. Nous avons identifié des pistes pour considérer les monocytes comme étant anti-tumoraux. En effet, la combinaison du cyclophosphamide à l'anti-VEGF ne modifie pas l'infiltration des monocytes, pourtant l'efficacité thérapeutique est améliorée. Il reste cependant à comprendre par quels mécanismes ce phénomène a lieu et s'il est possible de maintenir cet effet. La vérification de cette hypothèse pourrait conduire à des études visant à maintenir cet état anti-inflammatoire tout en diminuant leur différenciation. L'intérêt est double puisque cela apporterait un soutien contre le développement de la tumeur et diminuerait le renouvellement en macrophages pro-tumoraux.

Les monocytes Ly6C^{low} sont eux aussi peu étudiés dans le cancer. Il semble que leurs fonctions dans l'immunosurveillance leur permettent de contrer le développement tumoral et les métastases et nos résultats montrent qu'ils n'infiltrent pas la tumeur et ne se différencient pas en TAM. Cet aspect bénéfique est contrebalancé par leur implication dans l'échec de

certaines thérapies anti-tumorales. Des études doivent encore être menées pour mieux comprendre la cause de ces différentes réponses.

Les macrophages restent une cible très prisée dans l'étude des thérapies anti-tumorales pour plusieurs raisons. Tout d'abord, la plasticité des macrophages est un axe de recherche qui permet d'envisager la possibilité de pouvoir changer la polarisation d'un macrophage pro-tumoral pour qu'il devienne anti-tumoral. Ainsi, il y aurait une source très importante de cellules au sein du TME capable de détruire la tumeur. D'autre part, les macrophages sont impliqués dans de nombreux effets secondaires de thérapies anti-cancéreuses comme les thérapies conventionnelles ou les anticorps monoclonaux. Dans les cas où ces effets sont bénéfiques, l'identification des mécanismes qui en sont à l'origine pourraient permettre d'optimiser les thérapies pour qu'elles aient à la fois une fonction dans la destruction des cellules tumorales et dans l'activation des macrophages. Les effets secondaires des thérapies sur les macrophages ne sont pas toujours positifs. Souvent, les macrophages ont un rôle dans l'échec des thérapies. Il est primordial de parvenir à stopper cet effet sur les macrophages afin d'améliorer l'efficacité de nombreuses thérapies. Pour cela, certaines pistes sont envisagées comme les thérapies combinées. Le but est alors de bloquer la réponse pro-tumorale des TAM pour améliorer l'efficacité de traitement principal. C'est ce que nous sommes parvenus à réaliser avec la combinaison du cyclophosphamide et de l'anti-VEGF dans le traitement des métastases pulmonaires.

Dans l'ensemble, mes travaux ont apporté une vision globale de la capacité des monocytes à se mobiliser dans l'organisme, surtout avec la mise en évidence de monocytes marginés et la découverte de monocytes intravasculaires participant à la surveillance du poumon. De plus, la mise en évidence des origines différentes des TAM dans les métastases pulmonaires ouvrent de nouvelles portes pour améliorer l'efficacité des traitements anti-cancéreux.

BIBLIOGRAPHIE

- Abraham, D., Zins, K., Sioud, M., Lucas, T., Schafer, R., Stanley, E.R., and Aharinejad, S. (2010). Stromal cell-derived CSF-1 blockade prolongs xenograft survival of CSF-1-negative neuroblastoma. *Int J Cancer* *126*, 1339-1352.
- Addison, C.L., Daniel, T.O., Burdick, M.D., Liu, H., Ehlert, J.E., Xue, Y.Y., Buechi, L., Walz, A., Richmond, A., and Strieter, R.M. (2000). The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR+ CXC chemokine-induced angiogenic activity. *J Immunol* *165*, 5269-5277.
- Aderem, A., and Underhill, D.M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* *17*, 593-623.
- Aguirre-Ghiso, J.A. (2007). Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer* *7*, 834-846.
- Andersen, M.H., Schrama, D., Thor Straten, P., and Becker, J.C. (2006). Cytotoxic T cells. *J Invest Dermatol* *126*, 32-41.
- Arango Duque, G., and Descoteaux, A. (2014). Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol* *5*, 491.
- Asano, K., Nabeyama, A., Miyake, Y., Qiu, C.H., Kurita, A., Tomura, M., Kanagawa, O., Fujii, S., and Tanaka, M. (2011). CD169-positive macrophages dominate antitumor immunity by crosspresenting dead cell-associated antigens. *Immunity* *34*, 85-95.
- Auffray, C., Fogg, D., Garfa, M., Elain, G., Join-Lambert, O., Kayal, S., Sarnacki, S., Cumano, A., Lauvau, G., and Geissmann, F. (2007). Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* *317*, 666-670.
- Auffray, C., Sieweke, M.H., and Geissmann, F. (2009). Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* *27*, 669-692.
- Augier, S., Ciucci, T., Luci, C., Carle, G.F., Blin-Wakkach, C., and Wakkach, A. (2010). Inflammatory blood monocytes contribute to tumor development and represent a privileged target to improve host immunosurveillance. *J Immunol* *185*, 7165-7173.
- Bachelierie, F., Graham, G.J., Locati, M., Mantovani, A., Murphy, P.M., Nibbs, R., Rot, A., Sozzani, S., and Thelen, M. (2014). New nomenclature for atypical chemokine receptors. *Nat Immunol* *15*, 207-208.
- Backer, R., Schwandt, T., Greuter, M., Oosting, M., Jungerkes, F., Tuting, T., Boon, L., O'Toole, T., Kraal, G., Limmer, A., *et al.* (2010). Effective collaboration between marginal metallophilic macrophages and CD8+ dendritic cells in the generation of cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 216-221.
- Bailey, C., Negus, R., Morris, A., Ziprin, P., Goldin, R., Allavena, P., Peck, D., and Darzi, A. (2007). Chemokine expression is associated with the accumulation of tumour associated macrophages (TAMs) and progression in human colorectal cancer. *Clin Exp Metastasis* *24*, 121-130.
- Balkwill, F., and Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* *357*, 539-545.
- Baratin, M., Simon, L., Jorquera, A., Ghigo, C., Dembele, D., Nowak, J., Gentek, R., Wienert, S., Klauschen, F., Malissen, B., *et al.* (2017). T Cell Zone Resident Macrophages Silently Dispose of Apoptotic Cells in the Lymph Node. *Immunity* *47*, 349-362 e345.
- Bazan, J.F., Bacon, K.B., Hardiman, G., Wang, W., Soo, K., Rossi, D., Greaves, D.R., Zlotnik, A., and Schall, T.J. (1997). A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* *385*, 640-644.

Bedoret, D., Wallemacq, H., Marichal, T., Desmet, C., Quesada Calvo, F., Henry, E., Closset, R., Dewals, B., Thielen, C., Gustin, P., *et al.* (2009). Lung interstitial macrophages alter dendritic cell functions to prevent airway allergy in mice. *J Clin Invest* *119*, 3723-3738.

Belge, K.U., Dayyani, F., Horelt, A., Siedlar, M., Frankenberger, M., Frankenberger, B., Espevik, T., and Ziegler-Heitbrock, L. (2002). The proinflammatory CD14⁺CD16⁺DR⁺⁺ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol* *168*, 3536-3542.

Ben-Sasson, S.Z., Hu-Li, J., Quiel, J., Cauchetaux, S., Ratner, M., Shapira, I., Dinarello, C.A., and Paul, W.E. (2009). IL-1 acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 7119-7124.

Bogdan, C., Rollinghoff, M., and Diefenbach, A. (2000). Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol* *12*, 64-76.

Boissonnas, A., Licata, F., Poupel, L., Jacquelin, S., Fetler, L., Krumeich, S., They, C., Amigorena, S., and Combadiere, C. (2013). CD8⁺ tumor-infiltrating T cells are trapped in the tumor-dendritic cell network. *Neoplasia* *15*, 85-94.

Bonapace, L., Coissieux, M.M., Wyckoff, J., Mertz, K.D., Varga, Z., Junt, T., and Bentires-Alj, M. (2014). Cessation of CCL2 inhibition accelerates breast cancer metastasis by promoting angiogenesis. *Nature* *515*, 130-133.

Boring, L., Gosling, J., Cleary, M., and Charo, I.F. (1998). Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* *394*, 894-897.

Borsig, L., Wong, R., Feramisco, J., Nadeau, D.R., Varki, N.M., and Varki, A. (2001). Heparin and cancer revisited: mechanistic connections involving platelets, P-selectin, carcinoma mucins, and tumor metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 3352-3357.

Bosco, M.C., Puppo, M., Pastorino, S., Mi, Z., Melillo, G., Massazza, S., Rapisarda, A., and Varesio, L. (2004a). Hypoxia selectively inhibits monocyte chemoattractant protein-1 production by macrophages. *J Immunol* *172*, 1681-1690.

Bosco, M.C., Reffo, G., Puppo, M., and Varesio, L. (2004b). Hypoxia inhibits the expression of the CCR5 chemokine receptor in macrophages. *Cell Immunol* *228*, 1-7.

Bottazzi, B., Walter, S., Govoni, D., Colotta, F., and Mantovani, A. (1992). Monocyte chemotactic cytokine gene transfer modulates macrophage infiltration, growth, and susceptibility to IL-2 therapy of a murine melanoma. *J Immunol* *148*, 1280-1285.

Bowman, R.L., Klemm, F., Akkari, L., Pyonteck, S.M., Sevenich, L., Quail, D.F., Dhara, S., Simpson, K., Gardner, E.E., Iacobuzio-Donahue, C.A., *et al.* (2016). Macrophage Ontogeny Underlies Differences in Tumor-Specific Education in Brain Malignancies. *Cell Rep* *17*, 2445-2459.

Bronte, V., and Zanovello, P. (2005). Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol* *5*, 641-654.

Burnet, M. (1957). Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *Br Med J* *1*, 779-786.

Campbell, J.J., Haraldsen, G., Pan, J., Rottman, J., Qin, S., Ponath, P., Andrew, D.P., Warnke, R., Ruffing, N., Kassam, N., *et al.* (1999). The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells. *Nature* *400*, 776-780.

Carlin, L.M., Stamatiades, E.G., Auffray, C., Hanna, R.N., Glover, L., Vizcay-Barrena, G., Hedrick, C.C., Cook, H.T., Diebold, S., and Geissmann, F. (2013). Nr4a1-dependent Ly6C^(low) monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal. *Cell* *153*, 362-375.

Carman, C.V. (2009). Mechanisms for transcellular diapedesis: probing and pathfinding by 'invadosome-like protrusions'. *J Cell Sci* *122*, 3025-3035.

Celia-Terrassa, T., and Kang, Y. (2016). Distinctive properties of metastasis-initiating cells. *Genes Dev* *30*, 892-908.

Chaffer, C.L., and Weinberg, R.A. (2011). A perspective on cancer cell metastasis. *Science* 331, 1559-1564.

Chao, M.P., Weissman, I.L., and Majeti, R. (2012). The CD47-SIRPalpha pathway in cancer immune evasion and potential therapeutic implications. *Curr Opin Immunol* 24, 225-232.

Charo, I.F., and Ransohoff, R.M. (2006). The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 354, 610-621.

Cheever, M.A., Allison, J.P., Ferris, A.S., Finn, O.J., Hastings, B.M., Hecht, T.T., Mellman, I., Prindiville, S.A., Viner, J.L., Weiner, L.M., *et al.* (2009). The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clin Cancer Res* 15, 5323-5337.

Cheong, C., Matos, I., Choi, J.H., Dandamudi, D.B., Shrestha, E., Longhi, M.P., Jeffrey, K.L., Anthony, R.M., Kluger, C., Nchinda, G., *et al.* (2010). Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas. *Cell* 143, 416-429.

Chiang, C.S., Fu, S.Y., Wang, S.C., Yu, C.F., Chen, F.H., Lin, C.M., and Hong, J.H. (2012). Irradiation promotes an m2 macrophage phenotype in tumor hypoxia. *Front Oncol* 2, 89.

Cohen, M.H., Gootenberg, J., Keegan, P., and Pazdur, R. (2007). FDA drug approval summary: bevacizumab (Avastin) plus Carboplatin and Paclitaxel as first-line treatment of advanced/metastatic recurrent nonsquamous non-small cell lung cancer. *Oncologist* 12, 713-718.

Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., and Mantovani, A. (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 30, 1073-1081.

Condeelis, J., and Pollard, J.W. (2006). Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 124, 263-266.

Connolly, K.A., Belt, B.A., Figueroa, N.M., Murthy, A., Patel, A., Kim, M., Lord, E.M., Linehan, D.C., and Gerber, S.A. (2016). Increasing the efficacy of radiotherapy by modulating the CCR2/CCR5 chemokine axes. *Oncotarget* 7, 86522-86535.

Connor, R.I., Shen, L., and Fanger, M.W. (1990). Evaluation of the antibody-dependent cytotoxic capabilities of individual human monocytes. Role of Fc gamma RI and Fc gamma RII and the effects of cytokines at the single cell level. *J Immunol* 145, 1483-1489.

Debru, C. (1993). A particular form of chemotaxis: necrotaxis. An historical view. *Blood Cells* 19, 5-19; discussion 20-13.

Deng, J.C., and Standiford, T.J. (2011). Growth factors and cytokines in acute lung injury. *Compr Physiol* 1, 81-104.

Deng, L., Zhou, J.F., Sellers, R.S., Li, J.F., Nguyen, A.V., Wang, Y., Orlofsky, A., Liu, Q., Hume, D.A., Pollard, J.W., *et al.* (2010). A novel mouse model of inflammatory bowel disease links mammalian target of rapamycin-dependent hyperproliferation of colonic epithelium to inflammation-associated tumorigenesis. *Am J Pathol* 176, 952-967.

Devalaraja, R.M., Nanney, L.B., Du, J., Qian, Q., Yu, Y., Devalaraja, M.N., and Richmond, A. (2000). Delayed wound healing in CXCR2 knockout mice. *J Invest Dermatol* 115, 234-244.

Didierlaurent, A., Simonet, M., and Sirard, J.C. (2005). Innate and acquired plasticity of the intestinal immune system. *Cell Mol Life Sci* 62, 1285-1287.

DiVietro, J.A., Smith, M.J., Smith, B.R., Petruzzelli, L., Larson, R.S., and Lawrence, M.B. (2001). Immobilized IL-8 triggers progressive activation of neutrophils rolling in vitro on P-selectin and intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol* 167, 4017-4025.

Doitsidou, M., Reichman-Fried, M., Stebler, J., Kopranner, M., Dorries, J., Meyer, D., Esguerra, C.V., Leung, T., and Raz, E. (2002). Guidance of primordial germ cell migration by the chemokine SDF-1. *Cell* 111, 647-659.

Dvorak, H.F. (1986). Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 315, 1650-1659.

Erreni, M., Solinas, G., Brescia, P., Osti, D., Zunino, F., Colombo, P., Destro, A., Roncalli, M., Mantovani, A., Draghi, R., *et al.* (2010). Human glioblastoma tumours and neural cancer stem cells express the chemokine CX3CL1 and its receptor CX3CR1. *Eur J Cancer* 46, 3383-3392.

Fife, B.T., Huffnagle, G.B., Kuziel, W.A., and Karpus, W.J. (2000). CC chemokine receptor 2 is critical for induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 192, 899-905.

Flores-Langarica, A., Marshall, J.L., Bobat, S., Mohr, E., Hitchcock, J., Ross, E.A., Coughlan, R.E., Khan, M., Van Rooijen, N., Henderson, I.R., *et al.* (2011). T-zone localized monocyte-derived dendritic cells promote Th1 priming to Salmonella. *Eur J Immunol* 41, 2654-2665.

Fong, A.M., Robinson, L.A., Steeber, D.A., Tedder, T.F., Yoshie, O., Imai, T., and Patel, D.D. (1998). Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow. *J Exp Med* 188, 1413-1419.

Franklin, R.A., Liao, W., Sarkar, A., Kim, M.V., Bivona, M.R., Liu, K., Pamer, E.G., and Li, M.O. (2014). The cellular and molecular origin of tumor-associated macrophages. *Science* 344, 921-925.

Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pages, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., *et al.* (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313, 1960-1964.

Gamrekelashvili, J., Giagnorio, R., Jussofie, J., Soehnlein, O., Duchene, J., Briseno, C.G., Ramasamy, S.K., Krishnasamy, K., Limbourg, A., Kapanadze, T., *et al.* (2016). Regulation of monocyte cell fate by blood vessels mediated by Notch signalling. *Nat Commun* 7, 12597.

Gangur, V., Birmingham, N.P., and Thanesvorakul, S. (2002). Chemokines in health and disease. *Vet Immunol Immunopathol* 86, 127-136.

Garton, K.J., Gough, P.J., Blobel, C.P., Murphy, G., Greaves, D.R., Dempsey, P.J., and Raines, E.W. (2001). Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1). *J Biol Chem* 276, 37993-38001.

Geissmann, F., Jung, S., and Littman, D.R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19, 71-82.

Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., and Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327, 656-661.

Gerszten, R.E., Garcia-Zepeda, E.A., Lim, Y.C., Yoshida, M., Ding, H.A., Gimbrone, M.A., Jr., Luster, A.D., Luscinskas, F.W., and Rosenzweig, A. (1999). MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature* 398, 718-723.

Gibbings, S.L., Thomas, S.M., Atif, S.M., McCubbrey, A.L., Desch, A.N., Danhorn, T., Leach, S.M., Bratton, D.L., Henson, P.M., Janssen, W.J., *et al.* (2017). Three Unique Interstitial Macrophages in the Murine Lung at Steady State. *Am J Respir Cell Mol Biol* 57, 66-76.

Gilbert, J., Lekstrom-Himes, J., Donaldson, D., Lee, Y., Hu, M., Xu, J., Wyant, T., Davidson, M., and Group, M.L.N.S. (2011). Effect of CC chemokine receptor 2 CCR2 blockade on serum C-reactive protein in individuals at atherosclerotic risk and with a single nucleotide polymorphism of the monocyte chemoattractant protein-1 promoter region. *Am J Cardiol* 107, 906-911.

Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., *et al.* (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330, 841-845.

Ginhoux, F., and Guillemins, M. (2016). Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity* 44, 439-449.

Ginhoux, F., and Jung, S. (2014). Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol* 14, 392-404.

Glass, W.G., Lim, J.K., Cholera, R., Pletnev, A.G., Gao, J.L., and Murphy, P.M. (2005). Chemokine receptor CCR5 promotes leukocyte trafficking to the brain and survival in West Nile virus infection. *J Exp Med* 202, 1087-1098.

Goede, V., Brogelli, L., Ziche, M., and Augustin, H.G. (1999). Induction of inflammatory angiogenesis by monocyte chemoattractant protein-1. *Int J Cancer* 82, 765-770.

Goodman, J.W. (1964). On the Origin of Peritoneal Fluid Cells. *Blood* 23, 18-26.

Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3, 23-35.

Graham, G.J., Wright, E.G., Hewick, R., Wolpe, S.D., Wilkie, N.M., Donaldson, D., Lorimore, S., and Pragnell, I.B. (1990). Identification and characterization of an inhibitor of haemopoietic stem cell proliferation. *Nature* 344, 442-444.

Griffin, G.K., Newton, G., Tarrio, M.L., Bu, D.X., Maganto-Garcia, E., Azcutia, V., Alcaide, P., Gräbe, N., Luscinskas, F.W., Croce, K.J., *et al.* (2012). IL-17 and TNF- α sustain neutrophil recruitment during inflammation through synergistic effects on endothelial activation. *J Immunol* 188, 6287-6299.

Grivnenkov, S.I., Greten, F.R., and Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140, 883-899.

Gu, L., Tseng, S., Horner, R.M., Tam, C., Loda, M., and Rollins, B.J. (2000). Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature* 404, 407-411.

Guillemins, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C., Naik, S.H., Onai, N., Schraml, B.U., Segura, E., Tussiwand, R., and Yona, S. (2014). Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol* 14, 571-578.

Gupta, G.P., and Massague, J. (2006). Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 127, 679-695.

Hackel, D., Pflucke, D., Neumann, A., Viebahn, J., Mousa, S., Wischmeyer, E., Roewer, N., Brack, A., and Rittner, H.L. (2013). The connection of monocytes and reactive oxygen species in pain. *PLoS One* 8, e63564.

Haeberlein, S., Sebald, H., Bogdan, C., and Schleicher, U. (2010). IL-18, but not IL-15, contributes to the IL-12-dependent induction of NK-cell effector functions by *Leishmania infantum* in vivo. *Eur J Immunol* 40, 1708-1717.

Hanna, R.N., Carlin, L.M., Hubbeling, H.G., Nackiewicz, D., Green, A.M., Punt, J.A., Geissmann, F., and Hedrick, C.C. (2011). The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and the survival of Ly6C⁺ monocytes. *Nat Immunol* 12, 778-785.

Hanna, R.N., Cekic, C., Sag, D., Tacke, R., Thomas, G.D., Nowyhed, H., Herrley, E., Rasquinha, N., McArdle, S., Wu, R., *et al.* (2015). Patrolling monocytes control tumor metastasis to the lung. *Science* 350, 985-990.

Hardtke, S., Ohl, L., and Forster, R. (2005). Balanced expression of CXCR5 and CCR7 on follicular T helper cells determines their transient positioning to lymph node follicles and is essential for efficient B-cell help. *Blood* 106, 1924-1931.

Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M.B., Leboeuf, M., Becker, C.D., See, P., Price, J., Lucas, D., *et al.* (2013). Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* 38, 792-804.

Hefler, L., Tempfer, C., Heinze, G., Mayerhofer, K., Breitenacker, G., Leodolter, S., Reinthaller, A., and Kainz, C. (1999). Monocyte chemoattractant protein-1 serum levels in ovarian cancer patients. *Br J Cancer* 81, 855-859.

Helmy, K.Y., Katschke, K.J., Jr., Gorgani, N.N., Kljavin, N.M., Elliott, J.M., Diehl, L., Scales, S.J., Ghilardi, N., and van Lookeren Campagne, M. (2006). CRIg: a macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens. *Cell* *124*, 915-927.

Hernandez, L., Smirnova, T., Kedrin, D., Wyckoff, J., Zhu, L., Stanley, E.R., Cox, D., Muller, W.J., Pollard, J.W., Van Rooijen, N., *et al.* (2009). The EGF/CSF-1 paracrine invasion loop can be triggered by heregulin beta1 and CXCL12. *Cancer Res* *69*, 3221-3227.

Herter, S., Birk, M.C., Klein, C., Gerdes, C., Umana, P., and Bacac, M. (2014). Glycoengineering of therapeutic antibodies enhances monocyte/macrophage-mediated phagocytosis and cytotoxicity. *J Immunol* *192*, 2252-2260.

Heusinkveld, M., de Vos van Steenwijk, P.J., Goedemans, R., Ramwadhoebe, T.H., Gorter, A., Welters, M.J., van Hall, T., and van der Burg, S.H. (2011). M2 macrophages induced by prostaglandin E2 and IL-6 from cervical carcinoma are switched to activated M1 macrophages by CD4+ Th1 cells. *J Immunol* *187*, 1157-1165.

Hochreiter-Hufford, A., and Ravichandran, K.S. (2013). Clearing the dead: apoptotic cell sensing, recognition, engulfment, and digestion. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *5*, a008748.

Hoeffel, G., Chen, J., Lavin, Y., Low, D., Almeida, F.F., See, P., Beaudin, A.E., Lum, J., Low, I., Forsberg, E.C., *et al.* (2015). C-Myb(+) erythro-myeloid progenitor-derived fetal monocytes give rise to adult tissue-resident macrophages. *Immunity* *42*, 665-678.

Hughes, R., Qian, B.Z., Rowan, C., Muthana, M., Keklikoglou, I., Olson, O.C., Tazzyman, S., Danson, S., Addison, C., Clemons, M., *et al.* (2015). Perivascular M2 Macrophages Stimulate Tumor Relapse after Chemotherapy. *Cancer Res* *75*, 3479-3491.

Hundhausen, C., Misztela, D., Berkhout, T.A., Broadway, N., Saftig, P., Reiss, K., Hartmann, D., Fahrenholz, F., Postina, R., Matthews, V., *et al.* (2003). The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. *Blood* *102*, 1186-1195.

Hurst, S.M., Wilkinson, T.S., McLoughlin, R.M., Jones, S., Horiuchi, S., Yamamoto, N., Rose-John, S., Fuller, G.M., Topley, N., and Jones, S.A. (2001). Il-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *Immunity* *14*, 705-714.

Huynh, M.L., Fadok, V.A., and Henson, P.M. (2002). Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest* *109*, 41-50.

Iga, M., Boissonnas, A., Mahe, B., Bonduelle, O., Combadiere, C., and Combadiere, B. (2007). Single CX3CL1-Ig DNA administration enhances T cell priming in vivo. *Vaccine* *25*, 4554-4563.

Imaizumi, T., Yoshida, H., and Satoh, K. (2004). Regulation of CX3CL1/fractalkine expression in endothelial cells. *J Atheroscler Thromb* *11*, 15-21.

Isenberg, B.C., Dimilla, P.A., Walker, M., Kim, S., and Wong, J.Y. (2009). Vascular smooth muscle cell durotaxis depends on substrate stiffness gradient strength. *Biophys J* *97*, 1313-1322.

Jacquelin, S., Licata, F., Dorgham, K., Hermand, P., Poupel, L., Guyon, E., Deterre, P., Hume, D.A., Combadiere, C., and Boissonnas, A. (2013). CX3CR1 reduces Ly6Chigh-monocyte motility within and release from the bone marrow after chemotherapy in mice. *Blood* *122*, 674-683.

Jakubzick, C., Gautier, E.L., Gibbings, S.L., Sojka, D.K., Schlitzer, A., Johnson, T.E., Ivanov, S., Duan, Q., Bala, S., Condon, T., *et al.* (2013). Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. *Immunity* *39*, 599-610.

Jenh, C.H., Cox, M.A., Cui, L., Reich, E.P., Sullivan, L., Chen, S.C., Kinsley, D., Qian, S., Kim, S.H., Rosenblum, S., *et al.* (2012). A selective and potent CXCR3 antagonist SCH

546738 attenuates the development of autoimmune diseases and delays graft rejection. *BMC Immunol* 13, 2.

Jinushi, M., Chiba, S., Yoshiyama, H., Masutomi, K., Kinoshita, I., Dosaka-Akita, H., Yagita, H., Takaoka, A., and Tahara, H. (2011). Tumor-associated macrophages regulate tumorigenicity and anticancer drug responses of cancer stem/initiating cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 12425-12430.

Johnston, B., and Butcher, E.C. (2002). Chemokines in rapid leukocyte adhesion triggering and migration. *Semin Immunol* 14, 83-92.

Jones, B.A., Beamer, M., and Ahmed, S. (2010). Fractalkine/CX3CL1: a potential new target for inflammatory diseases. *Mol Interv* 10, 263-270.

Jung, K., Heishi, T., Khan, O.F., Kowalski, P.S., Incio, J., Rahbari, N.N., Chung, E., Clark, J.W., Willett, C.G., Luster, A.D., *et al.* (2017). Ly6Clo monocytes drive immunosuppression and confer resistance to anti-VEGFR2 cancer therapy. *J Clin Invest* 127, 3039-3051.

Jung, S., Aliberti, J., Graemmel, P., Sunshine, M.J., Kreutzberg, G.W., Sher, A., and Littman, D.R. (2000). Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol* 20, 4106-4114.

Kakuta, Y., Okumi, M., Miyagawa, S., Tsutahara, K., Abe, T., Yazawa, K., Matsunami, K., Otsuka, H., Takahara, S., and Nonomura, N. (2012). Blocking of CCR5 and CXCR3 suppresses the infiltration of macrophages in acute renal allograft rejection. *Transplantation* 93, 24-31.

Kaplan, R.N., Riba, R.D., Zacharoulis, S., Bramley, A.H., Vincent, L., Costa, C., MacDonald, D.D., Jin, D.K., Shido, K., Kerns, S.A., *et al.* (2005). VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 438, 820-827.

Kaur, M., and Singh, D. (2013). Neutrophil chemotaxis caused by chronic obstructive pulmonary disease alveolar macrophages: the role of CXCL8 and the receptors CXCR1/CXCR2. *J Pharmacol Exp Ther* 347, 173-180.

Kelner, G.S., Kennedy, J., Bacon, K.B., Kleyensteuber, S., Largaespada, D.A., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Bazan, J.F., Moore, K.W., Schall, T.J., *et al.* (1994). Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* 266, 1395-1399.

Khong, H.T., and Restifo, N.P. (2002). Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol* 3, 999-1005.

Kim, R., Emi, M., and Tanabe, K. (2007). Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* 121, 1-14.

Kim, T.S., and Braciale, T.J. (2009). Respiratory dendritic cell subsets differ in their capacity to support the induction of virus-specific cytotoxic CD8+ T cell responses. *PLoS One* 4, e4204.

Klostergaard, J. (1987). Role of tumor necrosis factor in monocyte/macrophage tumor cytotoxicity in vitro. *Nat Immun Cell Growth Regul* 6, 161-166.

Ko, H.J., Brady, J.L., Ryg-Cornejo, V., Hansen, D.S., Vremec, D., Shortman, K., Zhan, Y., and Lew, A.M. (2014). GM-CSF-responsive monocyte-derived dendritic cells are pivotal in Th17 pathogenesis. *J Immunol* 192, 2202-2209.

Koebel, C.M., Vermi, W., Swann, J.B., Zerafa, N., Rodig, S.J., Old, L.J., Smyth, M.J., and Schreiber, R.D. (2007). Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* 450, 903-907.

Koestler, T.P., Johnson, W.J., Rieman, D., Dalton, B.J., Greig, R.G., and Poste, G. (1987). Differential expression of murine macrophage-mediated tumor cytotoxicity induced by interferons. *Cancer Res* 47, 2804-2808.

Kohyama, M., Ise, W., Edelson, B.T., Wilker, P.R., Hildner, K., Mejia, C., Frazier, W.A., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2009). Role for Spi-C in the development of red pulp macrophages and splenic iron homeostasis. *Nature* 457, 318-321.

Krathwohl, M.D., and Kaiser, J.L. (2004). Chemokines promote quiescence and survival of human neural progenitor cells. *Stem Cells* 22, 109-118.

Krause, P., Morris, V., Greenbaum, J.A., Park, Y., Bjoerheden, U., Mikulski, Z., Muffley, T., Shui, J.W., Kim, G., Cheroutre, H., *et al.* (2015). IL-10-producing intestinal macrophages prevent excessive antibacterial innate immunity by limiting IL-23 synthesis. *Nat Commun* 6, 7055.

Krausgruber, T., Blazek, K., Smallie, T., Alzabin, S., Lockstone, H., Sahgal, N., Hussell, T., Feldmann, M., and Udalova, I.A. (2011). IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nat Immunol* 12, 231-238.

Krutzik, S.R., Tan, B., Li, H., Ochoa, M.T., Liu, P.T., Sharfstein, S.E., Graeber, T.G., Sieling, P.A., Liu, Y.J., Rea, T.H., *et al.* (2005). TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nat Med* 11, 653-660.

Kryczek, I., Zou, L., Rodriguez, P., Zhu, G., Wei, S., Mottram, P., Brumlik, M., Cheng, P., Curiel, T., Myers, L., *et al.* (2006). B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma. *J Exp Med* 203, 871-881.

Kuang, D.M., Zhao, Q., Peng, C., Xu, J., Zhang, J.P., Wu, C., and Zheng, L. (2009). Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1. *J Exp Med* 206, 1327-1337.

Landsman, L., Bar-On, L., Zerneck, A., Kim, K.W., Krauthgamer, R., Shagdarsuren, E., Lira, S.A., Weissman, I.L., Weber, C., and Jung, S. (2009). CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. *Blood* 113, 963-972.

Lasagni, L., Francalanci, M., Annunziato, F., Lazzeri, E., Giannini, S., Cosmi, L., Sagrafinati, C., Mazzinghi, B., Orlando, C., Maggi, E., *et al.* (2003). An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the inhibition of endothelial cell growth induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and acts as functional receptor for platelet factor 4. *J Exp Med* 197, 1537-1549.

Lavergne, E., Combadiere, B., Bonduelle, O., Iga, M., Gao, J.L., Maho, M., Boissonnas, A., Murphy, P.M., Debre, P., and Combadiere, C. (2003). Fractalkine mediates natural killer-dependent antitumor responses in vivo. *Cancer Res* 63, 7468-7474.

Lavin, Y., and Merad, M. (2013). Macrophages: gatekeepers of tissue integrity. *Cancer Immunol Res* 1, 201-209.

Leber, T. (1892). The BOWMAN LECTURE on the PRESENT POSITION of OUR KNOWLEDGE of INFLAMMATION with ESPECIAL REFERENCE to INFLAMMATION of the EYE: Delivered before the Ophthalmological Society of the United Kingdom. *Br Med J* 1, 1357-1358.

Lee, H.W., Choi, H.J., Ha, S.J., Lee, K.T., and Kwon, Y.G. (2013). Recruitment of monocytes/macrophages in different tumor microenvironments. *Biochim Biophys Acta* 1835, 170-179.

Leek, R.D., and Harris, A.L. (2002). Tumor-associated macrophages in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7, 177-189.

Leon, B., and Ardavin, C. (2008). Monocyte migration to inflamed skin and lymph nodes is differentially controlled by L-selectin and PSGL-1. *Blood* 111, 3126-3130.

Leon, B., Lopez-Bravo, M., and Ardavin, C. (2007). Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. *Immunity* 26, 519-531.

Lewis, C., and Murdoch, C. (2005). Macrophage responses to hypoxia: implications for tumor progression and anti-cancer therapies. *Am J Pathol* 167, 627-635.

Lewis, C.E., Harney, A.S., and Pollard, J.W. (2016). The Multifaceted Role of Perivascular Macrophages in Tumors. *Cancer Cell* 30, 365.

- Li, C., Liu, B., Dai, Z., and Tao, Y. (2011). Knockdown of VEGF receptor-1 (VEGFR-1) impairs macrophage infiltration, angiogenesis and growth of clear cell renal cell carcinoma (CRCC). *Cancer Biol Ther* 12, 872-880.
- Lim, S.Y., Yuzhalin, A.E., Gordon-Weeks, A.N., and Muschel, R.J. (2016). Targeting the CCL2-CCR2 signaling axis in cancer metastasis. *Oncotarget* 7, 28697-28710.
- Lin, E.Y., Nguyen, A.V., Russell, R.G., and Pollard, J.W. (2001). Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med* 193, 727-740.
- Lin, E.Y., and Pollard, J.W. (2004). Macrophages: modulators of breast cancer progression. *Novartis Found Symp* 256, 158-168; discussion 168-172, 259-169.
- Loetscher, P., and Clark-Lewis, I. (2001). Agonistic and antagonistic activities of chemokines. *J Leukoc Biol* 69, 881-884.
- Loyher, P.L., Rochefort, J., Baudesson de Chanville, C., Hamon, P., Lescaille, G., Bertolus, C., Guillot-Delost, M., Krummel, M.F., Lemoine, F.M., Combadiere, C., *et al.* (2016). CCR2 Influences T Regulatory Cell Migration to Tumors and Serves as a Biomarker of Cyclophosphamide Sensitivity. *Cancer Res* 76, 6483-6494.
- Luther, S.A., and Cyster, J.G. (2001). Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat Immunol* 2, 102-107.
- Ma, Y., Adjemian, S., Mattarollo, S.R., Yamazaki, T., Aymeric, L., Yang, H., Portela Catani, J.P., Hannani, D., Duret, H., Steegh, K., *et al.* (2013). Anticancer chemotherapy-induced intratumoral recruitment and differentiation of antigen-presenting cells. *Immunity* 38, 729-741.
- Mahalingam, S., and Karupiah, G. (1999). Chemokines and chemokine receptors in infectious diseases. *Immunol Cell Biol* 77, 469-475.
- Makita, N., Hizukuri, Y., Yamashiro, K., Murakawa, M., and Hayashi, Y. (2015). IL-10 enhances the phenotype of M2 macrophages induced by IL-4 and confers the ability to increase eosinophil migration. *Int Immunol* 27, 131-141.
- Mantovani, A. (1999). The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol Today* 20, 254-257.
- Mantovani, A., Marchesi, F., Malesci, A., Laghi, L., and Allavena, P. (2017). Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat Rev Clin Oncol* 14, 399-416.
- Mantovani, A., and Sica, A. (2010). Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr Opin Immunol* 22, 231-237.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25, 677-686.
- Martinez-Lostao, L., Anel, A., and Pardo, J. (2015). How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells? *Clin Cancer Res* 21, 5047-5056.
- Martinez-Pomares, L., and Gordon, S. (2012). CD169+ macrophages at the crossroads of antigen presentation. *Trends Immunol* 33, 66-70.
- Martinez, F.O., and Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* 6, 13.
- Mass, E., Ballesteros, I., Farlik, M., Halbritter, F., Gunther, P., Crozet, L., Jacome-Galarza, C.E., Handler, K., Klughammer, J., Kobayashi, Y., *et al.* (2016). Specification of tissue-resident macrophages during organogenesis. *Science* 353.
- Matsushima, K., Larsen, C.G., DuBois, G.C., and Oppenheim, J.J. (1989). Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line. *J Exp Med* 169, 1485-1490.
- McGettrick, H.M., Lord, J.M., Wang, K.Q., Rainger, G.E., Buckley, C.D., and Nash, G.B. (2006). Chemokine- and adhesion-dependent survival of neutrophils after transmigration through cytokine-stimulated endothelium. *J Leukoc Biol* 79, 779-788.

Medina-Contreras, O., Geem, D., Laur, O., Williams, I.R., Lira, S.A., Nusrat, A., Parkos, C.A., and Denning, T.L. (2011). CX3CR1 regulates intestinal macrophage homeostasis, bacterial translocation, and colitogenic Th17 responses in mice. *J Clin Invest* *121*, 4787-4795.

Mehrad, B., Keane, M.P., and Strieter, R.M. (2007). Chemokines as mediators of angiogenesis. *Thromb Haemost* *97*, 755-762.

Meng, Y., Beckett, M.A., Liang, H., Mauceri, H.J., van Rooijen, N., Cohen, K.S., and Weichselbaum, R.R. (2010). Blockade of tumor necrosis factor alpha signaling in tumor-associated macrophages as a radiosensitizing strategy. *Cancer Res* *70*, 1534-1543.

Miller, R.J., Banisadr, G., and Bhattacharyya, B.J. (2008). CXCR4 signaling in the regulation of stem cell migration and development. *J Neuroimmunol* *198*, 31-38.

Mitchem, J.B., Brennan, D.J., Knolhoff, B.L., Belt, B.A., Zhu, Y., Sanford, D.E., Belaygorod, L., Carpenter, D., Collins, L., Piwnica-Worms, D., *et al.* (2013). Targeting tumor-infiltrating macrophages decreases tumor-initiating cells, relieves immunosuppression, and improves chemotherapeutic responses. *Cancer Res* *73*, 1128-1141.

Mittal, S.K., and Roche, P.A. (2015). Suppression of antigen presentation by IL-10. *Curr Opin Immunol* *34*, 22-27.

Mizutani, K., Sud, S., McGregor, N.A., Martinovski, G., Rice, B.T., Craig, M.J., Varsos, Z.S., Roca, H., and Pienta, K.J. (2009). The chemokine CCL2 increases prostate tumor growth and bone metastasis through macrophage and osteoclast recruitment. *Neoplasia* *11*, 1235-1242.

Montero, A.J., Escobar, M., Lopes, G., Gluck, S., and Vogel, C. (2012). Bevacizumab in the treatment of metastatic breast cancer: friend or foe? *Curr Oncol Rep* *14*, 1-11.

Movahedi, K., Laoui, D., Gysemans, C., Baeten, M., Stange, G., Van den Bossche, J., Mack, M., Pipeleers, D., In't Veld, P., De Baetselier, P., *et al.* (2010). Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes. *Cancer Res* *70*, 5728-5739.

Mukherjee, R., Kanti Barman, P., Kumar Thatoi, P., Tripathy, R., Kumar Das, B., and Ravindran, B. (2015). Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in Sepsis and Systemic Lupus Erythematosus. *Sci Rep* *5*, 13886.

Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M.E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S.N., *et al.* (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* *410*, 50-56.

Murdoch, C., Giannoudis, A., and Lewis, C.E. (2004). Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood* *104*, 2224-2234.

Murdoch, C., Muthana, M., Coffelt, S.B., and Lewis, C.E. (2008). The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* *8*, 618-631.

Murphy, P.M., Baggiolini, M., Charo, I.F., Hiebert, C.A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L.H., Oppenheim, J.J., and Power, C.A. (2000). International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* *52*, 145-176.

Murray, P.J., Allen, J.E., Biswas, S.K., Fisher, E.A., Gilroy, D.W., Goerdt, S., Gordon, S., Hamilton, J.A., Ivashkiv, L.B., Lawrence, T., *et al.* (2014). Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* *41*, 14-20.

Nahrendorf, M., Swirski, F.K., Aikawa, E., Stangenberg, L., Wurdinger, T., Figueiredo, J.L., Libby, P., Weissleder, R., and Pittet, M.J. (2007). The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med* *204*, 3037-3047.

Nakamura, A., Ebina-Shibuya, R., Itoh-Nakadai, A., Muto, A., Shima, H., Saigusa, D., Aoki, J., Ebina, M., Nukiwa, T., and Igarashi, K. (2013). Transcription repressor Bach2 is required for pulmonary surfactant homeostasis and alveolar macrophage function. *J Exp Med* *210*, 2191-2204.

Negus, R.P., Turner, L., Burke, F., and Balkwill, F.R. (1998). Hypoxia down-regulates MCP-1 expression: implications for macrophage distribution in tumors. *J Leukoc Biol* 63, 758-765.

Nelson, P.J., and Krensky, A.M. (2001). Chemokines, chemokine receptors, and allograft rejection. *Immunity* 14, 377-386.

Novak, M.L., and Koh, T.J. (2013). Macrophage phenotypes during tissue repair. *J Leukoc Biol* 93, 875-881.

Nowicki, A., Szenajch, J., Ostrowska, G., Wojtowicz, A., Wojtowicz, K., Kruszewski, A.A., Maruszynski, M., Aukerman, S.L., and Wiktor-Jedrzejczak, W. (1996). Impaired tumor growth in colony-stimulating factor 1 (CSF-1)-deficient, macrophage-deficient op/op mouse: evidence for a role of CSF-1-dependent macrophages in formation of tumor stroma. *Int J Cancer* 65, 112-119.

Noy, R., and Pollard, J.W. (2014). Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity* 41, 49-61.

Oberg, A., Samii, S., Stenling, R., and Lindmark, G. (2002). Different occurrence of CD8+, CD45R0+, and CD68+ immune cells in regional lymph node metastases from colorectal cancer as potential prognostic predictors. *Int J Colorectal Dis* 17, 25-29.

Obmolova, G., Teplyakov, A., Malia, T.J., Grygiel, T.L., Sweet, R., Snyder, L.A., and Gilliland, G.L. (2012). Structural basis for high selectivity of anti-CCL2 neutralizing antibody CNTO 888. *Mol Immunol* 51, 227-233.

Ohta, M., Tanaka, F., Yamaguchi, H., Sadanaga, N., Inoue, H., and Mori, M. (2005). The high expression of Fractalkine results in a better prognosis for colorectal cancer patients. *Int J Oncol* 26, 41-47.

Pachynski, R.K., Wu, S.W., Gunn, M.D., and Erle, D.J. (1998). Secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) stimulates integrin alpha 4 beta 7-mediated adhesion of lymphocytes to mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) under flow. *J Immunol* 161, 952-956.

Palframan, R.T., Collins, P.D., Williams, T.J., and Rankin, S.M. (1998). Eotaxin induces a rapid release of eosinophils and their progenitors from the bone marrow. *Blood* 91, 2240-2248.

Pantel, K., and Brakenhoff, R.H. (2004). Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* 4, 448-456.

Paolicelli, R.C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T.A., Guiducci, E., Dumas, L., *et al.* (2011). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* 333, 1456-1458.

Parihar, A., Eubank, T.D., and Doseff, A.I. (2010). Monocytes and macrophages regulate immunity through dynamic networks of survival and cell death. *J Innate Immun* 2, 204-215.

Passlick, B., Flieger, D., and Ziegler-Heitbrock, H.W. (1989). Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 74, 2527-2534.

Patel, A.A., Zhang, Y., Fullerton, J.N., Boelen, L., Rongvaux, A., Maini, A.A., Bigley, V., Flavell, R.A., Gilroy, D.W., Asquith, B., *et al.* (2017). The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. *J Exp Med* 214, 1913-1923.

Paulus, P., Stanley, E.R., Schafer, R., Abraham, D., and Aharinejad, S. (2006). Colony-stimulating factor-1 antibody reverses chemoresistance in human MCF-7 breast cancer xenografts. *Cancer Res* 66, 4349-4356.

Pease, J., and Horuk, R. (2012). Chemokine receptor antagonists. *J Med Chem* 55, 9363-9392.

Peiser, L., and Gordon, S. (2001). The function of scavenger receptors expressed by macrophages and their role in the regulation of inflammation. *Microbes Infect* 3, 149-159.

- Piaggio, F., Kondylis, V., Pastorino, F., Di Paolo, D., Perri, P., Cossu, I., Schorn, F., Marinaccio, C., Murgia, D., Daga, A., *et al.* (2016). A novel liposomal Clodronate depletes tumor-associated macrophages in primary and metastatic melanoma: Anti-angiogenic and anti-tumor effects. *J Control Release* 223, 165-177.
- Porcheray, F., Viaud, S., Rimaniol, A.C., Leone, C., Samah, B., Dereuddre-Bosquet, N., Dormont, D., and Gras, G. (2005). Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clin Exp Immunol* 142, 481-489.
- Poupel, L., Boissonnas, A., Hermand, P., Dorgham, K., Guyon, E., Auvynet, C., Charles, F.S., Lesnik, P., Deterre, P., and Combadiere, C. (2013). Pharmacological inhibition of the chemokine receptor, CX3CR1, reduces atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33, 2297-2305.
- Prescott, E.M., and Proudfoot, N.J. (2002). Transcriptional collision between convergent genes in budding yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8796-8801.
- Qian, B., Deng, Y., Im, J.H., Muschel, R.J., Zou, Y., Li, J., Lang, R.A., and Pollard, J.W. (2009). A distinct macrophage population mediates metastatic breast cancer cell extravasation, establishment and growth. *PLoS One* 4, e6562.
- Qian, B.Z., Li, J., Zhang, H., Kitamura, T., Zhang, J., Campion, L.R., Kaiser, E.A., Snyder, L.A., and Pollard, J.W. (2011). CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* 475, 222-225.
- Radoja, S., Rao, T.D., Hillman, D., and Frey, A.B. (2000). Mice bearing late-stage tumors have normal functional systemic T cell responses in vitro and in vivo. *J Immunol* 164, 2619-2628.
- Rajagopalan, L., and Rajarathnam, K. (2006). Structural basis of chemokine receptor function--a model for binding affinity and ligand selectivity. *Biosci Rep* 26, 325-339.
- Randolph, G.J., Inaba, K., Robbiani, D.F., Steinman, R.M., and Muller, W.A. (1999). Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity* 11, 753-761.
- Randolph, G.J., Jakubzick, C., and Qu, C. (2008). Antigen presentation by monocytes and monocyte-derived cells. *Curr Opin Immunol* 20, 52-60.
- Randolph, G.J., Sanchez-Schmitz, G., Liebman, R.M., and Schakel, K. (2002). The CD16(+) (FcγRIII(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting. *J Exp Med* 196, 517-527.
- Rayburn, E.R., Ezell, S.J., and Zhang, R. (2009). Anti-Inflammatory Agents for Cancer Therapy. *Mol Cell Pharmacol* 1, 29-43.
- Reinhold, M.I., Lindberg, F.P., Plas, D., Reynolds, S., Peters, M.G., and Brown, E.J. (1995). In vivo expression of alternatively spliced forms of integrin-associated protein (CD47). *J Cell Sci* 108 (Pt 11), 3419-3425.
- Reusser, N.M., Dalton, H.J., Pradeep, S., Gonzalez-Villasana, V., Jennings, N.B., Vasquez, H.G., Wen, Y., Rupaimoole, R., Nagaraja, A.S., Gharpure, K., *et al.* (2014). Clodronate inhibits tumor angiogenesis in mouse models of ovarian cancer. *Cancer Biol Ther* 15, 1061-1067.
- Rigby, W.F., Waugh, M., and Graziano, R.F. (1990). Regulation of human monocyte HLA-DR and CD4 antigen expression, and antigen presentation by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Blood* 76, 189-197.
- Rodriguez, P.C., and Ochoa, A.C. (2008). Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunol Rev* 222, 180-191.
- Rollins, B.J., and Pober, J.S. (1991). Interleukin-4 induces the synthesis and secretion of MCP-1/JE by human endothelial cells. *Am J Pathol* 138, 1315-1319.

Rossi, D., and Zlotnik, A. (2000). The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 18, 217-242.

Ruffell, B., and Coussens, L.M. (2015). Macrophages and therapeutic resistance in cancer. *Cancer Cell* 27, 462-472.

Saji, H., Koike, M., Yamori, T., Saji, S., Seiki, M., Matsushima, K., and Toi, M. (2001). Significant correlation of monocyte chemoattractant protein-1 expression with neovascularization and progression of breast carcinoma. *Cancer* 92, 1085-1091.

Salcedo, R., Ponce, M.L., Young, H.A., Wasserman, K., Ward, J.M., Kleinman, H.K., Oppenheim, J.J., and Murphy, W.J. (2000). Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood* 96, 34-40.

Saleh, M.N., Goldman, S.J., LoBuglio, A.F., Beall, A.C., Sabio, H., McCord, M.C., Minasian, L., Alpaugh, R.K., Weiner, L.M., and Munn, D.H. (1995). CD16+ monocytes in patients with cancer: spontaneous elevation and pharmacologic induction by recombinant human macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 85, 2910-2917.

Samstein, M., Schreiber, H.A., Leiner, I.M., Susac, B., Glickman, M.S., and Pamer, E.G. (2013). Essential yet limited role for CCR2(+) inflammatory monocytes during Mycobacterium tuberculosis-specific T cell priming. *Elife* 2, e01086.

Sandhu, S.K., Papadopoulos, K., Fong, P.C., Patnaik, A., Messiou, C., Olmos, D., Wang, G., Tromp, B.J., Puchalski, T.A., Balkwill, F., *et al.* (2013). A first-in-human, first-in-class, phase I study of carlumab (CNTO 888), a human monoclonal antibody against CC-chemokine ligand 2 in patients with solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 71, 1041-1050.

Schmall, A., Al-Tamari, H.M., Herold, S., Kampschulte, M., Weigert, A., Wietelmann, A., Vipotnik, N., Grimminger, F., Seeger, W., Pullamsetti, S.S., *et al.* (2015). Macrophage and cancer cell cross-talk via CCR2 and CX3CR1 is a fundamental mechanism driving lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 191, 437-447.

Schreiber, R.D., Old, L.J., and Smyth, M.J. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331, 1565-1570.

Sciume, G., Soriani, A., Piccoli, M., Frati, L., Santoni, A., and Bernardini, G. (2010). CX3CR1/CX3CL1 axis negatively controls glioma cell invasion and is modulated by transforming growth factor-beta1. *Neuro Oncol* 12, 701-710.

Serbina, N.V., and Pamer, E.G. (2006). Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol* 7, 311-317.

Shang, B., Liu, Y., Jiang, S.J., and Liu, Y. (2015). Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 5, 15179.

Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2001). IFN-gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410, 1107-1111.

Shi, C., and Pamer, E.G. (2011). Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 11, 762-774.

Sims, G.P., Rowe, D.C., Rietdijk, S.T., Herbst, R., and Coyle, A.J. (2010). HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu Rev Immunol* 28, 367-388.

Steen, A., Larsen, O., Thiele, S., and Rosenkilde, M.M. (2014). Biased and G protein-independent signaling of chemokine receptors. *Front Immunol* 5, 277.

Stein, M., Keshav, S., Harris, N., and Gordon, S. (1992). Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med* 176, 287-292.

Strieter, R.M., Belperio, J.A., Phillips, R.J., and Keane, M.P. (2004). CXC chemokines in angiogenesis of cancer. *Semin Cancer Biol* 14, 195-200.

Sunderkotter, C., Nikolic, T., Dillon, M.J., Van Rooijen, N., Stehling, M., Drevets, D.A., and Leenen, P.J. (2004). Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol* 172, 4410-4417.

Swirski, F.K., Nahrendorf, M., Etzrodt, M., Wildgruber, M., Cortez-Retamozo, V., Panizzi, P., Figueiredo, J.L., Kohler, R.H., Chudnovskiy, A., Waterman, P., *et al.* (2009). Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* 325, 612-616.

Szabo, G., Miller, C.L., and Kodys, K. (1990). Antigen presentation by the CD4 positive monocyte subset. *J Leukoc Biol* 47, 111-120.

Tachibana, K., Hirota, S., Iizasa, H., Yoshida, H., Kawabata, K., Kataoka, Y., Kitamura, Y., Matsushima, K., Yoshida, N., Nishikawa, S., *et al.* (1998). The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 393, 591-594.

Tamoutounour, S., Williams, M., Montanana Sanchis, F., Liu, H., Terhorst, D., Malosse, C., Pollet, E., Ardouin, L., Luche, H., Sanchez, C., *et al.* (2013). Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin. *Immunity* 39, 925-938.

Tanaka, K., Kurebayashi, J., Sohda, M., Nomura, T., Prabhakar, U., Yan, L., and Sonoo, H. (2009). The expression of monocyte chemotactic protein-1 in papillary thyroid carcinoma is correlated with lymph node metastasis and tumor recurrence. *Thyroid* 19, 21-25.

Tanino, Y., Coombe, D.R., Gill, S.E., Kett, W.C., Kajikawa, O., Proudfoot, A.E., Wells, T.N., Parks, W.C., Wight, T.N., Martin, T.R., *et al.* (2010). Kinetics of chemokine-glycosaminoglycan interactions control neutrophil migration into the airspaces of the lungs. *J Immunol* 184, 2677-2685.

Tardaguila, M., Mira, E., Garcia-Cabezas, M.A., Feijoo, A.M., Quintela-Fandino, M., Azcoitia, I., Lira, S.A., and Manes, S. (2013). CX3CL1 promotes breast cancer via transactivation of the EGF pathway. *Cancer Res* 73, 4461-4473.

Thaler, B., Hohensinner, P.J., Krychtiuk, K.A., Matzneller, P., Koller, L., Brekalo, M., Maurer, G., Huber, K., Zeitlinger, M., Jilma, B., *et al.* (2016). Differential in vivo activation of monocyte subsets during low-grade inflammation through experimental endotoxemia in humans. *Sci Rep* 6, 30162.

Thomas, G.D., Hanna, R.N., Vasudevan, N.T., Hamers, A.A., Romanoski, C.E., McArdle, S., Ross, K.D., Blatchley, A., Yoakum, D., Hamilton, B.A., *et al.* (2016). Deleting an Nr4a1 Super-Enhancer Subdomain Ablates Ly6Clow Monocytes while Preserving Macrophage Gene Function. *Immunity* 45, 975-987.

Tian, L., Li, W., Wang, J., Zhang, Y., Zheng, Y., Qi, H., Guo, X., Zhang, Y., Ma, D., Shen, H., *et al.* (2011). The CKLF1-C19 peptide attenuates allergic lung inflammation by inhibiting CCR3- and CCR4-mediated chemotaxis in a mouse model of asthma. *Allergy* 66, 287-297.

Tsai, C.S., Chen, F.H., Wang, C.C., Huang, H.L., Jung, S.M., Wu, C.J., Lee, C.C., McBride, W.H., Chiang, C.S., and Hong, J.H. (2007). Macrophages from irradiated tumors express higher levels of iNOS, arginase-I and COX-2, and promote tumor growth. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 68, 499-507.

Tsou, C.L., Peters, W., Si, Y., Slaymaker, S., Aslanian, A.M., Weisberg, S.P., Mack, M., and Charo, I.F. (2007). Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest* 117, 902-909.

Vaahtomeri, K., Brown, M., Hauschild, R., De Vries, I., Leithner, A.F., Mehling, M., Kaufmann, W.A., and Sixt, M. (2017). Locally Triggered Release of the Chemokine CCL21 Promotes Dendritic Cell Transmigration across Lymphatic Endothelia. *Cell Rep* 19, 902-909.

Vakkila, J., and Lotze, M.T. (2004). Inflammation and necrosis promote tumour growth. *Nat Rev Immunol* 4, 641-648.

van de Laar, L., Saelens, W., De Prijck, S., Martens, L., Scott, C.L., Van Isterdael, G., Hoffmann, E., Beyaert, R., Saeys, Y., Lambrecht, B.N., *et al.* (2016). Yolk Sac Macrophages, Fetal Liver, and Adult Monocytes Can Colonize an Empty Niche and Develop into Functional Tissue-Resident Macrophages. *Immunity* 44, 755-768.

van Furth, R., and Cohn, Z.A. (1968). The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med* 128, 415-435.

van Furth, R., Cohn, Z.A., Hirsch, J.G., Humphrey, J.H., Spector, W.G., and Langevoort, H.L. (1972). The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull World Health Organ* 46, 845-852.

van Furth, R., and Sluiter, W. (1986). Distribution of blood monocytes between a marginating and a circulating pool. *J Exp Med* 163, 474-479.

van Netten, J.P., Ashmead, B.J., Parker, R.L., Thornton, I.G., Fletcher, C., Cavers, D., Coy, P., and Brigden, M.L. (1993). Macrophage-tumor cell associations: a factor in metastasis of breast cancer? *J Leukoc Biol* 54, 360-362.

Venneri, M.A., De Palma, M., Ponzoni, M., Pucci, F., Scielzo, C., Zonari, E., Mazzieri, R., Doglioni, C., and Naldini, L. (2007). Identification of proangiogenic TIE2-expressing monocytes (TEMs) in human peripheral blood and cancer. *Blood* 109, 5276-5285.

Vestweber, D. (2015). How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nat Rev Immunol* 15, 692-704.

Vignali, D.A., Collison, L.W., and Workman, C.J. (2008). How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 8, 523-532.

Viola, A., and Luster, A.D. (2008). Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48, 171-197.

Wang, N., Liang, H., and Zen, K. (2014). Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. *Front Immunol* 5, 614.

Weber, C., Weber, K.S., Klier, C., Gu, S., Wank, R., Horuk, R., and Nelson, P.J. (2001). Specialized roles of the chemokine receptors CCR1 and CCR5 in the recruitment of monocytes and T(H)1-like/CD45RO(+) T cells. *Blood* 97, 1144-1146.

Weber, M., Hauschild, R., Schwarz, J., Moussion, C., de Vries, I., Legler, D.F., Luther, S.A., Bollenbach, T., and Sixt, M. (2013). Interstitial dendritic cell guidance by haptotactic chemokine gradients. *Science* 339, 328-332.

Wei, S.H., Parker, I., Miller, M.J., and Cahalan, M.D. (2003). A stochastic view of lymphocyte motility and trafficking within the lymph node. *Immunol Rev* 195, 136-159.

Weiner, L.M., Clark, J.I., Davey, M., Li, W.S., Garcia de Palazzo, I., Ring, D.B., and Alpaugh, R.K. (1995). Phase I trial of 2B1, a bispecific monoclonal antibody targeting c-erbB-2 and Fc gamma RIII. *Cancer Res* 55, 4586-4593.

Weiskopf, K., and Weissman, I.L. (2015). Macrophages are critical effectors of antibody therapies for cancer. *MAbs* 7, 303-310.

Wyckoff, J., Wang, W., Lin, E.Y., Wang, Y., Pixley, F., Stanley, E.R., Graf, T., Pollard, J.W., Segall, J., and Condeelis, J. (2004). A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer Res* 64, 7022-7029.

Xu, J., Escamilla, J., Mok, S., David, J., Priceman, S., West, B., Bollag, G., McBride, W., and Wu, L. (2013). CSF1R signaling blockade stanches tumor-infiltrating myeloid cells and improves the efficacy of radiotherapy in prostate cancer. *Cancer Res* 73, 2782-2794.

Xue, J., Schmidt, S.V., Sander, J., Draffehn, A., Krebs, W., Quester, I., De Nardo, D., Gohel, T.D., Emde, M., Schmidleithner, L., *et al.* (2014). Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity* 40, 274-288.

Yi, H., Guo, C., Yu, X., Zuo, D., and Wang, X.Y. (2012). Mouse CD11b+Gr-1+ myeloid cells can promote Th17 cell differentiation and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* *189*, 4295-4304.

Yona, S., Kim, K.W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Guilliams, M., Misharin, A., *et al.* (2013). Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* *38*, 79-91.

Yoshimura, T., Matsushima, K., Tanaka, S., Robinson, E.A., Appella, E., Oppenheim, J.J., and Leonard, E.J. (1987). Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* *84*, 9233-9237.

Yoshimura, T., Yuhki, N., Moore, S.K., Appella, E., Lerman, M.I., and Leonard, E.J. (1989). Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE. *FEBS Lett* *244*, 487-493.

Yu, H., Kortylewski, M., and Pardoll, D. (2007). Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* *7*, 41-51.

Zawada, A.M., Rogacev, K.S., Rotter, B., Winter, P., Marell, R.R., Fliser, D., and Heine, G.H. (2011). SuperSAGE evidence for CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes as a third monocyte subset. *Blood* *118*, e50-61.

Zhang, J., Patel, L., and Pienta, K.J. (2010). CC chemokine ligand 2 (CCL2) promotes prostate cancer tumorigenesis and metastasis. *Cytokine Growth Factor Rev* *21*, 41-48.

Zheng, J., Yang, M., Shao, J., Miao, Y., Han, J., and Du, J. (2013a). Chemokine receptor CX3CR1 contributes to macrophage survival in tumor metastasis. *Mol Cancer* *12*, 141.

Zheng, X.F., Hong, Y.X., Feng, G.J., Zhang, G.F., Rogers, H., Lewis, M.A., Williams, D.W., Xia, Z.F., Song, B., and Wei, X.Q. (2013b). Lipopolysaccharide-induced M2 to M1 macrophage transformation for IL-12p70 production is blocked by *Candida albicans* mediated up-regulation of EBI3 expression. *PLoS One* *8*, e63967.

Zhu, Y., Herndon, J.M., Sojka, D.K., Kim, K.W., Knolhoff, B.L., Zuo, C., Cullinan, D.R., Luo, J., Bearden, A.R., Lavine, K.J., *et al.* (2017). Tissue-Resident Macrophages in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Originate from Embryonic Hematopoiesis and Promote Tumor Progression. *Immunity* *47*, 323-338 e326.

Zitvogel, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., and Kroemer, G. (2008). Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol* *8*, 59-73.

Zlotnik, A., Burkhardt, A.M., and Homey, B. (2011). Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis. *Nat Rev Immunol* *11*, 597-606.

Zlotnik, A., and Yoshie, O. (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* *12*, 121-127.

Zou, Y.R., Kottmann, A.H., Kuroda, M., Taniuchi, I., and Littman, D.R. (1998). Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* *393*, 595-599.

Résumé des travaux de thèse

Contrairement au dogme original décrit par van Furth sur le système des phagocytes mononucléés (MP), il est maintenant suggéré que les monocytes ne représentent plus uniquement des précurseurs de macrophages mais qu'ils exercent des fonctions immunologiques en tant que tel. Non seulement les monocytes sont capables de circuler dans les tissus sans se différencier en macrophages mais la plupart des macrophages tissulaires ont en réalité une origine embryonnaire. Je me suis intéressée à l'activité migratoire et aux fonctions effectrices des monocytes et des macrophages grâce à l'utilisation de l'imagerie intravitale. Cette approche nous a permis d'appréhender la dynamique des MP entre le réseau vasculaire et le parenchyme tissulaire. De cette façon nous avons pu mettre en évidence le rôle de CX3CR1 dans le contrôle du déploiement monocyttaire dans un modèle d'inflammation aiguë.

En parallèle, dans un modèle de métastases pulmonaires, nous avons démontré que les monocytes ne contribuent qu'à une partie des macrophages associés aux tumeurs (TAM) et que l'autre partie dérive de la prolifération des macrophages interstitiels du poumon. Ces différentes sous-populations de TAM semblent avoir des contributions différentes dans le développement tumoral et la réponse à la chimiothérapie.

Mon travail a permis de mieux appréhender la biologie des monocytes au-delà de leur fonction comme simples précurseurs de macrophages et apportent des concepts nouveaux sur l'origine des TAM. Ces travaux ouvrent de nouvelles perspectives dans la compréhension des mécanismes biologiques gouvernés par les MP et dans la régulation la réponse inflammatoire.

Abstract

Contrariwise to the original dogma established by van Furth on the Mononuclear Phagocyte System (MPs), it is now suggested that monocyte fate and functions should not be restricted to macrophage precursors. Experimental evidences show that monocytes can circulate in tissues without differentiating and most of the tissue associated macrophages have embryonic origin. My thesis work focused on migratory activity and effective functions of monocytes and macrophages based on intravital imaging technology. This approach represent a unique tool to study the dynamic of MPs between the vasculature and tissue parenchyma. Our work provided new insights in the role of CX3CR1 in the monocyte deployment during acute inflammatory response.

In a model of pulmonary metastases, we also demonstrated that monocytes represent only one part of tumor associated macrophages (TAMs) and the other part is constituted by lung interstitial macrophages. These different subsets of TAMs seem to contribute differently in tumor development and response to chemotherapy.

Overall my work provides new insights about monocyte biology beyond their macrophage precursor fate and presents new concepts on the origin of TAMs. It also adds new perspectives in the understanding of biological mechanism regulated by MPs and in the control of the inflammatory response.