

## Génération et fonctions des macrophages immunorégulateurs

Etienne Foucher

### ▶ To cite this version:

Etienne Foucher. Génération et fonctions des macrophages immunorégulateurs. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers, 2015. Français. NNT: 2015ANGE0056 . tel-02078274

## HAL Id: tel-02078274 https://theses.hal.science/tel-02078274

Submitted on 25 Mar 2019

**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.





## Thèse de Doctorat

## **Etienne FOUCHER**

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Docteur de l'Université d'Angers sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans

École doctorale : Biologie Santé Nantes Angers

Discipline : Sciences, section 65 (Biologie Cellulaire) Spécialité : Immunologie Unité de recherche : UMR 892 INSERM / 6299 CNRS

Soutenue le Jeudi 17 Décembre 2015 Thèse N° : 78140

## Génération et fonctions des macrophages immunorégulateurs

### JURY

Rapporteurs : Pr Véronique CATROS, PU-PH, Université de Rennes 1 Pr Eric TARTOUR, PU-PH, Université Paris Descartes

Examinateurs : Pr Alain MOREL, PU-PH, Université d'Angers

Directeur de Thèse : Pr Pascale JEANNIN, PU-PH, Université d'Angers

## Remerciements

Un Grand MERCI à toutes les personnes de l'équipe 7a et 7b. La thèse est vraiment une aventure qui a été agréable toutes ces années grâce à vous. Pour commencer, je m'excuse mais je ne suis pas trop doué pour les remerciements (Pascale et Céline vous confirmeront que je suis loin d'être un écrivain lol).

Je tiens tout d'abord à remercier les chefs, Pascale et Yves. Pascale pour son enthousiasme débordant, surtout pour les nouveaux projets (le papier, c'est Yves qui le reliera !!), son envie et son savoir qu'elle m'a transmis. Mais je retiendrai aussi ses oublis de prénoms ou ses inversions des mots (pas facile de te suivre Pascale). Yves, merci pour tous tes conseils et ton aide tout au long de ses années, toujours dans la bonne humeur. Et merci de m'avoir gardé en thèse même si au départ ce n'était pas gagné. J'aurais pu faire la thèse la plus courte du labo (1 mois), tout ça à cause d'un numéro de portable (hein Isabelle !!!). Merci à vous deux, vous m'avez beaucoup appris du master 1 à la thèse, en toute simplicité et modestie.

Merci à vous, les deux commères du laboratoire, j'ai nommé Isabelle et Laurence bien sur.

Isabelle, tu as été et tu restera ma première formatrice de ma carrière de « chercheur » et ça tu peux en être fière (lol, et moi aussi j'en suis fier). Ton départ a laissé un grand vide dans le labo, mais profites bien de ta vie bordelaise.

Laurence, merci pour tous, j'ai adoré travailler avec toi, ton envie d'aller toujours plus loin dans les expériences et merci pour les danses endiablées à la retraite scientifique. Tu pourras mettre mes blouses si tu veux ;). Et toutes mes félicitations pour cet heureux événement.

Je continue avec les deux hommes du labo : Simon et Erwan, les mémoires du labo. Vous êtes toujours les premiers à blaguer, à aider ou à retrouver les choses égarées dans le labo. Vous m'avez été indispensables au labo pour me conseiller et m'aider à réaliser mon projet. Merci à vous.

Sans oublier Julie, Céline, Patricia, Céline et l'équipe 7b, Laurent, Estelle, Jérémie et Marie. Avec vous, l'ambiance est toujours au rendez-vous et aussi je retiendrai le rire de Julie que l'on entend de la pièce ELISA. Merci à vous.

Merci à toute la team étudiant « jeune » et « moins jeune ;) ». Estelle, Clément (j'ai commencé par vous les sarthois, les meilleurs ennemis des mayennais), Sénan, Julien, Sylvain, Marie, Sophie, Karim, Caro, Vincent, Léa, Camille, Thomas, Antoine, Pierre... Du labo au jeudi soir au JJ puis au bolech', un pur régal de vous avoir rencontré pour déconner, boire quelques verres (ou plus), pour décompresser des longues et dures journées au labo !!! Il y a tellement de choses à dire, de souvenirs... Un grand merci à tous les potes mayennais, rien ne vaut les bonnes soirées pour se changer les idées, parfois un peu trop dur quand même. A très bientôt à Marseille pour se les remémorer, vous êtes les bienvenus.

Et bien sur, un grand merci à ma famille, des plus petits, Thibault, Maël, Marine et Camille en passant par Marjo, Jean, Charlot, Alex, mes parents, Hilaire et Pierrette, la belle famille, et surtout ma louloute qui m'a supporté pendant ces trois ans. Tout simplement, merci à vous d'être présents, je vous aime.

## Abréviations

ADCC	« Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity »
ARNm	ARN méssager
CCL	« Chemokine Ligand »
CD	« Cluster of differentiation »
CFU-M	« Colony-forming unit-macrophage »
CLR	« C-Type Lectin Receptors »
CMH-I	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
CMH-II	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
СРА	Cellule présentatrice d'antigène
CTL	« Cytotoxic T lymphocyte » ou lymphocyte T cytotoxique
CTLA-4	« Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 »
DAMP	« Damage-Associated Molecular Patterns »
DC	«Dendritic cell » ou cellule dendritique
FoxP3	« Forkhead box 3 »
GILZ	« Glucocorticoid-induced leucine zipper »
GM-CSF	« Granulocyte macrophage colony-stimulating factor »
HLA	« Human leukocyte antigen »
ICOS	« Inducible costimulator »
IDO	Indoleamine 2,3-dioxygenase
IFN	Interféron
IL	Interleukine
ILT	« Immunoglobulin-like Transcript »
iNOS	NO-synthase inductible
KIR	« Killer cell immunoglobulin-like receptors »
LIF	« Leukemia inhibitory factor »
LPS	Lipopolysaccharide
LC	« Langerhans cells » ou cellules de Langerhans
LT	Lymphocyte T
LTh	« Lymphocyte T helper » ou auxiliaire
MCA	Methylcholanthrène
M-CSF	« Macrophage colony-stimulating factor »

M-CSF-Mφ	Macrophages générés in vitro en présence de M-CSF
M-CSF-R	Récepteur au M-CSF
MDSC	« Myeloid-derived suppressor cell »
MMP	« Matrix-metalloprotease »
Μφ	Macrophages
NK	« Natural killer »
NO	Monoxyde d'azote
PAMPs	« Pathogen-associated molecular patterns »
PD-1	« Programmed cell death 1 »
pDC	Cellule dendritique plasmacytoïde
PDGF	« Platelet-derived growth factor »
PGE2	Prostaglandine E2
PRR	« Pattern recognition receptor »
RANKL	Récepteur activateur du ligand du NF-κB
STAT	« Signal transducer and activator of transcription »
ТАМ	« Tumor associated macrophage » ou macrophage associé aux tumeurs
TCR	« T cell receptor »
TGFβ	« Transforming growth factor beta »
TIL	« Tumor infiltrating lymphocyte »
TLR	« Toll-like receptor »
TNF	« Tumor necrosis factor »
TRAIL	« TNF-related apoptosis inducing ligand »
Treg	Lymphocyte T régulateur
VEGF	« Vascular endothelial growth factor »
VHC	Virus de l'hépatite C

## Table des matières

Remerciements	
Abréviations	2
Index des figures	7
Introduction	8
A- Le système immunitaire et le cancer	
1- Le système immunitaire : généralités	8
1.1 La réponse immunitaire innée ou naturelle	8
1.1.1 Généralités	8
1.1.2 Les cellules myéloïdes	9
1.1.3 Les lymphocytes NK	9
1.2 La réponse immunitaire adaptative	9
1.2.1 Généralités	9
1.2.2 Rôles et sous-types des lymphocytes T	10
1.2.3 Activation des lymphocytes T naïfs	11
2- Les cellules tumorales et leur reconnaissance par le système immunitaire	
2.1 Généralités	13
2.2 De la théorie de l'immuno-surveillance au concept d'immunoediting	14
2.3 Les antigènes tumoraux	16
3- Les cellules impliquées dans la lyse de la tumeur	17
3.1 Les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques	17
3.2 Les lymphocytes NK	
3.3 Les autres populations lymphocytaires de l'immunité innée	19
3.3.1 Les lymphocytes T γδ	19
3.3.2 Les cellules « NKT »	20
3.4 Les lymphocytes T CD4+: un rôle auxiliaire	20
3.5 Les cellules myéloïdes	21
3.5.1 Les cellules dendritiques	21
3.5.2 Les macrophages et les neutrophiles	22
4- L'échappement tumoral et les cellules immunosuppressives	22
4.1 L'échappement tumoral : généralités	22
4.2 Les lymphocytes T immunosuppresseurs / pro-tumoraux	24
4.2.1 Les lymphocytes T régulateurs CD4+	24
4.2.2 Les lymphocytes T régulateurs CD8+	26
4.2.3 Les autres populations lymphocytaires pro-tumorales : Th17 et Th2	26
4.3 Les cellules myéloïdes immunorégulatrices pro-tumorales	28
4.3.1 Les cellules dendritiques tolérogéniques	

4.3.2 Les polynucléaires neutrophiles pro-tumoraux	29
4.3.3 Les MDSC	29
5- Immunothérapie anti-tumorale et levée de l'immunosuppression	
5.1 : Généralités sur l'immunothérapie anti-tumorale	
5.2 Levée de l'immunosuppression	32
5.2.1 Inhibition des points de contrôle immunologiques	32
5.2.2 Déplétion des lymphocytes Treg	34
B- Les macrophages – rôles dans le cancer	
1- Origine des macrophages	
1.1 Les macrophages résidents	
1.2 Les macrophages nouvellement recrutés	
2- Principales fonctions des macrophages	
2.1 Les propriétés antimicrobiennes des macrophages	
2.2 Macrophages et homéostasie tissulaire	
3- Plasticité des macrophages	40
3.1 Facteurs de survie et de différenciation des monocytes en macrophages	41
3.2 Les macrophages M1 : profil IL-12 <sup>+</sup> /IL-10 <sup>-</sup>	42
3.2.1 Génération des macrophages M1	42
3.2.2 Principales propriétés des macrophages M1	42
3.3 Les macrophages M2 : profil IL-10+/IL-12	43
3.3.1 Génération des macrophages M2	43
3.3.2 Les macrophages M2a	43
3.3.3 Les macrophages M2b	44
3.3.4 Les macrophages M2c	44
3.3.5 Les macrophages M2d	
4- Les macrophages en situation pathologique	
4.1 Macrophages et fibrose	46
4.2 Les macrophages associés aux tumeurs	46
4.2.1 Recrutement et polarisation des TAMs	47
4.2.2 Rôle pro-tumoral des TAM	
4.2.3 Immunothérapie anti-tumorale visant les TAM	50
Rationnel de l'étude	53
Résultats	54
1-Publication	54
Introduction	54
Matériel et Méthodes	55
Principaux résultats	56
2- Publication	

Introduction	
Matériel et Méthodes	59
Principaux résultats	59
Discussion	61
1- L'IL-34 et le M-CSF agissent de manière similaire sur la différenciation des monocytes en m	acrophages.61
2- Analyse de la présence d'IL-34 et/ou de M-CSF dans différents tissus tumoraux	62
3- Expression et impact de l'IL-1 dans le cancer	63
4- Rôles controversés des lymphocytes Th17	64
5- Immunothérapie anti-tumorale envisagée	66
Conclusion générale	67
Bibliographie	1

## Index des figures

Figure 1. Les sous-populations de lymphocytes T CD4+ auxiliaires et leurs rôles physiologiques et pathologiques	11
Figure 2. Les trois signaux nécessaires à l'activation d'un lymphocyte T naïf	12
Figure 3. Schéma des principales voies de co-inhibition et de co-stimulation du lymphocyte T	13
Figure 4. Les trois phases de la théorie du « cancer immunoediting »	15
Figure 5. Les cellules immunitaires infiltrant la tumeur	16
Figure 6. Les principales fonctions anti-tumorales des cellules NK	19
Figure 7. Phénotype et fonctions des lymphocytes Th17	21
Figure 8. Schéma non-exhaustif des stratégies d'échappement de la tumeur au système immunitaire	23
Figure 9. Les mécanismes d'action possibles des lymphocytes T régulateurs dans l'environnement tumoral	25
Figure 10. Rôles controversés des lymphocytes Th17 dans le cancer	27
Figure 11. Mécanismes d'action de B7-H1 dans la tumeur	29
Figure 12. Deux stratégies d'immunothérapie ciblant les cellules dendritiques	31
Figure 13. Des monocytes aux cellules différenciées dans les tissus	38
Figure 14. Les différentes sous-populations des macrophages humains	45
Figure 15. Fonctions pro-tumorales des TAM et les principaux médiateurs associés	49
Figure 16. Représentation schématique des principaux résultats obtenus, montrant le rôle des macrophages immunorégulateu	rs
dans un contexte tumoral	67

## Introduction

## A- Le système immunitaire et le cancer

Selon A.K Abbas *et al* [1], l'immunité peut être définie comme "la résistance aux maladies, et plus spécifiquement aux maladies infectieuses", le système immunitaire comme "l'ensemble des cellules, des tissus et des molécules qui concourent à opposer une résistance aux infections" et la réponse immunitaire comme "la réaction coordonnée de ces cellules et molécules contre les germes pathogènes".

Bien que la fonction physiologique principale du système immunitaire soit de prévenir les infections et d'éradiquer les infections déclarées, son impact s'étend au-delà des maladies infectieuses. Le système immunitaire constitue le principal obstacle à la transplantation d'organes et est en lien étroit avec le microbiote. De plus, le système immunitaire interagit avec les cellules tumorales et peut être utilisé/manipulé dans un but thérapeutique pour détruire les tumeurs (immunothérapie anti-tumorale).

Avant d'aborder le dialogue entre les cellules tumorales et le système immunitaire, nous rappellerons les principales caractéristiques des cellules immunitaires.

### 1- Le système immunitaire : généralités

De manière schématique la réponse immunitaire fait intervenir successivement deux types de réponse : la réponse immunitaire innée et la réponse immunitaire adaptative.

#### 1.1 La réponse immunitaire innée ou naturelle

#### 1.1.1 Généralités

La réponse immunitaire innée constitue la première ligne de défense de l'hôte contre les pathogènes [2,3]. Présente chez tous les individus sains, elle est efficace de suite, au point d'entrée du microorganisme. Les épithéliums constituent la première ligne de défense de l'immunité innée. La réponse immunitaire innée fait intervenir tout d'abord les épithéliums qui agissent comme une barrière physique, chimique et biologique pour empêcher l'entrée des microbes dans les tissus sous-jacents. Lorsque les microbes réussissent à traverser les épithéliums, ils sont pris en charge, dans les tissus sous-jacents, par des cellules et des facteurs solubles de l'immunité innée qui contribuent à leur destruction.

Ces facteurs solubles comprennent entres-autres des cytokines pro-inflammatoires, des fractions du complément, ainsi que des récepteurs solubles de l'immunité innée. Les acteurs cellulaires de l'immunité innée comprennent des cellules myéloïdes que sont des phagocytes (macrophages (M $\phi$ ) et les polynucléaires neutrophiles (PNN)), ainsi que les polynucléaires basophiles, éosinophiles, les mastocytes et des cellules lymphoïdes que sont les lymphocytes « Natural killer » (NK) et d'autres sous-populations de lymphocytes non conventionnels. En fonction de la nature de l'agression, la réponse immunitaire innée génère deux grands types de réponse : une réponse inflammatoire ou une réponse antivirale.

Nous résumerons ci-dessous les principales caractéristiques des cellules de l'immunité innée.

#### 1.1.2 Les cellules myéloïdes

Les M $\varphi$ , les polynucléaires et les cellules dendritiques (DC) expriment des récepteurs qui leur permettent de reconnaitre les microorganismes. Les récepteurs aux facteurs du complément et aux immunoglobulines permettent la reconnaissance de microorganismes opsonisés. Les récepteurs appelés PRR, pour pattern recognition receptors, reconnaissent des motifs moléculaires exprimés par de grandes familles de microorganismes appelés PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) [4]. Certains de ces PRR reconnaissent également des motifs exprimés par des cellules du soi mortes ou endommagées DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns). Ainsi, les M $\varphi$  et les DC participent non seulement à la réponse protectrice antimicrobienne mais également au contrôle de la tolérance au soi [5].

Alors que les M $\varphi$  et les PNN sont des phagocytes spécialisés dans l'élimination des microorganismes, les DC sont spécialisées dans la présentation des antigènes. Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) sont caractérisées par l'expression des molécules du complexe d'histocompatibilité de classe II (CMH-II). Elles apprêtent et présentent les peptides antigéniques via le CMH aux lymphocytes T [6]. Parmi les CPA (qui comprennent les macrophages, les lymphocytes B et les DC), les DC sont les plus efficaces car ce sont les seules capables d'activer des lymphocytes T naïfs et donc d'initier une réponse immunitaire adaptative. Les DC, à l'état immature, sont retrouvées en faible nombre dans tous les tissus. Après un contact avec des agents étrangers, les DC subissent un processus de maturation, expriment des taux importants de molécules de co-stimulation et migrent dans les ganglions lymphoïdes secondaires à la rencontre des lymphocytes T naïfs. Les lymphocytes T naïfs activés par les DC matures se différencient en lymphocytes T effecteurs.

#### 1.1.3 Les lymphocytes NK

Présentes dans la circulation sanguine (5 à 15% des lymphocytes), les organes lymphoïdes secondaires et dans certains tissus (ex : le foie, le placenta), les cellules NK ont un rôle de sentinelle. Sans éducation préalable, elles reconnaissent et lysent les cellules cibles exprimant à leur surface un taux faible de molécules du CMH de classe I (qui se traduit par une levée des signaux inhibiteurs) et un taux important de signaux activateurs. La balance entre levée des signaux inhibiteurs et signaux activateurs permet l'activation des NK. Ainsi, les cellules NK lysent les cellules tumorales et les cellules infectées par des virus, qui présentent ces deux critères, mais pas les cellules saines du soi [7]. De plus, les cellules NK expriment constitutivement la molécule CD16 (récepteur aux immunoglobulines) et reconnaissent puis lysent les cellules opsonisées par des anticorps (Ac). Les mécanismes utilisés par les cellules NK pour détruire les cellules cibles sont les mêmes que ceux utilisés par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et seront décrits dans le chapitre A-3.

Outre la capacité d'assurer les défenses précoces contre les infections, les réponses immunitaires naturelles initient et contrôlent la nature et l'intensité de la réponse immunitaire adaptative. Les lymphocytes T et les lymphocytes B sont les acteurs principaux de l'immunité adaptative. Dans le paragraphe suivant, seul les lymphocytes T seront décrits.

#### 1.2 La réponse immunitaire adaptative

#### 1.2.1 Généralités

Comparativement à la réponse immunitaire innée, la réponse immunitaire adaptative apparaît plus tardivement, est plus spécifique des agents infectieux, et constitue le support de la mémoire immunologique. La réponse immunitaire adaptative est déclenchée/amplifiée par la présence des microorganismes invasifs. Elle requiert l'expansion et la différenciation de lymphocytes B (LB) et lymphocytes T (LT) en cellules effectrices.

Les lymphocytes B et T reconnaissent des structures appelées antigènes (Ag) par des récepteurs, exprimés de façon clonale, appelés « B-cell receptor » (BCR) et « T-cell receptor » (TCR), respectivement. Ces récepteurs sont caractérisés par une grande diversité (résultat de recombinaisons génétiques aléatoires) et sont ainsi capables de reconnaître une multitude d'antigènes.

L'immunité adaptative élabore des réponses plus importantes et plus efficaces lors d'expositions répétées au même antigène. En effet, la réponse à la première exposition à l'antigène, appelée réponse immunitaire primaire (priming), implique la différenciation de lymphocytes naïfs en lymphocytes effecteurs et en lymphocytes mémoires. La réponse des lymphocytes mémoires, suite à une seconde exposition au même antigène, sera plus rapide, plus importante et donc plus efficace.

Les cellules effectrices exercent, au cours d'une réponse immunitaire, diverses fonctions comme (i) la sécrétion de cytokines (lymphocyte T CD4<sup>+</sup> auxiliaire) ; (ii) la destruction de cellules hôtes infectées par des pathogènes (lymphocyte CD8<sup>+</sup> cytotoxique (CTL)) ; ou encore (iii) la sécrétion d'anticorps (LB). Je ne développerais que la réponse lymphocytaire T.

#### 1.2.2 Rôles et sous-types des lymphocytes T

De façon schématique, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> effecteurs ont trois grands rôles : (i) la stimulation des cellules de l'immunité innée (ii) l'activation des lymphocytes B et (iii) la différenciation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> naïfs en CTL capables de lyser des cellules tumorales ou infectées par un virus [8].

On distingue différents sous types de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> auxiliaire ou « helper » (LTh), en fonction du panel de cytokines qu'ils produisent. Ces sous-types de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ont des fonctions physiologiques spécifiques, mais qui peuvent être délétères lorsque l'homéostasie est rompue par une réponse excessive ou inadaptée. Ainsi, dans des conditions pathologiques et/ou dans le cancer, chacune des sous-populations peuvent présenter des rôles différents. L'induction des sous-populations des lymphocytes T humains CD4<sup>+</sup> ainsi que leurs rôles physio(patho)logiques sont résumés dans la figure 1.

Les facteurs présents dans l'environnement contrôlent la polarisation des lymphocytes T qui correspondent au signal 3 décrits dans le paragraphe suivant. De plus, la majorité des sous populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> semblent être plastiques, c'est-à-dire que leur polarisation une fois établie ne serait pas figée mais pourrait encore être remodifiée par l'environnement [9].





#### 1.2.3 Activation des lymphocytes T naïfs

Les lymphocytes T matures naïfs CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>, issus du thymus, circulent en continu entre le sang et les organes lymphoïdes secondaires jusqu'à ce qu'ils rencontrent l'antigène présenté dans le contexte du CMH vis-à-vis duquel leur TCR est spécifique. Pour proliférer et se différencier en lymphocytes T effecteurs, les lymphocytes T naïfs doivent recevoir plusieurs signaux transmis par une DC mature (Figure 2) [10].



#### Figure 2. Les trois signaux nécessaires à l'activation d'un lymphocyte T naïf.

Le signal 1 correspond à l'interaction CMH / peptide et TCR. Le signal 2 consiste en l'interaction entre les molécules de costimulation et/ou de co-inhibition et leur(s) récepteur(s). Le signal 3 est donné par les cytokines environnantes. CMH : complexe majeur d'histocompatibilité ; TCR : T-cell receptor. D'après Liechtenstein *et al*, J Clin Cell Immuol. 2012, S12 pii:006.

*Le premier signal* assure la spécificité puisqu'il correspond à la reconnaissance par le TCR, (i) du complexe CMH-II / peptide antigénique reconnu par le TCR des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, ou (ii) du complexe CMH-I / peptide antigénique reconnu par le TCR des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>.

En général, un antigène exogène capturé par la CPA sera présenté dans le contexte du CMH-II alors que les antigènes intracellulaires (ex : viraux, tumoraux, antigènes du soi) seront présentés dans les molécules du CMH-I. Cependant, dans certaines conditions, une autre voie de présentation, appelée présentation antigénique croisée, permet la présentation des Ag exogènes dans les molécules du CMH-I. Cette voie présente un intérêt dans la réponse anti-tumorale puisqu'elle pourrait permettre de présenter des Ag tumoraux dans le CMH-I et donc d'initier des réponses lymphocytaire T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques spécifiques de la tumeur [11].

*Le second signal*, médié par l'interaction entre des molécules de co-stimulation, contrôle l'intensité de la réponse. Il est fourni par l'interaction entre les molécules de co-stimulation exprimées par les CPA et leurs récepteurs exprimés par les lymphocytes T. Les molécules de co-stimulation appartiennent à la superfamille des immunoglobulines (molécules de la famille B7), de la famille du TNF ou encore de la famille des intégrines. Les signaux de co-stimulation, par exemple fournis par les interactions CD80-CD86 / CD28 ou par ICOS-L / ICOS (Figure 2 et 3), sont indispensables pour activer les lymphocytes T et induire leur maturation en lymphocytes T effecteurs (par exemple une réponse anti-tumorale). En absence d'un second signal, les lymphocytes T deviennent anergiques, c'est-à-dire incapables de répondre à une nouvelle stimulation, ou entrent en apoptose.

A côté des molécules co-stimulatrices, afin de maintenir la tolérance au soi et d'éviter un emballement de la réponse lymphocytaire, il existe des molécules co-inhibitrices, comme l'interaction B7-H1 (PD-L1) / PD-1 (Figure 2 et 3).



**Figure 3. Schéma des principales voies de co-inhibition et de co-stimulation du lymphocyte T.** DC : cellule dendritique ; « T cell » : lymphocyte T. D'après Bakdash *et al*, Front Immunol. 2013, 28;4:53.

Enfin, *le troisième signal* est fourni par des cytokines de l'environnement (figure 1 et 2), sécrétées par différents types cellulaires immunitaires comme les CPA (ex : IL-12) et les lymphocytes T (ex : IL-2 qui agit de façon autocrine). Ce signal polarise les lymphocytes T en différents sous-types, définis essentiellement par leur production cytokinique (décrit auparavant dans le paragraphe 1.2.2, figure 1). Par exemple, des CPA peuvent produire de l'IL-1 et de l'IL-23 permettant une polarisation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs humains en lymphocytes Th17.

# 2- Les cellules tumorales et leur reconnaissance par le système immunitaire

#### 2.1 Généralités

<u>Le cancer</u> est définit dans le Larousse Médical comme une maladie qui a pour mécanisme une prolifération cellulaire anarchique, incontrôlée et incessante. Cette prolifération cellulaire anarchique prend naissance à partir d'une cellule saine qui dégénère pour des raisons d'instabilités génomiques (mutations). Ce processus peut évoluer vers un cancer avec une augmentation du volume tissulaire constituant ainsi le tissu tumoral.

Cette définition du cancer axée exclusivement sur la cellule tumorale est aujourd'hui complétée par la notion <u>du microenvironnement tumoral</u>. En effet, il est maintenant établi que le système immunitaire et les cellules tumorales interagissent de façon bidirectionnelle. Le microenvironnement tumoral est composé par des cellules du système immunitaire, des néovaisseaux, du tissu de soutien (fibroblastes) et des facteurs solubles.

#### 2.2 De la théorie de l'immuno-surveillance au concept d'immunoediting

Deux théories ont été proposées successivement pour décrire les interactions entre les cellules tumorales et le système immunitaire.

#### a) Théorie de l'immuno-surveillance

Au début du 20<sup>ème</sup> siècle, Ehrlich soutient la théorie de l'immuno-surveillance qui propose que le système immunitaire est capable de contrôler et d'éliminer les cellules malignes. Cette théorie reposait sur différentes observations dont celle de Cooley, qui retrouvait une corrélation entre la régression de sarcomes osseux et la survenue de surinfection post-opératoire par un streptocoque pathogène responsable d'érésipèle. Dans les années 1950, Burnet et Thomas ont repris ce concept d'une surveillance par le système immunitaire des cellules tumorales. Les lymphocytes seraient responsables de l'élimination des cellules tumorales en continuelle formation.

Cette théorie fut abandonnée suite aux travaux parus dans les années 1980 démontrant que les tumeurs ne se développaient pas plus rapidement dans des souris nude (déficientes en lymphocytes T et lymphocytes B) que dans des souris sauvages [12]. Ces résultats furent ensuite expliqués par l'existence de cellules NK fonctionnelles chez les souris nude [13,14]. Puis dans les années 90, des études ont démontré que le risque de développement tumoral est plus élevé dans des souris déficientes aux récepteurs de la perforine et de l'IFN $\gamma$  que dans des souris sauvages [15-17], confirmant un rôle du système immunitaire dans l'élimination des cellules tumorales.

Chez l'homme, les preuves d'une immuno-surveillance sont indirectes : (i) les patients immunodéprimés (par exemple après une greffe) développent plus de cancers que les individus non immunodéprimés et (ii) un infiltrat important de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de la tumeur, de cellules NK et/ou de cellules NKT est corrélé avec un bon pronostic dans certains cancers (ovaires, colon) [18].

Néanmoins, des tumeurs malignes se développent chez des individus immunocompétents, indiquant que l'immunité anti-tumorale ne suffit souvent pas à prévenir la croissance tumorale ou est facilement débordée par des tumeurs à croissance rapide. Le concept d'immuno-surveillance a donc été élargi au concept du « cancer immunoediting ».

#### b) Théorie du « cancer immunoediting »

Selon ce concept, le système immunitaire a des effets paradoxaux sur la tumeur [19]. Il peut détruire les cellules tumorales mais il peut également favoriser la croissance de la tumeur en sélectionnant des cellules qui échappent au système immunitaire (suite à une pression immunologique).

L'immunoediting, ou théorie des « trois E », reflète un processus dynamique comprenant 3 phases : l'élimination, l'équilibre et l'échappement [20] (Figure 4).

La première phase d'élimination est assimilée au concept d'immuno-surveillance et correspond à la détection et à la destruction des cellules tumorales naissantes par les effecteurs de l'immunité innée et adaptative (Figure 4a). Les principaux acteurs cellulaires de la phase d'élimination de la théorie du « cancer immunoediting » sont décrits dans le chapitre A-3 (CTL et cellules NK).

- Elle est suivie d'une phase d'équilibre, durant laquelle la pression exercée par le système immunitaire favorise le développement de la tumeur par des mécanismes d'échappement à la réponse antitumorale (Figure 4b) ; ces mécanismes d'échappement comprennent une immunosélection inhérente aux cellules tumorales (altération de l'antigénicité, résistance à l'apoptose) et des processus actifs d'immunosuppression inhérents au système immunitaire (modulation de la réponse immunitaire et inhibition des cellules effectrices).
- Ainsi, la phase finale du processus d'immunoediting correspond à l'échappement tumoral (Figure 4c).
   La tumeur, « sculptée immunologiquement », se développe de façon incontrôlée chez un hôte immunocompétent.





La théorie du « cancer immunoediting » ou théorie des « trois E » englobe une phase d'élimination (a), une phase d'équilibre (b), et une phase d'échappement tumoral (c). Sont représentés : les cellules tumorales en développement (bleu), les variants tumoraux émergents (rouge et orange), les cellules non transformées du stroma (gris), les différentes populations lymphocytaires (rose, bleu, violet), l'activité cytotoxique des lymphocytes contre les cellules tumorales (jaune) et les cytokines (points orange). CTL : lymphocyte T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques ; NK : lymphocyte NK ; Th1 : Lymphocyte T CD4<sup>+</sup> auxiliaire Th1. D'après Dunn *et al*, Nat Immunol. 2002, 3:991.

Finalement, le système immunitaire a un double rôle dans le cancer. Bien qu'il puisse détruire les cellules tumorales, il peut également soutenir la progression de la tumeur en favorisant l'échappement tumoral et/ou par la mise en place d'un microenvironnement tumoral immunosuppresseur.

Le développement tumoral dépend donc de l'équilibre entre la réponse immunitaire anti-tumorale et les mécanismes d'échappement des tumeurs au système immunitaire [21]. Le microenvironnement tumoral, très plastique, peut-être constitué à la fois de cellules capables de détruire les cellules tumorales (cellules NK, lymphocytes T cytotoxiques et Th1, macrophages M1, et DC) (Figure 5), mais également de cellules immunosuppressives (MDSC (Myeloid-derived suppressor cells), TAM (« tumor-associated macrophages »), DC tolérogènes, lymphocytes Th2, Treg et Th17) qui permettent l'échappement tumoral [22] (Figure 5). Le microenvironnement tumoral peut être à la fois localisé en périphérie ou au niveau de la tumeur et dans les ganglions lymphatiques proximaux. Nous aborderons successivement ces deux types de cellules dans les chapitres A-3 et A-4.



#### Figure 5. Les cellules immunitaires infiltrant la tumeur.

Au niveau de la tumeur, la réponse immunitaire est constituée par une balance entre les effecteurs favorisant le rejet tumoral et les effecteurs favorisant la progression tumorale. Les cellules NK, les cellules dendritiques (DC), les macrophages M1, ainsi que les lymphocytes T cytotoxiques et Th1 favorisent le rejet tumoral. Par opposition, les cellules dendritiques tolérogènes (DC IDO<sup>+</sup>), les TAM, les cellules myéloïdes immunosuppressives (MDSC), et les lymphocytes Th2 et Treg favorisent la croissance tumorale. NK : lymphocyte NK ; M1 : Macrophage M1 ; CTL : lymphocyte T CD8<sup>+</sup> cytotoxique ; DC : cellule dendritique ; Th1 : Lymphocyte T CD4<sup>+</sup> auxiliaire Th1 ; TAM : macrophages associés aux tumeurs ; Th2 : Lymphocyte T CD4<sup>+</sup> auxiliaire Th2 ; Treg : Lymphocyte T CD4<sup>+</sup> auxiliaire régulateur ; Th17 : Lymphocyte T CD4<sup>+</sup> auxiliaire Th17, MDSC : myeloid-derived suppressive cell. D'après Ostrand-Rosenberg, Curr Opin Genet Dev. 2008, 18(1): 11-18.

#### 2.3 Les antigènes tumoraux

Bien que les cellules tumorales soient des cellules du soi, le système immunitaire peut les reconnaître par le biais des antigènes tumoraux. Un antigène tumoral est une protéine dont certains peptides, exprimés dans les molécules du CMH-I par les tumeurs malignes, sont reconnus par des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> de patients. L'identification et la caractérisation moléculaire du premier antigène tumoral chez l'homme par le groupe de Thierry Boon, au début des années 1990, ont constitué une étape décisive pour l'immunologie des tumeurs. Ces antigènes tumoraux sont utilisés en préclinique en immunothérapie active afin d'induire des CTL spécifiques de tumeurs. Suite à ce travail pionnier, des centaines d'antigènes associés aux tumeurs ont été identifiés et classés en cinq grands groupes [23] :

1-Les antigènes du groupe «cancer testis» (Ex : Mage, NY-ESO1) sont exprimés spécifiquement par le tissu tumoral en dehors d'une expression ectopique par les cellules germinales. Les risques de reconnaissance de ces cellules germinales par les lymphocytes T dirigés contre ce type d'antigène sont très faibles car elles n'expriment pas les molécules CMH.

2-Les antigènes de différenciation sont exprimés dans un tissu donné aussi bien par des cellules normales que par les cellules tumorales correspondantes. L'induction de réponses anti-tumorales dirigées contre ces antigènes expose donc au risque d'auto-immunité.

3-Les antigènes mutés (Kras, P53...), des idiotypes d'immunoglobulines exprimés spécifiquement par le clone B tumoral ou des néoantigènes générés à la suite d'une translocation chromosomique (Bcr-Abl).

4-Des antigènes exprimés par des cellules normales, surexprimés par la tumeur (Her2/neu, Muc 1...).

5-Des antigènes dérivés d'agents pathogène : 15 à 20 % des cancers seraient associés à des agents pathogènes, notamment des virus (papillomavirus et cancers du col de l'utérus ou des voies aérodigestives supérieures, virus des hépatites B et C et cancer du foie), mais également des bactéries (Helicobacter pylori et cancer de l'estomac) ou des parasites (schistosome et cancer de la vessie) chez l'homme.

#### 3- Les cellules impliquées dans la lyse de la tumeur

Le principal mécanisme immunitaire permettant l'éradication des tumeurs est la lyse des cellules tumorales par les CTL spécifiques d'antigènes tumoraux (3.1). Les lymphocytes NK vont également détruire les tumeurs (3.2). L'implication d'autres lymphocytes de l'immunité innée (3.3) et des lymphocytes CD4<sup>+</sup> auxiliaires (3.4), de même que des cellules myéloïdes (3.5), a également été évoquée.

Au contraire, les preuves attestant que les réponses humorales protègent réellement les individus contre la croissance tumorale restent peu convaincantes [24]. La réponse humorale ne sera donc pas détaillée par la suite.

#### *3.1 Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques*

Les CTL sont les principales cellules effectrices de la réponse anti-tumorale et une fréquence élevée de CTL infiltrant les tumeurs est corrélée à un pronostic favorable dans différents cancers [25]. Les CTL ont la capacité de lyser des cellules tumorales par différents mécanismes : (i) la sécrétion de granules contenant des protéines telles que la perforine ou les granzymes, (ii) l'expression de molécules de la famille du TNF, (iii) la sécrétion de l'IFN $\gamma$  et du TNF $\alpha$  et enfin (iv) l'expression de la molécule NKG2D qui potentialise leurs fonctions cytotoxiques. De plus, les CTL sécrètent des cytokines et des chimiokines favorisant le recrutement de PNN et de macrophages amplifiant la réponse anti-tumorale [26].

#### - (i) Perforine/granzyme

Suite à la reconnaissance de la cellule tumorale, la libération par le CTL, dans la synapse immunologique, de la perforine et des granzymes (préformés dans des granules) est le mécanisme le plus rapide et le plus puissant pour lyser les cellules tumorales. Des souris déficientes en perforine ont une capacité de lyse des cellules tumorales plus faible que les souris sauvages, montrant le rôle important de la perforine dans la cytotoxicité des CTL [27]. Des études sur des tumeurs ont montré que la perforine est importante pour l'immuno-surveillance, contrairement au rôle des granzymes qui est moins caractérisé [28,29].

#### - (ii) Ligands induisant l'apoptose

Les CTL induisent aussi la mort par apoptose des cellules cibles suite à l'interaction des molécules de la famille du « tumor necrosis factor » (TNF), FasL ou TRAIL (tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand) exprimées à leur surface, avec leurs ligands respectifs sur la cellule cible [30].

#### - (iii) Expression de cytokines

Les CTL sécrètent de nombreuses cytokines telles que l'IFN $\gamma$  et le TNF $\alpha$ . L'IFN $\gamma$  contribue à éliminer notamment les métastases dans des modèles murins, bloque la prolifération des cellules tumorales et inhibe indirectement l'angiogénèse ce qui limite la croissance tumorale. L'IFN $\gamma$  active des cellules immunitaires. Il

stimule l'expression des molécules du CMH, la production d'IL-12 et l'expression des molécules de costimulation sur les CPA, ce qui accentue la réponse immunitaire effectrice pro-inflammatoire (polarisation des lymphocytes T en lymphocytes Th1 et activation des CTL) [31].

#### - (iv) Expression de NKG2D

NKG2D est exprimé sur les NK et sur les CTL et a plusieurs ligands dont des molécules du CMH-I, MICA, MICB et des ligands de la famille de ULBP. Ces ligands sont souvent exprimés dans des pathologies notamment les cellules tumorales. NKG2D augmente la cytotoxicité et la prolifération des CTL impliquées dans la réponse anti-tumorale. C'est pourquoi, il est considéré comme un facteur de co-stimulation des CTL. Après activation des CTL par l'antigène, NKG2D est sur-exprimé et son inhibition diminue la cytotoxicité [32].

Basés sur ces observations, il est clairement établi que les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques ont un rôle primordial dans l'élimination des cellules tumorales chez l'homme.

### 3.2 Les lymphocytes NK

Chez l'homme, le rôle des NK dans l'immuno-surveillance a été démontré dans de nombreuses études. Les cellules NK lysent les cellules tumorales par des mécanismes identiques aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques décrits dans la figure 6 [33].

L'infiltration des NK dans les tumeurs est de bon pronostic dans différents cancers. Le rôle bénéfique des NK dans le cancer a été démontré dans des essais cliniques. Dans des leucémies myéloïdes, l'injection de NK alloréactifs induit une importante protection et survie des patients [34]. Néanmoins, dans les tumeurs établies, l'infiltrat des lymphocytes NK est faible ce qui entraîne une élimination moins efficace des cellules tumorales [34].



Figure 6. Les principales fonctions anti-tumorales des cellules NK.

Les cellules NK utilisent les molécules perforine/granzyme (a), les molécules de la famille du TNF (b) ou la sécrétion de cytokines telles que l'IFN $\gamma$  (c) pour détruire les cellules tumorales. D'après Smyth *et al*, Nat Rev Cancer. 2002, 2(11):850-61.

#### 3.3 Les autres populations lymphocytaires de l'immunité innée

Outres les lymphocytes NK, deux sous populations lymphocytaires non conventionnelles de l'immunité innée, que sont les lymphocytes T  $\gamma\delta$  et les cellules NKT, présentent également une activité anti-tumorale.

#### <u>3.3.1 Les lymphocytes T γδ</u>

Le TCR est constitué de deux chaines polypeptidiques liées par un pont disulfure et ancrées dans la membrane des lymphocytes. Quatre chaînes polypeptidiques existent :  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ . Outres les lymphocytes T conventionnels (décrits dans le paragraphe suivant) qui expriment un TCR composé des chaines  $\alpha$  et  $\beta$  et sont des cellules de l'immunité adaptive, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  sont des cellules de l'immunité innée et représentent une sous-population minoritaire des lymphocytes T du sang périphérique (<10% des lymphocytes T). Ils sont localisés dans les épithéliums des muqueuses, le sang et les organes périphériques [35].

Il existe différents sous-types de lymphocytes T  $\gamma\delta$  chez l'homme : les lymphocytes T  $\delta1$  (également présents chez la souris) et les lymphocytes T  $\gamma9\delta2$  (non retrouvés chez la souris). In vitro, ces cellules reconnaissent des antigènes tumoraux, expriment la molécule NKG2D, et sécrètent de l'IFN $\gamma$  et du TNF $\alpha$ , leur conférant des propriétés anti-tumorales [36]. Des essais cliniques dans le mélanome, dans le cancer du sein ou dans les leucémies, utilisant des lymphocytes T  $\gamma\delta$  ou leurs ligands sont en cours [37].

#### 3.3.2 Les cellules « NKT »

Les cellules NKT expriment des marqueurs de cellules NK (ex : NK1.1 chez la souris et CD56 chez l'homme) ainsi qu'un TCR  $\alpha\beta$ . La majorité des cellules NKT exprime un TCR invariant et non restreint aux molécules du CMH. Elles reconnaissent un antigène lipidique ou glycolipidique (principalement l' $\alpha$ -galactosylceramide) présenté dans une molécule de CMH-I non conventionnelle, la molécule CD1d. Les rôles des cellules NKT dans la réponse anti-tumorale, étudiés in vitro et in vivo, sont divers : (i) une production d'IFN $\gamma$  induite par l'IL-12 ou l' $\alpha$ -galactosylceramide présentée dans la molécule CD1d et (ii) une cytotoxicité naturelle via la perforine ou la reconnaissance par la molécule NKG2D des cellules tumorales [38].

#### *3.4 Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> : un rôle auxiliaire*

Comme décrit dans le paragraphe A-1, différents sous-types de lymphocytes T auxiliaires existent. Ils ont des fonctions anti- ou pro-tumorales (Figure 1) [39]. Dans ce chapitre, nous nous intéresserons aux sous-populations ayant des propriétés anti-tumorales : les lymphocytes Th1 et Th17. Néanmoins, le rôle des lymphocytes Th17 en tant qu'initiateurs d'événements pro- ou anti-tumoral reste controversé et semble dépendre du contexte du développement tumoral [22,40,41]. Le rôle pro-tumoral des lymphocytes Th17 sera décrit dans le chapitre A-4.

#### -Les lymphocytes Th1

Le rôle anti-tumoral des lymphocytes Th1 et de l'IFN $\gamma$  a été mis en évidence dans des modèles murins. Les tumeurs se développent beaucoup plus rapidement dans les souris déficientes en IFN $\gamma$  ou dans la voie de signalisation de l'IFN $\gamma$  que dans des souris sauvages [42]. Les lymphocytes Th1 exercent une activité anti-tumorale directement via la sécrétion d'IFN $\gamma$  ou indirectement via le recrutement et l'activation de cellules de l'immunité innée, telles que les cellules NK [43]. De plus, les lymphocytes Th1 favorisent le développement et l'activation des CTL via la sécrétion d'IL-2 et activent les CPA après liaison à CD40 (interaction CD40L/CD40) leur permettant d'activer les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>.

#### -Les lymphocytes Th17 pro-inflammatoires

Les lymphocytes Th17 induisent le recrutement de cellules anti-tumorales (NK, DC, PNN et lymphocytes Th1) (Figure 7 et 10), et, outre l'IL-17, sécrètent de l'IL-21, connue pour activer les CTL [44,45]. De plus, les lymphocytes Th17 produisent de l'IFN $\gamma$  et du TNF leur conférant une activité anti-tumorale [46]. Des études ont montré une corrélation entre le nombre des lymphocytes Th17 et l'augmentation de la survie des patients dans différents types de cancers comme les tumeurs de la prostate [47] ou des tumeurs de la plèvre [48]. Une corrélation a été décrite entre le taux important d'IL-17 et la survie des patients dans le cancer de l'ovaire [49].



#### Figure 7. Phénotype et fonctions des lymphocytes Th17.

Les lymphocytes Th17 induisent une inflammation qui sert à détruire des pathogènes extracellulaires et peuvent contribuer à plusieurs maladies auto-immunes. Cette sous-population lymphocytaire sécrète des cytokines comme l'IL-17 ou l'IL-22 qui recrutent des leucocytes dans les sites de reconnaissance antigénique.

Finalement, il a été suggéré que les lymphocytes Th2 pourraient présenter des propriétés anti-tumorales in vitro via les sécrétions d'IL-4 et d'IL-5. Elles activent les polynucléaires éosinophiles qui peuvent libérer des protéines cytotoxiques [39].

#### 3.5 Les cellules myéloïdes

#### 3.5.1 Les cellules dendritiques

Par leur fonction de CPA, les DC jouent un rôle primordial dans l'activation des lymphocytes T. Elles peuvent donc orienter vers une réponse lymphocytaire T anti-tumorale en induisant des lymphocytes Th1 ou des CTL.

Parmi les CPA, les DC sont les plus efficaces pour présenter un antigène exogène aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> naïfs et induire leur activation [50]. De ce fait, les DC sont ciblées dans l'immunothérapie active afin d'induire une réponse efficace des CTL.

De plus, certaines cellules dendritiques possèdent des fonctions cytotoxiques et participent à l'élimination tumorale. Les principales molécules effectrices exprimées par ces cellules dendritiques tueuses sont : TRAIL et FasL (en réponse à une activation par l'IFN $\gamma$ ), perforine et granzyme, et l'oxyde nitrique (NO) [51]. Ces DC tueuses peuvent également phagocyter les cellules tumorales en apoptose et présenter de façon croisée les antigènes tumoraux aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, induisant ainsi leur activation [52].

Un nombre important de DC infiltrant la tumeur est de bon pronostic dans des cancers colorectaux avec des métastases hépatiques [53,54], c'est pourquoi les DC sont ciblées dans l'immunothérapie active. Cependant, dans des modèles murins, il y a moins de DC matures dans les ganglions lymphatiques, la rate et la peau de souris atteintes de cancer comparativement à des souris saines [55,56]. Chez l'homme, le nombre de DC est réduit dans le sang de patients cancéreux comparativement à des donneurs sains [57-59]. L'ablation chirurgicale de la tumeur permet aux patients de retrouver un nombre normal de DC (cancer de la prostate et

du sein) [57,59], indiquant que des facteurs produits par la tumeur pourraient être à l'origine de ce déficit de DC circulantes. Ceci est confirmé par une étude montrant que des exosomes libérés par des cellules tumorales mammaires inhibent la différenciation des DC [60].

#### 3.5.2 Les macrophages et les neutrophiles

Le rôle anti-tumoral des M $\varphi$  et des PNN a été démontré in vitro, mais peu d'études ont démontré leurs rôles in vivo. Les macrophages forment une population hétérogène et peuvent à la fois contribuer à la destruction tumorale ou au contraire favoriser la croissance tumorale en fonction de leur phénotype [61]. Ce sont les macrophages pro-inflammatoires (appelés M1) qui participent à la destruction des cellules tumorales (via la production de cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-12, l'IL-1 et l'IL-6, d'intermédiaires toxiques de l'azote et de l'oxygène, de monoxyde d'azote (NO) et de molécules cytotoxiques TRAIL ou FasL). Ces cellules sont également capables d'activer les CTL [62].

De même, des sous types de neutrophiles pro et anti-tumoraux ont été décrits. Par analogies aux macrophages, les neutrophiles, capables de lyser les cellules tumorales, et caractérisés par la production de TNF $\alpha$ , de NO, et de péroxyde d'hydrogène, ont été appelés neutrophiles N1 [63]. Néanmoins, in vivo, des études ont souligné des effets anti-tumoraux des neutrophiles associés à la tumeur à travers différents mécanismes que sont [64] :

- l'induction de l'apoptose des cellules tumorales et
- l'inhibition de la croissance tumorale et de l'angiogénèse.

### 4- L'échappement tumoral et les cellules immunosuppressives

Malgré la présence de cellules immunitaires capables de lyser les cellules tumorales, la tumeur se développe spontanément chez des personnes immunocompétentes. Ce processus correspond à la phase d'échappement de la théorie du « cancer immunoediting ».

#### 4.1 L'échappement tumoral : généralités

Les cellules tumorales développent différentes stratégies pour échapper à une destruction par les cellules du système immunitaire (Figure 8) [65]. Ce processus dynamique, résulte d'une adaptation des cellules tumorales à la « pression immunologique ». Les cellules tumorales sont capables de se cacher (a), lyser (b), résister (c) ou inhiber les cellules immunitaires (d).



Figure 8. Schéma non-exhaustif des stratégies d'échappement de la tumeur au système immunitaire.

Les cellules tumorales induisent une immunosuppression en sécrétant des cytokines, en recrutant des cellules immunosuppressives ou en échappant à la reconnaissance par les lymphocytes T. LT : lymphocyte T ; TAM : tumor-associated macrophage ; DC : cellule dendritique ; MDSC : myeloid-derived suppressive cell. D'après Wiener, N Engl J Med. 2008, 358: 2664-2665.

a) La tumeur peut se cacher du système immunitaire. Lors de la phase d'équilibre, les cellules tumorales sont soumises à une pression de sélection par le système immunitaire qui favorise la sélection des cellules tumorales ayant mutées et perdues l'expression de certaines molécules du CMH-I (HLA-A, B ou C), d'antigènes tumoraux ou de molécules de co-stimulation pour éviter leur reconnaissance par les CTL [65].

**b)** Les cellules tumorales peuvent développer des mécanismes de résistance à l'apoptose. Elles acquièrent des mutations au niveau de molécules impliquées dans le processus de mort cellulaire (Récepteurs au FasL et TRAIL), rendant ce processus inefficace et/ou elles peuvent sur-exprimer des molécules anti-apoptotiques (Bcl-2) [66].

c) La tumeur peut induire la mort par apoptose des cellules immunitaires via l'expression de molécules cytotoxiques telles que FasL ou PD-L1. Ce phénomène est appelé « tumor counter-attack » [67,68]. De plus, les cellules tumorales peuvent exprimer les molécules HLA-E ou -G (CMH-I non classiques) qui inhibent l'activité anti-tumorale des CTL et des NK par liaison avec des récepteurs inhibiteurs [65,69,70].

d) Finalement, les cellules tumorales mettent en place un environnement immunosuppresseur dans les ganglions drainants la tumeur ou en périphérie de la tumeur [68,71-73]. Pour ce faire, elles produisent des cytokines anti-inflammatoires et pro-angiogéniques telles que l'IL-10, le TGF $\beta$ , le VEGF, l'IL-6 qui favorisent

le recrutement et/ou la génération de cellules immunosuppressives. Ces cellules immunosuppressives et protumorales sont constituées de cellules myéloïdes (MDSC, DC, macrophages) et lymphoïdes (lymphocytes T régulateurs, Th2 et Th17) pro-tumorales.

Dans le chapitre suivant, nous décrirons les cellules immunitaires qui présentent des propriétés immunosuppressives et pro-tumorales, notamment les lymphocytes T régulateurs, les lymphocytes Th17 et Th2 ainsi que des cellules myéloïdes.

#### 4.2 Les lymphocytes T immunosuppresseurs / pro-tumoraux

#### 4.2.1 Les lymphocytes T régulateurs CD4<sup>+</sup>

Les lymphocytes Treg CD4<sup>+</sup> sont une population de lymphocytes T hétérogènes, importante dans le maintien de l'homéostasie des lymphocytes T. Dans de nombreux cancers, les lymphocytes Treg, présents localement, contribuent à inhiber les réponses anti-tumorales effectrices.

Il existe deux populations de lymphocytes Treg CD4<sup>+</sup> : les lymphocytes Treg naturels et les lymphocytes Treg dits induits (ou adaptatifs) [74,75].

<u>Les lymphocytes Treg naturels</u> se développent dans le thymus et sont caractérisés par le phénotype  $CD4^+$  $CD25^+$  Foxp3<sup>+</sup> chez la souris [76]. Chez l'homme, la caractérisation phénotypique des lymphocytes T régulateurs naturels est un peu plus complexe : des lymphocytes T  $CD4^+$   $CD25^{élevé}$  Foxp3<sup>+</sup> ont été initialement décrits et ont une fonction régulatrice. Cependant, des lymphocytes T  $CD4^+$  exprimant des taux moins importants de CD25 peuvent être Foxp3<sup>+</sup> et posséder des propriétés régulatrices [77]. La sélection des cellules  $CD4^+$   $CD25^{élevé}$  ne représente donc pas l'ensemble des lymphocytes T régulateurs naturels. De plus, Foxp3 et CD25 peut être induits dans les lymphocytes T  $CD4^+$  humains après activation par le TCR et leur expression est transitoire et Foxp3 peut être exprimé par les cellules tumorales [78].

Ainsi, les marqueurs CD25 et surtout Foxp3 n'apparaissent donc pas spécifiques des lymphocytes Treg chez l'homme et ne représentent pas que les lymphocytes Treg [76]. En conséquence, l'association de plusieurs marqueurs avec notamment le CD25 est proposée pour identifier les lymphocytes Treg : une faible expression du CD127 (le récepteur à l'IL-7) [77], l'expression de CTLA-4 [79] ou de GITR [80].

<u>Les lymphocytes Treg induits</u> se développent en périphérie, dans les organes lymphoïdes secondaires et sont généralement Foxp3<sup>-</sup>. Ces lymphocytes T correspondent aux lymphocytes Th3, qui produisent du TGF $\beta$ , et aux Tr1 qui sécrètent de l'IL-10 [76]. Cependant, des études ont montré la possibilité d'induire des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> à partir des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> chez l'homme [81] et la souris [82] par des mécanismes impliquant le TGF $\beta$  et/ou l'IL-10. Certains marqueurs exprimés par les lymphocytes Treg naturels (Hélios et Neuropiline-1 (Nrp-1)) ne serait pas exprimés par les lymphocytes Treg induits ce qui permettrait de les distinguer.

D'un point physiologique, les lymphocytes Treg sont essentiels dans le maintien de la tolérance immunitaire. En régulant notamment l'activation des lymphocytes T effecteurs, ils permettent de prévenir des maladies auto-immunes et les inflammations chroniques comme l'asthme mais ils peuvent inhiber les réponses immunitaires contre les parasites et les virus. Dans le cancer, les lymphocytes Treg ont un rôle pro-tumoral et lors de vaccination thérapeutique, ils peuvent inhiber l'immunité anti-tumorale. Le nombre de Treg est augmenté dans le sang, les tumeurs, et/ou les ganglions lymphatiques de patients atteints de nombreux types de cancers [74,83]. Ainsi, des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> spécifiques d'antigènes de mélanome qui inhibent les réponses des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> ont récemment été décrits [84]. Les lymphocytes Treg ont été beaucoup étudiés dans le cancer de l'ovaire et le nombre important de lymphocytes Treg est de mauvais pronostic [85]. Un modèle de cancer de l'ovaire humain a été réalisé en injectant (i) des lymphocytes T humains (isolés d'ascites) stimulés par des DC autologues « chargées » avec l'antigène de tumeur Her2, (ii) des lymphocytes Treg autologues et (iii) des tumeurs ovariennes humaines Her2<sup>+</sup> dans des souris SCID [85]. Ce modèle a permis de démontrer le rôle des lymphocytes Treg dans l'inhibition des réponses CTL spécifiques d'antigènes tumoraux et donc dans la croissance tumorale [85].

Les mécanismes à l'origine des fonctions immunosuppressives des lymphocytes Treg tels que (i) l'expression du CTLA-4, (ii) la production d'IL-10, TGF $\beta$ , perforine et granzyme et (iii) la génération des DC tolérogènes par les Treg sont regroupés dans la figure 9.

Des lymphocytes Treg naturels, des Tr1 et des lymphocytes Th3 sont présents dans l'environnement tumoral [74]. Les lymphocytes Treg naturels sont recrutés au sein de la tumeur par la chimiokine CCL22 [85]. Les lymphocytes Treg induits peuvent être générés par :

(i) des DC immatures par la sécrétion d'IL-10 ou de TGF<sub>β</sub> (expansion des lymphocytes Treg) [86-88],

(ii) des DC tolérogènes via l'expression de B7-H1 [89,90] ou d'IDO [91,92],

- (iii) par les pDC exprimant IDO [93],
- (iv) par les MDSC exprimant Arg1 [94],

(v) par les TAM exprimant GILZ [95] (molécule induisant l'accumulation de lymphocytes T régulateurs [96]), ou

(vi) par la sécrétion d'IL-10 [97] ou de TGFβ [98].



Figure 9. Les mécanismes d'action possibles des lymphocytes T régulateurs dans l'environnement tumoral.

a. Les lymphocytes T régulateurs induisent l'expression de B7-H4 sur les TAM ou de B7-H1 sur les DC, qui inhibent alors les LT. b.
Les lymphocytes T régulateurs tuent les lymphocytes T et les CPA par un mécanisme dépendant de la perforine et des granzymes B.
c. Les lymphocytes T régulateurs exprimant CTLA-4 induisent l'expression d'IDO par les CPA qui provoquent l'apoptose des

lymphocytes T et /ou leur anergie. d. Les lymphocytes T régulateurs sécrètent de l'IL-10 et/ou du TGFβ qui inhibent l'activation des lymphocytes T directement ou indirectement en inhibant les fonctions des CPA ; adapté de Zou W. Nat Rev Immunol. 2006;6(4):295-307.

#### 4.2.2 Les lymphocytes T régulateurs CD8<sup>+</sup>

Les lymphocytes T régulateurs CD8<sup>+</sup>, aussi appelés lymphocytes T suppresseurs, ont été décrits dans les années 1970 [99], et sont propices à l'échappement tumoral [100]. Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> infiltrant des tumeurs inhibent les fonctions cytotoxiques et la prolifération des lymphocytes T [101] et augmentent l'expression des molécules ILT3 et ILT4 sur les DC, induisant l'anergie des lymphocytes T auxiliaires [102]. Chez des patients atteints de cancer de la prostate, des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> infiltrant la tumeur inhibent les réponses lymphocytaires T [103]. Dans le cancer de l'ovaire, les pDC induisent le recrutement de lymphocytes T IL-10<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> dans les ganglions lymphatiques qui inhibent les réponses des lymphocytes T spécifiques d'antigènes tumoraux [104].

De plus, des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> sécrétant de l'IL-10 et du TGF $\beta$  ont été isolés des ganglions, des poumons et des tumeurs dans un modèle murin de cancer du colon avec des métastases pulmonaires [100]. Dans un modèle murin de tumeurs du sein, des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, via la sécrétion l'IL-17, protègent les cellules tumorales de l'apoptose [105] et induisent le recrutement de PNN pro-tumoraux [106].

#### 4.2.3 Les autres populations lymphocytaires pro-tumorales : Th17 et Th2

- Les lymphocytes Th17 : anti- ou pro-tumoral ?

Le rôle des lymphocytes Th17 dans le cancer est très controversé. Leur fonction semble varier selon la nature du cancer, sa localisation et l'état d'avancement de la maladie [107]. Un nombre important de lymphocytes Th17 a été décrit dans de nombreux cancers, comme dans les ganglions de patients atteints de cancers gastriques à des stades avancés [108], dans les tumeurs de la prostate [47], dans les tumeurs ovariennes, du pancréas et du rein [109]. L'IL-17 est également détectée dans des cellules tumorales de lymphomes T cutanés [110].

Malgré un effet anti-tumoral décrit dans la littérature (décrit précédemment dans le chapitre A-3.4), les lymphocytes Th17 sont généralement considérés comme pro-tumoraux (figure 10) [22].

Ils produisent de l'IL-17 qui induit la production de cytokines inflammatoires et pro-angiogéniques telles qu'IL-6, IL-8, TNFα, IL-1 et le VEGF [111,112] favorisant le développement tumoral. Ainsi, ils sont corrélés à une vitesse accrue du développement tumoral et à un mauvais pronostic dans des études sur des hépatocarcinomes [113], des cancers de la prostate [114] ou des carcinomes pulmonaires [115].

De plus, des études in vitro ont montré une expression de CD39 et CD73 (des ectonucléotidases qui réduisent l'ATP en adénosine) ou de TGF $\beta$  à la surface des lymphocytes Th17, qui induisent un environnement immunosuppresseur [45,46,116,117]. Les lymphocytes T étant des cellules plastiques, les lymphocytes Th17 peuvent aussi se polariser en lymphocytes Treg immunosuppresseurs [45].



#### Figure 10. Rôles controversés des lymphocytes Th17 dans le cancer.

Les lymphocytes Th17 présentent à la fois des propriétés anti-tumorales et pro-tumorales qui diffèrent selon l'induction, le phénotype des Th17, la nature et le stade des cancers. NK : lymphocyte NK ; Tc1 : lymphocyte T  $CD8^+$  cytotoxiques ; DC : cellule dendritique ; Th1 : Lymphocyte T  $CD4^+$  auxiliaire Th1 ; Treg : Lymphocyte T  $CD4^+$  auxiliaire régulateur ; Th17 : Lymphocyte T  $CD4^+$  auxiliaire Th17. D'après Guérie and Hugues BioMed Research International, 2015 Article ID 314620

#### - Les lymphocytes Th2 : un rôle pro-tumoral

Les lymphocytes Th2 sont essentiellement pro-tumoraux. Ils favorisent une réponse humoral et inhibent la polarisation des lymphocytes Th1 [39].

Un nombre important de lymphocytes Th2 et un nombre faible de lymphocytes Th1 sont retrouvés dans le sang de patients atteints de cancers gastriques, colorectaux ou de la vessie [118,119]. Dans les carcinomes du col de l'utérus, les lymphocytes T infiltrant la tumeur présentent un profil cytokinique de type Th2 (IL-4<sup>élevé</sup> IFN $\gamma$ <sup>faible</sup>) [120].

La présence de lymphocytes Th2 IL-13<sup>+</sup> favorise la survie et la croissance de différentes tumeurs murines [121], et chez l'homme dans des tumeurs du sein [73]. Dans un modèle de tumeurs mammaires dans des souris humanisées, l'ajout d'anticorps neutralisants l'IL-13 prévient la croissance de la tumeur, démontrant que les lymphocytes Th2 sont importants dans le développement tumoral [73].

De plus, les lymphocytes Th2 aident à la réponse lymphocytaire B et différentes études montrent que des anticorps circulants ciblant la tumeur seraient de mauvais pronostic [122]. Une régression spontanée de tumeurs implantées a été observée dans des souris déficientes en lymphocytes B, contrairement dans des souris sauvages [123]. Le transfert de lymphocytes B dans les souris déficientes conduit à une croissance tumorale et à une diminution des réponses de lymphocytes Th1 et CTL, démontrant le rôle pro-tumoral des lymphocytes Th2 en favorisant une réponse humoral [123].

#### 4.3 Les cellules myéloïdes immunorégulatrices pro-tumorales

Dans la majorité des tumeurs solides, les cellules myéloïdes sont de loin plus abondantes que les lymphocytes T pro-tumoraux. Chez l'homme, le microenvironnement immunosuppresseur tumoral est principalement constitué de TAM (dont le rôle et les caractéristiques seront développés dans la section B), de TAN (« tumor-associated neutrophils ») et contient également des DC tolérogènes. Le terme de MDSC (« myeloid-derived suppressor cells ») est surtout utilisé dans la caractérisation du microenvironnement immunosuppresseur tumoral dans des modèles tumoraux murins.

#### 4.3.1 Les cellules dendritiques tolérogéniques

Par opposition aux TAM, le nombre de DC est faible chez des patients atteints de cancer. En effet, de nombreux facteurs bloquant la différenciation/recrutement des DC matures. Ce sont surtout des DC immatures qui sont retrouvées dans les ganglions lymphatiques drainants la tumeur ou en périphérie de la tumeur [72], ou encore dans les tumeurs de patients atteints de cancer de la prostate ou de carcinomes rénaux où elles peuvent rencontrer les lymphocytes T [124-126].

Ces DC, immatures ou semi-matures, n'induisent pas de réponse anti-tumorale mais au contraire induisent une tolérance des lymphocytes T vis-à-vis de la tumeur en les rendant anergiques [127,128], et sont donc nommées DC tolérogènes. De plus, les DC immatures peuvent induire la différenciation des lymphocytes T en lymphocytes Treg qui eux-mêmes inhibent la réponse des CTL ou des lymphocytes Th1 [86,87,129].

Ces DC immatures, retrouvées chez les patients (dans la tumeur ou circulantes), expriment des molécules coinhibitrices et peu de molécules de co-stimulation [130,131]. B7-H1 (ou PD-L1), exprimée notamment par les DC tolérogènes ou les cellules tumorales [132], se lie à PD-1 (« programmed cell death 1 ») exprimé par les lymphocytes T et cette interaction induit (Figure 11) :

- l'apoptose, l'anergie des lymphocytes T
- la sécrétion d'IL-10 par les lymphocytes T
- l'activation des lymphocytes Treg
- la protection des cellules tumorales de la lyse par les CTL [133]
- l'inhibition de la production d'IL-12 par les DC [89]





Les cellules tumorales et les DC expriment B7-H1. Les LT régulateurs peuvent aussi exprimés B7-H1. Cette molécule va induire l'apoptose, l'anergie, la sécrétion d'IL-10 ou un épuisement des LT. De plus, B7-H1 permet aux cellules tumorales de former un bouclier moléculaire les protégeant contre la lyse par les CTL. D'après Zou et Chen, Nat Rev Immunol. 2008, 8(6):467-77. CTL : lymphocyte T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques ; DC : cellule dendritique ; Treg : Lymphocyte T CD4<sup>+</sup> auxiliaire régulateur.

#### 4.3.2 Les polynucléaires neutrophiles pro-tumoraux

Les TAN représentent un ensemble de neutrophiles, des neutrophiles N1 (anti-tumorale) aux neutrophiles N2 (pro-tumoraux). Dans les tumeurs avancées (murines ou humaines), la majorité des neutrophiles sont de phénotype N2 [63], c'est à dire qu'ils sécrètent des facteurs pro-angiogéniques telles que le VEGF et la MMP9 ainsi que l'oncostatine M (OSM) qui augmente la production de VEGF [134,135].

#### 4.3.3 Les MDSC

Les MDSC ont surtout été observées et caractérisées chez la souris. D'abord nommées « immature myeloid cells » ou « myeloid suppressive cells » (MSC), du fait de leur capacité à supprimer les réponses immunitaires [136,137], ces cellules ont ensuite été appelées « myeloid-derived suppressor cells » ou MDSC en 2007, afin d'éviter toute confusion avec les cellules souches mésenchymateuses (également appelées MSC) [138].

Ces cellules forment une population hétérogène immature qui peuvent se différencier, selon les facteurs présents dans le microenvironnement, en TAM, en TAN [135] et en DC tolérogéniques [139]. Les MDSC murines définies par l'expression de CD11b et Gr1 [137,139], peuvent exprimer des marqueurs de cellules myéloïdes peu différenciées tels que CD31 [140] et d'autres marqueurs d'immunosuppression : CD115 (récepteur au M-CSF) [141], ou CD124 (récepteur à l'IL-4) [142]. Elles expriment des molécules du CMH-I

mais pas du CMH-II [143]. Deux sous-populations ont été identifiées : les MDSC monocytaires et les MDSC granulocytaires [144].

Chez l'homme, ces cellules sont beaucoup moins étudiées. Des cellules myéloïdes immatures circulantes ont été identifiées chez des patients atteints de cancer du sein ou du poumon [57,145]. Ces cellules ont un rôle immunosuppresseur et sont caractérisées par le phénotype CD13<sup>+</sup>, CD14<sup>-</sup>, CD15<sup>+</sup>, CD33<sup>+</sup> et CD34<sup>+</sup> [57,145]. Elles représentent 3% des cellules myéloïdes dans le sang d'individus sains. Leur proportion est augmentée de plus de cinq fois chez les patients atteints de cancer [57,145]. Une étude dans le cancer du sein a positivement corrélé le nombre de MDSC avec le stade de la maladie [146].

Les principales propriétés des MDSC sont :

- (i) d'inhiber la prolifération des lymphocytes T [147,148],
- (ii) d'inhiber la production d'IFN $\gamma$  par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> [143],
- (iii) d'inhiber la génération de CTL en bloquant la liaison CMH/Ag et TCR/CD8 [149],
- (iv) d'inhiber la différenciation ou la prolifération des CTL in vitro [148,150],
- (v) d'inhiber les NK et les Mø pro-inflammatoires [151,152], et
- (vi) de favoriser le développement des lymphocytes T régulateurs CD4<sup>+</sup>[141,153].

De plus, les MDSC sécrètent la MMP9 qui libère le VEGF contenu dans la matrice extracellulaire, favorisant la vascularisation de la tumeur [154] ainsi que le recrutement et l'expansion des MDSC (ce qui met en place une boucle d'amplification).

## 5- Immunothérapie anti-tumorale et levée de l'immunosuppression

#### 5.1 : Généralités sur l'immunothérapie anti-tumorale

Malgré la chimiothérapie ou la radiothérapie, le cancer provoque toujours le décès de nombreux patients, nécessitant la recherche de thérapies complémentaires telles que l'immunothérapie. Les principales stratégies d'immunothérapie anti-tumorale sont basées sur :

- l'utilisation de molécules effectrices (l'immunothérapie passive),

- l'utilisation des cellules immunitaires effectrices (l'immunothérapie adoptive) ou

- l'induction d'une réponse immunitaire protectrice (l'immunothérapie active ou vaccination thérapeutique)

L'immunothérapie passive, utilisée en thérapie, repose sur l'injection d'anticorps humanisés, par exemple ciblant Her2/neu, EGFR, VEGF, CD20, CD52 ou encore CD33 qui sont préconisés pour le traitement de certaines tumeurs solides et hématopoïétiques. Ces Ac sont dirigés contre des antigènes exprimés à la surface des tumeurs ou contre des molécules intervenant dans le développement tumoral (ex : molécules favorisant l'angiogénèse) [155]. Les premiers vont agir en entraînant l'opsonisation des cellules tumorales, leur phagocytose et/ou leur destruction par les NK. Les seconds interfèrent avec une interaction ligand/récepteur impliquée dans la croissance tumorale. Ces anticorps peuvent permettre la stimulation du système immunitaire adaptatif [156].

Contrairement à l'immunothérapie passive, l'immunothérapie adoptive et la vaccination thérapeutique restent au stade de recherche et d'essais cliniques.

L'immunothérapie adoptive consiste à injecter chez les patients des lymphocytes autologues capables de lyser les cellules tumorales. Ces populations lymphocytaires T, préalablement sélectionnés et amplifiés ex vivo [157], sont caractérisées par la présence de CTL spécifiques d'antigènes tumoraux, comme des lymphocytes issus de la tumeur appelés TIL (« Tumor infiltrating Lymphocytes »), des lymphocytes du sang périphérique stimulés in vitro par des antigènes tumoraux ou des clones T CD8<sup>+</sup>. Une nouvelle stratégie est aussi utilisée appelé « CAR T-cells » qui consiste, in vitro, à modifier génétiquement des lymphocytes T du patient afin qu'ils expriment un récepteur chimérique spécifique d'un antigène tumoral afin d'éviter les effets néfastes sur d'autres organes du patient. Des cellules NK activées peuvent également être injectées [158].

L'immunothérapie active a pour but d'induire in vivo une réponse CTL spécifique d'antigènes tumoraux capable de détruire les tumeurs et d'induire une réponse lymphocytaire T mémoire. Brièvement, les antigènes tumoraux ont été utilisés sous formes protéiques (lysats tumoraux, de protéines ou de peptides) ou nucléiques (vecteurs viraux recombinants ou plasmides) injectés soit en présence d'adjuvant (antigènes protéiques) ou soit par des cellules dendritiques autologues générées et chargées par l'antigène tumoral in vitro (respectivement chargement, infection ou transfection) puis réinjectées au patient. Cette étape de thérapie cellulaire étant lourde et couteuse, des approches actuelles consistent à injecter des antigènes tumoraux préalablement couplés à des vecteurs qui vont cibler in vivo les cellules dendritiques et induire leur maturation afin qu'elles activent des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et/ou CD8<sup>+</sup> (Figure 12) [159].



Figure 12. Deux stratégies d'immunothérapie ciblant les cellules dendritiques.

La première stratégie (gauche) consiste à manipuler in vitro les DC autologues avant de les réinjecter au patient. La seconde stratégie consiste à injecter un couple antigène tumoral – vecteur qui ciblera in vivo les DC. D'après Biragyn et Kwak, Nat Med. 2000;6:966-8. DC : Cellules dendritiques.

Bien que les essais basés sur ces approches induisent des réponses CTL spécifiques [160] et montrent parfois des résultats spectaculaires [161], ils restent cependant décevants [67,158,162]. Leur relative

inefficacité peut en partie s'expliquer par l'immunosuppression mise en place dans l'environnement tumoral lors de la phase d'échappement tumoral décrite dans le chapitre A-4 de l'introduction.

A l'heure actuelle, des stratégies visant à lever l'immunosuppression ont été développées afin de booster la réponse immunitaire anti-tumorale. Elles visent à inhiber les signaux immunologiques inhibiteurs et/ou à induire la déplétion des cellules régulatrices (Treg et TAM principalement). Ces approches sont déjà utilisées, de façon complémentaire, aux traitements telles que la chimiothérapie, la radiothérapie, la chirurgie et l'injection d'Ac humanisés (immunothérapie passive). Elles devraient également permettre d'augmenter l'efficacité des stratégies vaccinales anti-tumorales [74].

#### 5.2 Levée de l'immunosuppression

Les stratégies actuellement proposées pour lever l'immunosuppression et augmenter ainsi la réponse immunitaire anti-tumorale effectrice (spontanée ou induite par les cellules) consistent à agir :

- au niveau des points de contrôle immunologiques (« immune checkpoints ») immunorégulateurs.

- sur les cellules immunosuppressives que sont les Treg et les TAM.

#### 5.2.1 Inhibition des points de contrôle immunologiques

Physiologiquement, les points de contrôle atténuent la réponse immunitaire des lymphocytes T, prévenant une sur-activation des lymphocytes T délétère pour l'hôte. Néanmoins, dans le microenvironnement tumoral, de nombreux points de contrôle sont sur-exprimés et induisent l'anergie des lymphocytes T et l'inactivation des NK. De nombreuses études ont été réalisées sur les molécules « CTLA-4 » et « PD-1 » conduisant à des résultats très efficaces en clinique. Les principales données mentionnées dans ce paragraphe sont détaillées dans les revues et les articles suivants [163-166].

a) Neutralisation de CTLA-4. « Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 » est une molécule coinhibitrice, exprimée principalement sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> activés (et pas sur les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques), qui régule l'activation du lymphocyte T. CTLA-4 se fixe, tout comme son homologue CD28 (exprimé constitutivement par les lymphocytes T), sur B7-1 (CD80) et sur B7-2 (CD86) mais avec une plus grande affinité que le CD28. Dans la tumeur, l'expression du CTLA-4 sur les lymphocytes T est augmentée et son interaction avec ses ligands inhibe la réponse anti-tumorale des lymphocytes T, notamment en empêchant l'activation via le CD28 (responsable de l'amplification de la réponse des lymphocytes T).

Un anticorps neutralisant CTLA-4 induit une régression tumorale, dans des essais cliniques de phase I/II dans plusieurs types de cancer, notamment le mélanome, cancer de la prostate, du rein et de l'ovaire. En combinaison avec de la chimiothérapie, une augmentation de la survie des patients est observée dans des essais de phase III, dans le cancer de la prostate et du mélanome. Ce traitement a d'ailleurs été approuvé par la FDA (The U.S. Food and Drug Administration) en 2011.

<u>b) Neutralisation de PD-1.</u> Après la découverte du CTLA-4 comme « immune checkpoint », dans les années 90 à 2000, des études ont mis en évidence le rôle du PD-1 (« Programmed cell death 1 ») et du PD-L1. Comme le CTLA-4, ces molécules co-inhibitrices peuvent être sur-exprimées par des tumeurs.

PD-1 est exprimé sur les lymphocytes T, les lymphocytes B, les cellules NK et certaines cellules tumorales (comme celles du mélanome). PD-1 inhibe la réponse des lymphocytes T effecteurs en induisant un signal négatif en se fixant sur ses ligands PD-L1 (B7-H1) ou PD-L2 (B7-DC). PD-L1 et PD-L2 sont exprimés sur de

nombreux types cellulaires (cellules du système immunitaire, cellules épithéliales endothéliales, cellules tumorales).

Des anticorps neutralisant PD-L1 induisent une augmentation des effets anti-tumoraux dans divers types de tumeur, y compris le mélanome, le carcinome cellulaire rénal, le cancer du poumon " à non petite cellule" et dans le cancer de la vessie. Des essais cliniques de phase I avec un anticorps monoclonal neutralisant PD-1 ont démontré des réponses cliniques significatives dans le mélanome, le carcinome cellulaire rénal, le lymphome d'Hodgkin, le cancer du cou et de la tête, le cancer du poumon épidermoïde et l'adénocarcinome bronchique. La FDA a récemment approuvé, à la suite d'essais cliniques de phase III, deux anticorps anti-PD-1, le MK-3475 et le nivolumab.

Puisque CTLA-4 et PD-1 régulent différentes voies inhibitrices sur les lymphocytes T, des thérapies combinées avec ces deux anticorps ont été testées et ont montré une plus grande efficacité dans la réponse anti-tumorale dans des modèles murins. Dans une récente étude clinique de phase I, la neutralisation de CTLA-4 et PD-1 entraîne une régression tumorale de 80% dans 50% des patients atteints d'un mélanome de stade avancé. Actuellement, d'autres essais cliniques sont en cours combinant la neutralisation du CTLA-4, PD-1 et/ou PD-L1 dans différents types de tumeur.

Depuis la découverte de ces « immune checkpoints », d'autres sont en cours d'évaluation préclinique, notamment en combinaison avec la neutralisation du CTLA-4 et/ou du PD-1.

c) Neutralisation des autres « immune checkpoints ».

- « Lymphocyte activation gene 3 » (LAG-3 ou CD223) est une molécule co-inhibitrice exprimée par les lymphocytes T activés, les cellules NK, les lymphocytes B ainsi que les pDC et sur-exprimée sur les lymphocytes Treg CD4<sup>+</sup>. Son ligand actuellement connu est le CMH-II.

Il a été montré dans des modèles tumoraux murins que la neutralisation de LAG-3 (BMS-986016) permet aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> de ne pas être inhibés par les lymphocytes Treg.

- « T cell immunoglobulin and Mucin 3 » (TIM-3) est exprimée sur les lymphocytes T activés, les cellules NK et les monocytes. Son ligand est la galectine 9. Son rôle de molécule co-inhibitrice a été démontré par l'induction de maladies auto-immunes (absence de signal négatif) lorsque TIM-3 est bloquée.

Dans le cancer, son expression est corrélée avec l'expression de PD-1. Par conséquent des thérapies combinées neutralisant TIM-3 et PD-1 ont été effectuées dans des modèles tumoraux murins. Les résultats ont montré que la combinaison de ces deux anticorps réduit plus efficacement la croissance tumorale que lorsque l'un ou l'autre des anticorps est utilisé seul.

- «V-domain Ig-containing suppressor of T cell activation» (VISTA) est une molécule co-inhibitrice récemment découverte. Chez la souris et l'homme, VISTA est principalement exprimée sur les cellules myéloïdes et granulocytaires. L'interaction de VISTA avec les lymphocytes T inhibe leur prolifération et leur fonction effectrice, et favorise la génération de lymphocytes T FoxP3<sup>+</sup>. Il a été montré qu'un anticorps neutralisant VISTA entraîne des réponses anti-tumorales significatives dans des modèles tumoraux murins et des études sont actuellement en cours chez l'homme.

- « Killer Inhibitory Receptors » (KIR) sont principalement retrouvés sur les cellules NK. Les KIR se fixent sur certaines classes du CMH-I (notamment exprimé par les cellules tumorales) et entraînent l'inhibition des cellules NK. Ainsi, le but est de bloquer ce récepteur afin que les cellules NK puissent lyser les cellules tumorales par les différents mécanismes décrits dans le paragraphe A-3.2.

Des études précliniques ont montré une plus grande efficacité des cellules NK à lyser les cellules tumorales en présence d'un anticorps bloquant les KIR. Des essais cliniques sont en cours avec le lirilumab qui se fixe sur

les KIR2DL-1, KIR2DL-2, KIR2DL-3 inhibant la fixation de ces KIR sur HLA-C en combinaison ou non avec la neutralisation du CTLA-4 et/ou du PD-1.

#### 5.2.2 Déplétion des lymphocytes Treg

Les lymphocytes Treg favorisant le développement tumoral, de nombreuses stratégies sont développées pour inhiber leur génération et/ou leur fonction. Les principales données mentionnées dans ce paragraphe sont détaillées dans les revues et les articles suivants [167-172].

<u>Neutralisation du CD25.</u> Les lymphocytes Treg expriment le récepteur à l'IL-2 (CD25). Dans des modèles animaux, l'administration d'un anticorps monoclonal neutralisant CD25, avant l'inoculation de la tumeur, entraîne l'éradication de celle-ci. Chez l'homme, la déplétion des lymphocytes Treg CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> in vitro du sang périphérique induit la génération de lymphocytes T effecteurs spécifiques d'antigènes tumoraux. Des essais cliniques avec un anticorps monoclonal bloquant CD25 ou la denileukin diftitox (DAB389IL-2, une immunotoxine conjuguée à l'IL-2) augmente les réponses anti-tumorales. D'autres études n'ont pas retrouvés cette augmentation et cela semble s'expliquer par le fait que les lymphocytes T effecteurs activés expriment le CD25 et que la production d'IL-2 est également nécessaire pour l'expansion des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques. Par conséquent, la déplétion du CD25 peut inhiber les lymphocytes T effecteurs, annulant l'effet bénéfique de la déplétion des lymphocytes Treg qui accentue la réponse anti-tumorale.

<u>Neutralisation par des immunosuppresseurs.</u> La cyclophosphamide réduit le nombre de lymphocytes Treg et leur fonction. De plus la cyclosporine A et le tacrolimus réduisent aussi les lymphocytes Treg en inhibant l'effet de l'IL-2. Les lymphocytes Treg sont aussi sensibles aux paclitaxel et l'imatinib qui suppriment l'expression du facteur de transcription FoxP3.

<u>Neutralisation du CCR4.</u> La neutralisation de récepteurs aux chimiokines est une autre voie possible pour la déplétion des lymphocytes Treg. CCR4 est exprimé préférentiellement par les lymphocytes Treg CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>-</sup> Foxp3<sup>élevé</sup> CD25<sup>élevé</sup> et certains lymphocytes Th17.

In vitro, la déplétion des lymphocytes Treg via le CCR4 et la vaccination par l'antigène tumoral NY-ESO-1 entraîne une activation efficace des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> effecteurs spécifiques de cet antigène dans le cancer du mélanome. Cette stratégie est efficace dans le cancer du mélanome, puisque les lymphocytes Treg CCR4<sup>+</sup> sont dominants parmi les lymphocytes Treg Foxp3<sup>+</sup> infiltrant la tumeur ou dans le sang périphérique. Ainsi, l'anticorps monoclonal neutralisant CCR4 est actuellement étudié dans des essais cliniques dans le cancer du mélanome.

<u>Neutralisation du VEGF.</u> Le VEGF est un facteur important dans la croissance tumorale. Son récepteur est exprimé par les lymphocytes Treg. Un anticorps neutralisant le VEGF, le bevacizumab, inhibe l'expansion des lymphocytes Treg, suggérant un rôle du VEGF dans l'induction des lymphocytes Treg.

<u>Activation de OX40</u>. OX40 est une molécule de co-stimulation de la famille du TNF récepteur, constitutivement exprimée sur les lymphocytes Treg CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> et de façon transitoire sur les lymphocytes T activés. L'activation par un anticorps agoniste de OX40 inhibe les fonctions immunosuppressives des lymphocytes Treg et permet l'expansion des lymphocytes T effecteurs. De plus, des injections intra-tumorales de cet anticorps réduisent fortement la croissance tumorale.
<u>Activation de GITR.</u> GITR, de la famille du TNF récepteur, est une molécule de co-stimulation exprimée faiblement sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> effecteurs et fortement exprimée sur les lymphocytes Treg. Son activation par un anticorps agoniste de GITR ou par des ligands à GITR inhibe l'activité immunosuppressive des lymphocytes Treg et favorisent la réponse anti-tumorale des lymphocytes T effecteurs.

## B- Les macrophages – rôles dans le cancer

Les macrophages, localisés dans les tissus et dérivés de précurseurs myéloïdes, sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques. En effet, outre leur activité antimicrobienne, les macrophages sont impliqués dans le métabolisme, le maintien de l'homéostasie et la réparation tissulaire ; ils participent également à la régulation de la réponse immunitaire.

Une altération de l'homéostasie tissulaire est souvent associée à une modification du stock de macrophages dans le tissu altéré, de leur phénotype et leur fonction. Dans les tissus altérés, ces macrophages peuvent ainsi participer à la physiopathologie de la maladie.

Dans cette section seront abordées l'origine et les principales fonctions des macrophages ainsi que leur plasticité fonctionnelle. Nous aborderons ensuite les modifications fonctionnelles des macrophages associées au développement tumoral.

## 1- Origine des macrophages

#### 1.1 Les macrophages résidents

En situation non-inflammatoire, les macrophages présents dans les tissus sont appelés macrophages résidents, et sont localisés dans les endroits les plus susceptibles d'invasion microbienne ou d'accumulation de débris de toutes sortes.

Les macrophages résidents murins ont une origine embryonnaire et hématopoïétique. Le pool de macrophages tissulaires est établi à la naissance. Les mécanismes liés à la persistance de ces macrophages tout au long de la vie de l'animal restent encore mal connus. Il a cependant été démontré que les macrophages alvéolaires possèdent un potentiel d'auto-renouvellement [173]. Une étude récente a montré que seules la microglie et une partie des cellules de Langerhans (cellules dendritiques résidentes de la peau) aurait pour origine des cellules embryonnaires [174]. Le rôle de précurseurs myéloïdes adultes et/ou de l'environnement tissulaire sur la survie à long terme des macrophages sont des hypothèses évoquées, sans démonstration formelle.

Chez l'homme, les cellules souches hématopoïétiques constituent le principal réservoir de précurseurs des macrophages résidents aux stades embryonnaires et adultes. Il n'a en effet pas été démontré que les cellules souches embryonnaires puissent donner naissance aux macrophages [175]. La majorité des macrophages résidents sont différenciés avant la naissance et la survie des macrophages dans les tissus est assurée par des facteurs de croissance, tels que le « macrophage-colony stimulated factor » (M-CSF) ; il est intéressant de noter que ces médiateurs sont également impliqués dans la survie des précurseurs hématopoïétiques présents dans la moelle osseuse [176,177].

Les macrophages résidents portent différents noms en fonction du tissu dans lequel ils sont retrouvés :

- cellules de Kupffer dans le foie,
- ostéoclastes dans le tissu osseux,
- macrophages alvéolaires dans le poumon et
- microglie dans le cerveau.

Ces macrophages résidents présentent un phénotype et des fonctions spécifiques au tissu dans lequel ils sont localisés. A titre d'exemple, les ostéoclastes sont impliqués dans les processus de remodelage osseux, alors que les macrophages alvéolaires sont principalement impliqués dans la défense antimicrobienne [178].

## 1.2 Les macrophages nouvellement recrutés

Suite à une agression (lésion tissulaire ou infection), des monocytes circulants peuvent être nouvellement recrutés et se différencier localement en macrophages, au niveau du tissu lésé.

Les monocytes sont générés dans la moelle osseuse à partir d'un précurseur myéloïde commun aux granulocytes et aux monocytes. Les étapes de différenciation conduisant à la génération des monocytes dépendent du facteur de croissance M-CSF ; les monocytes matures quittent la moelle osseuse pour rejoindre la circulation sanguine.

Les monocytes représentent environ 10% des leucocytes du sang chez l'homme et 4% des leucocytes circulant chez la souris. Ils constituent une population de morphologie hétérogène et présentent une grande variabilité dans l'expression des antigènes de surface. Les monocytes circulent dans le sang durant 1 à 3 jours avant de migrer dans les tissus.

Plus généralement, les monocytes circulants dans le sang sont les précurseurs des macrophages et des DC [178,179]. Plusieurs facteurs de croissance et cytokines sont nécessaires au contrôle du développement et à l'homéostasie des macrophages et des DC. Les étapes de génération de macrophages à partir de progéniteurs de la moelle osseuse sont résumées dans la Figure 13.

Les molécules d'adhérence, exprimées localement par les cellules endothéliales, contrôlent la migration transendothéliale, du compartiment sanguin vers l'interstitium et les épithéliums. De manière générale, les signaux responsables de l'acquisition des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles, spécifiques de chaque type de macrophages (retrouvés dans les différents tissus), sont fournies par les cellules de l'environnement (essentiellement des cytokines) et des constituants de la matrice extracellulaire. Ces macrophages recrutés ont une durée de vie longue au niveau du site inflammatoire, comparativement aux autres cellules immunitaires recrutées, et en particulier les neutrophiles.



Figure 13. Des monocytes aux cellules différenciées dans les tissus.

Les cellules souches hématopoïétiques peuvent se différencier en précurseurs lymphoïdes ou myéloïdes. Sous l'action de différents médiateurs, dont le M-CSF, les précurseurs myéloïdes peuvent induire la génération des monocytes circulants. Lorsqu'ils sont recrutés dans un tissu, ces monocytes peuvent se différencier en cellules dendritiques ou en macrophages, en fonction de l'environnement local. LT : Lymphocyte T ; LB : Lymphocyte B ; NK : Cellule NK.

## 2- Principales fonctions des macrophages

Les macrophages, disséminés dans l'ensemble des tissus de l'organisme, forment une population hétérogène. Ils se distinguent des monocytes par une plus grande taille et le développement considérable de l'appareil vacuolaire (vésicules d'endocytose, endosomes, lysosomes, phagosomes, phagolysosomes). Les propriétés fondamentales des macrophages sont leur mobilité, leur pouvoir de phagocytose associée à la présentation antigénique et leur capacité sécrétoire [178]. Cette capacité sécrétoire est multiple : facteurs du complément, cytokines, facteurs hématopoïétiques, prostaglandines, radicaux libres. Les macrophages jouent un rôle important dans la défense de l'hôte contre les microorganismes, le maintien de l'homéostasie tissulaire (via la clairance des cellules sénescentes), dans le métabolisme du glucose, des lipides, d'amino-acide et du fer, ainsi que dans le remodelage et la réparation de tissus lésés [180]. Dans ce chapitre, nous n'aborderons que les fonctions antimicrobiennes et le rôle dans le maintien de l'homéostasie tissulaire.

## 2.1 Les propriétés antimicrobiennes des macrophages

Les macrophages reconnaissent les pathogènes via des PRR, qui interagissent avec des structures microbiennes conservées, telles que des composants des parois ou des acides nucléiques. Les macrophages peuvent également reconnaître les microbes opsonisés par les anticorps ou via les protéines du complément.

Cette reconnaissance entraîne l'activation des fonctions effectrices, comme la phagocytose et la production de cytokines, de chimiokines et d'autres médiateurs nécessaires à la destruction du microbe et à la coordination de la réponse inflammatoire.

La phagocytose est le résultat de l'internalisation puis de la destruction des microorganismes ingérés, ce qui, par la suite, entraîne une présentation antigénique et le développement de la réponse adaptative. En effet, suite à l'engloutissement, les microorganismes sont séquestrés dans une vacuole appelée phagosome primaire. Le phagosome subit alors une série de maturations en lien avec le trans-golgi (phagosome primaire  $\rightarrow$  phagosome tardif  $\rightarrow$  phagolysosome) afin d'acidifier son contenu et d'acquérir des propriétés microbicides. Le phagolysosome, d'un pH acide (4,5) via la V-APTase (Vacuolar-type H+ -ATPase : translocation d'ions H<sup>+</sup>), crée un environnement hostile qui arrête la croissance du microbe [181,182]. Cela n'agit pas seulement sur le métabolisme du microbe mais aussi sur le processus de lyse. La maturation du phagolysosome entraîne la production de NO, d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de ROS, dépendant de la NADPH oxydase ou encore de peptides et protéines antimicrobiens (Défensines, Lactoférrine, Protéases, Phospholipase A2, NRAMP1). L'action combinée de ces éléments permettent la perméabilisation de l'enveloppe du microbe, l'oxydation notamment de l'ADN, processus qui aboutissent à la dégradation du microbe. Suite à la dégradation, le contenu du lysosome, appelé autophago-lysosome, peut sortir de la vacuole afin que les antigènes microbiens soient présentés par le CMH.

En plus de la phagocytose, l'interaction récepteurs/microbes sur les macrophages permet le déclenchement des fonctions effectrices adaptées. En effet, les macrophages sécrètent des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ , IL-12) et des chimiokines permettant le recrutement d'autres cellules effectrices et la mise en place de la réponse adaptative.

Malgré la présence des facteurs antimicrobiens, des pathogènes notamment des bactéries (*Mycobacterium tuberculosis, Legionnella pneumophilia, Listeria monocytogenes, Coxiella burnetii*) peuvent échapper à la phagocytose ou à la dégradation. En effet, elles peuvent inhiber son internalisation dans le phagocyte via l'inhibition des récepteurs d'épuration, ou en dégradant les Ac opsonisants ou les fractions du complément. D'autres pathogènes résistent à la dégradation en empêchant l'accumulation des éléments permettant l'acidification, en dégradant les peptides antimicrobiens ou en exprimant des enzymes comme la catalase qui réduit l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [183].

De cette première étape dépend également la coordination des réponses immunitaires innées et adaptatives qui doit aboutir à l'élimination du microbe tout en limitant la réponse inflammatoire et les dommages tissulaires associés (homéostasie tissulaire).

## 2.2 Macrophages et homéostasie tissulaire

La mort cellulaire par apoptose participe au renouvellement tissulaire. Les cellules mortes doivent être rapidement éliminées par les phagocytes pour éviter la mise en place d'une inflammation locale. En effet, les cellules mourantes (en apoptose tardive ou nécrose) peuvent libérer des molécules de danger (telles que HSP, ATP, HMGB1) qui sont de puissants activateurs des cellules immunitaires. Ainsi, une élimination immunologiquement silencieuse des cellules mortes au stade d'apoptose précoce participe au maintien de l'homéostasie tissulaire. Les macrophages participent activement au processus d'élimination des cellules mortes. Ainsi, les cellules en apoptose libèrent des molécules impliquées dans la migration des macrophages (« find-me molecules ») à l'endroit où est localisée la cellule morte. De plus, la reconnaissance et l'ingestion des cellules mortes impliquent des molécules localisées à la surface des cellules mortes (majoritairement des

molécules intracellulaires) qui sont reconnues par des récepteurs d'endocytose exprimés par les phagocytes, tels que des CLR et des SR.

Au contraire des PAMPs qui activent les cellules immunitaires en recrutant des PRR de signalisation, les cellules en apoptose précoce déclenchent un programme anti-inflammatoire (production d'IL-10 et de TGF $\beta$ ; absence de production de cytokines pro-inflammatoires en réponse à un agoniste des TLR) [184-186]. Cette réponse anti-inflammatoire est induite par le contact macrophage-cellule apoptotique et est amplifié par leur internalisation.

Le processus de cicatrisation/réparation tissulaire qui suit une agression (d'origine endogène ou exogène) nécessite la mise en place d'une réponse anti-inflammatoire [187]. Le retour à une situation physiologique normale (homéostasie) suit la phase de résolution de l'inflammation [188,189]. Les macrophages ont un rôle très important dans la réparation tissulaire et dans la restauration de l'intégrité des tissus. Le microenvironnement tissulaire fournit les signaux nécessaires au recrutement et à la différenciation des monocytes. Les macrophages de type M2 (anti-inflammatoires et producteurs d'IL-10) sont impliqués dans la réparation tissulaire en produisant des protéines réparatrices de la matrice et des facteurs angiogéniques.

## 3- Plasticité des macrophages

Le terme macrophages désigne en fait une population hétérogène de différents sous-types cellulaires ayant des fonctions différentes et parfois opposées. Les macrophages représentent donc un large panel de cellules qui, selon le tissu ou la nature des signaux extracellulaires qu'ils reçoivent, peuvent se polariser en macrophages spécialisés dans la régulation de la réponse immunitaire, la réparation tissulaire ou encore l'inflammation [190]. La plasticité et l'hétérogénéité fonctionnelle, caractéristiques qui n'ont été que récemment attribuées aux macrophages, représentent un des principaux atouts des macrophages pour s'adapter à la situation physio(patho)logique qu'ils rencontrent dans les tissus [178,191]. Reflétant la nomenclature Th1/Th2, la polarisation des macrophages a été initialement subdivisée en deux sous-types, les macrophages M1 et les macrophages M2, décrits par Mantovani *et al* [192].

La polarisation fonctionnelle a été principalement rapportée comme induite via des facteurs présents dans l'environnement ainsi que des facteurs de survie, nécessaires pour la différenciation (qui seront décrits dans le paragraphe suivant). Ces changements dynamiques, phénotypiques et fonctionnels, peuvent être retrouvés dans des contextes pathologiques [193]. Il est important de noter que les stades d'activation des macrophages M1 et M2 apparaissent comme les extrémités d'un continuum, avec un profil hétérogène d'expression de récepteurs, de cytokines, de chimiokines et de fonctions dont les profils M1 et M2 seraient les deux extrémités [193].

Une autre classification a été décrite, qui ne reflète pas le continuum des sous-types de macrophages. Elle est basée sur trois activités homéostatiques différentes : les macrophages classiquement activés (impliqués dans la défense de l'hôte et l'immunité anti-tumorale), les macrophages impliqués dans la réparation tissulaire et les macrophages régulateurs (immunorégulation et résolution de l'inflammation). Dans le chapitre suivant seront présentés les macrophages M1 et M2 selon la classification établie par le Pr Mantovani puisque mes travaux portent sur l'une des sous-populations appartenant à cette classification. La majorité des données présentées vont concerner les macrophages humains. Il existe des différences majeures concernant la génération et le phénotype des macrophages humains et murins. Alors que chez l'homme, deux facteurs, le GM-CSF et le M-CSF induisent, respectivement, des macrophages M1 et M2, chez la souris, les macrophages sont induits in vitro par le M-CSF alors que le GM-CSF induit la différenciation des précurseurs myéloïdes en cellules dendritiques. Ainsi, les macrophages M1 et M2 murins sont induits in vitro par le M-CSF, respectivement associé à de l'IFNγ et à de l'IL-4 ou de l'IL-13. De plus, le phénotype des macrophages humains et murins diffère. A titre d'exemple, les macrophages murins de type M2 induits par la présence d'IL-4 ou d'IL-13 sont caractérisés par l'expression de l'arginase 1 (facteur utilisé pour discriminer les macrophages M1 et M2 murins) alors que les macrophages M2 humains ne l'expriment pas. Il est donc difficile de transposer les résultats obtenus chez l'homme dans des modèles murins.

#### 3.1 Facteurs de survie et de différenciation des monocytes en macrophages

Chez l'homme, la survie des monocytes et leur différenciation en macrophages est dépendante de trois facteurs : le GM-CSF, le M-CSF et l'IL-34.

Le récepteur du GM-CSF est le CD116. Le M-CSF et l'IL-34 possèdent un récepteur commun, le CD115 (encore appelé récepteur au M-CSF ou M-CSF-R, ou c-fms).

Le M-CSF est produit de façon ubiquitaire alors que l'expression du GM-CSF, faible à l'état physiologique, est augmentée lors de réactions inflammatoires [194]. L'IL-34 est principalement produite au niveau de la peau et du cerveau et son expression est augmentée lors de processus inflammatoires [195,196].

La présence d'autres cytokines peut moduler les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des macrophages ; ce point sera développé dans les paragraphes suivants.

Dans le paragraphe suivant, je me focalise sur les propriétés de l'IL-34, cytokine sur laquelle repose l'essentiel de mes travaux de thèse. Puisque l'IL-34 et le M-CSF partagent le même récepteur, de nombreuses études ont comparé le M-CSF et l'IL-34 afin d'analyser leurs similarités et/ou leurs différences.

L'interleukine 34 est une cytokine découverte en 2008 par l'équipe de Lin *et al*. Elle a été identifiée à la suite d'un criblage fonctionnel pour identifier des médiateurs solubles capables d'induire la survie des monocytes humains et de promouvoir, avec la même efficacité que le M-CSF, la formation de CFU-M (colony-forming unit-macrophage), progéniteurs de macrophages, dans une culture de moelle osseuse humaine. La forme murine de l'IL-34 induit la survie de macrophages péritonéaux murins et le développement des progéniteurs macrophagiques [197]. De plus, par le criblage des domaines extracellulaires de protéines transmembranaires, le M-CSF-R a été identifié comme récepteur à l'IL-34 [198].

L'IL-34 est une glycoprotéine dimérique, qui ne présente aucune homologie au niveau de la séquence d'ADN avec le M-CSF, bien que la structure secondaire suggère l'existence de quatre hélices alpha, également présentes dans le M-CSF [199-201]. L'ARNm codant l'IL-34 est exprimé dans de nombreux tissus, et plus abondamment dans la rate, le cerveau et la peau [198].

L'expression spatiotemporelle des ARNm codant l'IL-34 et le M-CSF diffère, ce qui suggère qu'ils ont des rôles complémentaires sur les cellules exprimant le M-CSF-R [202]. En combinaison avec le récepteur activateur du ligand de NF-KB (RANK-L), l'IL-34 peut remplacer le M-CSF pour la différenciation des

ostéoclastes humains et murins [203]. In vivo, l'administration d'IL-34 réduit la masse osseuse, et son expression permet de récupérer les déficiences d'ostéopétrose dans un modèle de souris déficientes en M-CSF (M-CSF<sup>-/-</sup>) [202,204].

Deux études récentes ont décrit que l'IL-34 est exprimée constitutivement dans les neurones et les kératinocytes et son absence réduit la population des cellules de Langerhans (LC) et de la microglie [195,196]. L'IL-34 est responsable du développement embryonnaire des LC et de leur homéostasie. Cependant, lors de l'inflammation, la repopulation des LC peut également être induite via le M-CSF, observation qui confirme leurs rôles complémentaires [195,196]. Dans les souris déficientes en IL-34 (IL-34<sup>-/-</sup>), les LC sont normalement présentes dans des tissus inflammatoires de la peau mais ces LC ne sont pas maintenus après la résolution de l'inflammation. Ces résultats indiquent que l'IL-34 ne contrôle pas le recrutement des monocytes circulants ainsi que la différenciation en LC mais aurait plutôt un rôle dans l'homéostasie des LC.

Comparativement aux LC, la microglie se développe indépendamment de l'IL-34. Néanmoins, l'IL-34 contribue à maintenir la microglie dans des régions spécifiques du cerveau adulte [195,196]. Elle est surexprimée principalement dans le cortex, le noyau olfactif et dans l'hippocampe et sous-exprimée dans le tronc cérébral et dans le cervelet. Dans les souris IL-34<sup>-/-</sup>, une réduction de 40 à 60% du nombre des cellules microgliales est observé dans le cortex, le noyau olfactif et l'hippocampe [195].

Finalement, il a cependant été suggéré que l'IL-34 et le M-CSF pourraient présenter des propriétés différentes [198]. En réponse à l'IL-34 et au M-CSF, les monocytes humains diffèrent dans leur capacité à produire les chimiokines MCP-1 et éotaxine-2 [197]. L'IL-34 et le M-CSF diffèrent aussi dans leurs capacités à induire la migration de la lignée cellulaire murine J774A.1, alors que leur capacité à promouvoir la survie ou la croissance est identique [197]. De plus, l'IL-34 et le M-CSF semblent interagir avec des régions différentes sur le récepteur CD115, ce qui pourrait expliquer ces différences [197,205].

## 3.2 Les macrophages M1 : profil IL-12<sup>+</sup>/IL-10<sup>-</sup>

#### 3.2.1 Génération des macrophages M1

Chez l'homme, les macrophages M1 sont générés in vitro en présence de GM-CSF et d'IFNγ, associés ou non à un composant microbien (agoniste des PRR), tel que le LPS, ou à des cytokines, comme le TNFα [206]. Le GM-CSF seul induit également des macrophages dits M0 qui présentent, néanmoins, un potentiel pro-inflammatoire réduit comparativement aux macrophages M1 induits par GM-CSF plus IFNγ. L'IFNγ active de manière classique les macrophages qui produisent de l'IL-12, signal essentiel pour le développement d'une réponse Th1. En retour, ces lymphocytes Th1 produisent des niveaux plus élevés d'IFNγ, maintenant ainsi une activation/génération de macrophages M1 correspondent à une activation durant une réponse immunitaire à médiation cellulaire. En revanche, in vitro, le GM-CSF et l'IL-4 (ajoutées dès le début de la culture cellulaire) induisent la différenciation des monocytes humains en cellules dendritiques.

#### 3.2.2 Principales propriétés des macrophages M1

Les macrophages M1 produisent en grande quantité de l'IL-12 et peu d'IL-10 (IL-12<sup>élevé</sup>/IL-10<sup>faible</sup>), sécrètent des cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-1 et l'IL-6, des intermédiaires toxiques de l'azote (comme le monoxyde d'azote) et de l'oxygène, et présentent une forte activité microbicide et tumoricide [178]. Les macrophages M1 expriment de grandes quantités de molécules du CMH-II à l'origine de leur forte capacité de présentation antigénique [2,207]. Ils produisent également des chimiokines impliquées dans le

recrutement des lymphocytes Th1. Les chimiokines produites par les macrophages M1 sont essentiellement de type CC (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL8, CCL19, CCL20) mais l'IFN $\gamma$  augmente également la production de CXCL10 et de CXCL13. Globalement, ces chimiokines participent à la mise en place d'une réponse de type 1 [193], entraînant une protection contre les pathogènes intracellulaires (mycobactéries, virus) et favorisant la résistance contre les tumeurs [207].

Il est important de noter que ces macrophages pro-inflammatoires peuvent détruire in vitro les cellules tumorales via la sécrétion de NO (synthétisé grâce à l'enzyme iNOS) [208] ou la production des molécules cytotoxiques TRAIL ou FasL, ou encore par le mécanisme d'ADCC (« Antibody-dependent Cellular Cytotoxicity ») [209]. Ces cellules sont également capables d'activer les CTL [62].

Cependant, l'activation des macrophages M1 est également impliquée dans les dommages tissulaires par la production d'espèces radicalaires dérivées de l'oxygène ainsi que dans les syndromes métaboliques comme le diabète. Les caractéristiques phénotypiques des macrophages M1 sont présentées dans la Figure 14.

## 3.3 Les macrophages M2 : profil $IL-10^+/IL-12^-$

Les macrophages M2 sont caractérisés par la production d'IL-10 et l'absence de production d'IL-12 après activation ; cette dichotomie IL-12<sup>faible</sup>/IL-10<sup>élevé</sup> constitue la signature de leurs propriétés immunorégulatrices [193,194,210,211]. En effet, l'IL-10 est un facteur majeur d'inhibition de la production et de l'activité des cytokines pro-inflammatoires et inhibe l'expression du CMH-II par les macrophages ainsi que la production de NO et de TNF $\alpha$  [212].

#### 3.3.1 Génération des macrophages M2

Il existe différents types de polarisation des macrophages M2 humains et murins, initialement décrits comme régulateurs de la polarisation des cellules M1. Alberto Mantovani a proposé en 2004 une nomenclature permettant de nuancer et de préciser les différents profils d'activation des macrophages M2 en fonction des signaux inducteurs. Cette classification distingue les macrophages M2a, M2b et M2c [193]. Au laboratoire, une dernière sous-population M2d, semblable aux TAM, a été caractérisée par Duluc *et al* [213]. Les macrophages M2a, M2b et M2c sont générés par stimulation in vitro de macrophages établis (monocytes cultivés en présence de GM-CSF) et en présence, respectivement d'IL-4, d'IL-1 ou d'IL-10. La polarisation en macrophages M2d est obtenue par culture in vitro en présence de M-CSF seul.

#### 3.3.2 Les macrophages M2a

L'activation alternative est définie comme la génération des macrophages M2a en réponse aux interleukines IL-4 et IL-13 [178,193]. Ces cytokines peuvent être produites, entres autres, par les cellules de l'immunité innée (éosinophiles, basophiles, mastocytes, cellules NK) et les lymphocytes Th2. Les macrophages M2a produisent les chimiokines CCL17, CCL22 (recrutement des lymphocytes Th2 et des lymphocytes T régulateurs) ou encore CCL18 (recrutement des lymphocytes T naïfs) [191]. Ces chimiokines permettent le développement d'une différenciation en lymphocytes Th2 qui va entraîner (comme pour les macrophages M2a. De plus, les cytokines IL-4/IL-13 et les motifs microbiens peuvent agir en synergie pour induire la sécrétion d'IL-10 par les macrophages M2a sont impliqués dans les processus de réparation tissulaire. La présence de macrophages présentant un phénotype proche des macrophages M2a générés in vitro a été mise en évidence dans de nombreux modèles d'infections par des helminthes et est corrélée à leur élimination.

L'activation alternative est également impliquée dans les phénomènes d'allergie [192].

## 3.3.3 Les macrophages M2b

La génération des macrophages M2b nécessite, en plus du GM-CSF, deux signaux :

- le premier signal peut être fourni par différentes molécules, telles que la fixation de complexes immuns, de corps apoptotiques, de prostaglandines [192], ou de l'IL-1 et
- le second signal, comme pour l'activation classique, dépend de la reconnaissance de ligands des TLRs.

Les macrophages M2b sont impliqués dans la protection contre la toxicité aux LPS ainsi que dans l'activation des lymphocytes Th2.

#### 3.3.4 Les macrophages M2c

Les macrophages M2c sont essentiellement producteurs d'IL-10, de TGF $\beta$ , et de PGE2 et expriment peu de molécules du CMH-II ou de molécules de co-stimulation. Ils sont aussi appelés macrophages de désactivation de la réponse des lymphocytes Th1 car ce phénotype est similaire à celui des macrophages impliqués dans la résolution de l'inflammation. L'induction de ces macrophages peut-être également associée à un environnement riche en cellules apoptotiques, puisqu'ils sont impliqués dans leur élimination [193].

## 3.3.5 Les macrophages M2d

Les macrophages M2d ont été caractérisés dans les ascites de cancer de l'ovaire [213]. Ils présentent des caractéristiques similaires aux autres classes de macrophages M2 mais sont générés en présence de M-CSF seul. De plus, l'IL-6 et le LIF (leukocyte inhibitory factor), présents en grande quantité au niveau de la tumeur, potentialisent ce processus de génération en augmentant la consommation du M-CSF [213]. Les fonctions de ces macrophages, qui sont détaillées plus précisément dans le paragraphe suivant, sont de favoriser la croissance tumorale et l'angiogénèse (via la production de VEGF et PDGF) ainsi que la formation de métastases (via la production de la métalloprotéase matricielle [MMP] 9 et de CCL2). De plus, les macrophages M2d ont des propriétés immunorégulatrices importantes et présentent de faibles capacités de présentation antigénique. Ils inhibent l'activité des lymphocytes Th1 et favorisent le recrutement des lymphocytes T régulateurs et les lymphocytes Th2 par la sécrétion, respectivement, de CCL17 et de CCL22 [213].

En résumé, les panels de chimiokines et de cytokines ainsi que les récepteurs exprimés diffèrent entre ces deux extrêmes que sont les macrophages M1 et M2. De plus, les différents sous-types des macrophages M2 présentent des expressions de récepteurs membranaires et des fonctions spécifiques qui deviennent alors des marqueurs permettant de les différencier. Ces données sont résumées dans la Figure 14.



Figure 14. Les différentes sous-populations des macrophages humains.

Les M $\phi$  stimulés par le GM-CSF et l'IFN $\gamma$  sont de type M1 ; ces macrophages favorisent l'élimination tumorale. Les macrophages M2 sont générés par l'IL-4 ou l'IL-13 (M2a), les motifs microbiens ou par l'IL-1 $\beta$  (M2b), par l'IL-10 ou le TGF $\beta$  (M2c) et par le M-CSF (M2d). Chaque sous-population est caractérisée par la production de cytokines, de chimiokines et par l'expression d'enzymes, de PRR, de marqueurs de surface, du CMH ou des molécules de co-stimulation.

## 4- Les macrophages en situation pathologique

Outres les déficits immunitaires héréditaires liés aux macrophages (anomalie de la phagocytose en particulier) qui s'accompagnent d'infections tissulaires récidivantes par des bactéries pyogènes (abcès) et par des champignons (aspergillose), les fonctions des macrophages sont modifiées/altérées dans différents contextes pathologiques. Les macrophages M1 ou M2 peuvent être associés à de nombreuses maladies (M1 : diabètes, athérosclérose, allergie, polyarthrite rhumatoïde, stéatose ; M2 : cancer, fibrose, asthme, infection bactérienne ou virale). Dans ce chapitre, nous nous focaliserons sur les macrophages M2 dans deux situations : la fibrose et le cancer.

## 4.1 Macrophages et fibrose

Comme décrit dans le paragraphe précédent, les macrophages jouent un rôle essentiel dans les processus de réparation tissulaire. Cependant, dans certaines situations, comme par exemple des agressions répétées (maladies inflammatoires et/ou infections chroniques), le processus de réparation tissulaire peut être altéré et conduire au remplacement progressif du tissu sain par un tissu fibrotique [214-216]. Ce processus pathologique, appelé fibrose, altère définitivement les fonctions de l'organe touché.

D'un point de vue physio(patho)logique, le processus fibrotique est caractérisé par une accumulation de composants de la matrice extracellulaire (essentiellement du collagène) produits par des fibroblastes ou par des myofibroblastes activés ; ces derniers sont générés par trans-différenciation de certaines cellules (cellules épithéliales, cellules stellaires) [217,218]. La fibrose s'accompagne également d'une réponse inflammatoire caractérisée par un infiltrat massif de cellules de l'immunité innée, et en particulier de monocytes qui se différencient localement en macrophages. Les macrophages associés à la fibrose présentent un profil de type M2 caractérisé, entre-autre, par la production de facteurs de croissance (PDGF) et de médiateurs pro-fibrosant (TGF $\beta$ , IL-13) associés à l'activation et la production de collagène par les fibroblastes et les myofibroblastes [219,220].

Au laboratoire, nous avons récemment montré que les patients, atteints d'une hépatite C, expriment du M-CSF et de l'IL-34 au niveau hépatique. En effet, les hépatocytes infectés par le VHC produisent du M-CSF et de l'IL-34 qui différencient les monocytes infiltrant en macrophages de type M2 qui s'accumulent dans le foie en produisant parallèlement des chimiokines qui attirent de nouveaux monocytes et qui retiennent les macrophages différenciés sur le lieu de l'infection. De plus, ils expriment de manière plus importante des facteurs pro-fibrotiques tels que le TGFβ1, le PDGF et la galectine-3, ainsi que des MMP associées à la dégradation de la matrice extracellulaire et l'activation du TGFβ. Dans un modèle de co-culture de macrophages de type M2 différenciés en présence de M-CSF ou d'IL-34 avec une lignée stellaire humaine, nous avons montré que la présence des macrophages induisait la production de collagène de type I responsable de la fibrose hépatique par la lignée stellaire humaine.

De nombreuses études ont insisté sur le rôle de l'IL-13 sur les macrophages dans la fibrose hépatique. L'IL-13 seule n'active pas les cellulaires stellaires et ne modifie pas l'expression des gènes pro-fibrosants des macrophages de type M-CSF ou IL-34 malgré l'expression importante du collagène de type I. Nous avons alors montré que l'IL-13 agit sur les macrophages pro-fibrosants M-CSF et IL-34 en modulant la balance protéase/antiprotéase. Effectivement l'expression de la métalloprotéase responsable de la dégradation du collagène de type I est diminuée en présence d'IL-13 dans les macrophages de type M-CSF et IL-34. La diminution de l'expression de la MMP-1 est donc responsable de l'augmentation de la quantité de collagène de type I observée [221].

## 4.2 Les macrophages associés aux tumeurs

Les macrophages associés aux tumeurs seront désignés sous l'acronyme TAM pour Tumor-Associated Macrophages. A un stade précoce du développement tumoral, les TAM peuvent être polarisés en macrophages M1 et/ou M2. Au cours du développement tumoral, et plus particulièrement aux stades avancés du cancer, les TAM présentent majoritairement un profil M2 pro-tumoral [192]. Dans la tumeur, au stade précoce, les TAM sont dispersés dans la masse tumorale [246]. Les TAM sont ensuite retrouvés aussi bien retrouvés dans les

régions à faible pression en oxygène que dans les régions vascularisées, comme les régions périvasculaires ou invasives où ils potentialisent la croissance tumorale.

Mon propos sera donc focalisé sur les facteurs de recrutement et de polarisation et les fonctions protumorales des TAM ainsi que les immunothérapies anti-tumorales ciblant les TAM.

#### 4.2.1 Recrutement et polarisation des TAMs

Les monocytes, recrutés au niveau du site tumoral, peuvent se différencier en TAM ou en DC immatures. Cependant, dans la majorité des tumeurs solides, les TAM représentent le type de cellules immunitaires le plus abondant dans le microenvironnement tumoral. Ainsi, les facteurs induisant une accumulation de TAM sont des molécules (a) recrutant les monocytes et induisant leur différenciation en TAM et des facteurs environnementaux (b, c) favorisant leur développement.

#### a) Les facteurs solubles

Une étude a montré que des exosomes libérés par des cellules tumorales de mélanome ou de cancer du colon induisent la différenciation des monocytes en macrophages de type M2 exprimant CD14, peu de molécules du CMH-II et produisant du TGF $\beta$  et de l'IL-10 ; ces cellules diminuent la prolifération lymphocytaire T [222-224]. De plus, ces particules bloquent la différenciation des monocytes en DC [222-224]. Une autre étude a montré que la culture de monocytes en présence de cellules tumorales ovariennes induit la différenciation en macrophages ayant un phénotype proche de celui des TAM [225].

Ces données montrent que des facteurs produits par la tumeur peuvent être à l'origine du recrutement et de la génération des TAM dont les principaux sont décrits ci-dessous.

Tout d'abord, le M-CSF est impliqué dans le recrutement des monocytes. Au laboratoire, nous avons montré que le M-CSF favorise leur différenciation en macrophages de type M2d [210,213] et, en association avec l'IL-6, bloque leur différenciation en DC [226,227]. De taux élevés de M-CSF sont corrélés à un mauvais pronostic dans de nombreux cancers (tels que le cancer de l'ovaire et du sein) [228-231].

De plus, la chimiokine CCL2 (ou MCP-1) est le principal médiateur impliqué dans le recrutement des monocytes dans la tumeur. CCL2 est retrouvée dans de nombreux cancers et est produite par les cellules tumorales (pancréas, cerveau, peau, ovaire, sein, poumon) [232-234]. De plus, les TAM peuvent eux-mêmes produire la chimiokine CCL2, induisant ainsi une boucle d'amplification conduisant à leur accumulation [234]. D'autres chimiokines, telles que CCL7 et CCL8, qui, tout comme CCL2, interagissent avec CCR2, participent au recrutement des monocytes [234,235]. CCL5, exprimée dans le cancer du sein [236], est également impliquée dans le recrutement des monocytes [235].

Finalement, le VEGF, le PDGF et le TGF $\beta$  participent également au recrutement des monocytes ainsi qu'à la survie des TAM au sein de la tumeur [237-239].

#### b) Influence du métabolisme tumoral

Les cellules tumorales ont un métabolisme particulier appelé effet « Warburg » ou glycolyse oxydative qui s'explique par une consommation importante du glucose et de la glutamine en présence ou non d'oxygène avec production d'acide lactique. L'effet Warburg est également associé à la prolifération des cellules souches pluripotentes, au développement embryonnaire ou à la réparation tissulaire, mais, qui, dans le cancer, favorise le développement rapide des cellules tumorales. Dans la tumeur, il existe des facteurs participant à cet effet, dont l'acide lactique et l'hypoxie qui sont décrits ci-dessous.

- L'acide lactique semble important dans le développement des TAM dans des modèles murins. Il est produit par les cellules tumorales et induit la génération de macrophages M2 via l'activation du facteur de transcription HIF-1 [240].

- De nombreuses études ont montré que l'environnement tumoral est plutôt de type hypoxique, condition qui favorise l'acquisition d'un phénotype de type M2 par les macrophages. En condition hypoxique, de nombreux gènes sont induits dans les TAM grâce à l'activation des facteurs de transcription HIF-1 et HIF-2 [241]. Les TAM sécrètent alors VEGF [242], MMP9 [243], PGE2 (via l'augmentation de l'expression de COX-2 [244], PDGF [244] et TNF $\alpha$  [245,246].

#### c) L'inflammation

Le lien entre développement tumoral et contexte inflammatoire a été largement rapporté dans la littérature. Alors que l'inflammation est classiquement associée à une réponse de type Th1, et donc plutôt anti-tumorale, l'inflammation associée à la tumeur, définie comme étant chronique et à bas bruit (« smoldering inflammation »), est délétère et favorise la prolifération et le développement des cellules tumorales et l'accumulation, entre autres, de TAM pro-tumoraux [247,248].

Dans certains types de cancers, une mutation oncogénique (comme les oncogènes Ras et Myc) peut être responsable de la mise en place d'un microenvironnement inflammatoire qui promeut le développement de tumeurs. Quelle que soit son origine, l'inflammation à bas bruit permet aux différentes étapes du processus tumoral (angiogénèse, métastase, recrutement des cellules immunitaires) de se mettre en place et de s'articuler.

#### 4.2.2 Rôle pro-tumoral des TAM

Les TAM, retrouvés en périphérie ou au sein de la tumeur, produisent de nombreuses molécules favorisant (Figure 15) :

- a) l'immunosuppression,
- b) l'angiogénèse,
- c) la formation de métastases et
- d) la croissance tumorale.



Figure 15. Fonctions pro-tumorales des TAM et les principaux médiateurs associés.

Les TAM promeuvent la survie et la croissance des cellules tumorales en produisant plusieurs catégories de molécules (facteurs de croissance, cytokines, enzymes, radicaux oxygénés). TAM : « tumor-associated macrophages ».

#### a) Rôle immunosuppresseur

Les TAM ne produisent pas ou peu d'IL-12 après activation mais produisent des taux élevés d'IL-10 [97] et de TGF $\beta$  [98] qui favorisent la génération de lymphocytes Treg et préviennent l'activation des lymphocytes Th1. Les lymphocytes Treg inhibent les réponses lymphocytaires T, en particulier l'activation des CTL. Dans le cancer de l'ovaire, un grand nombre de lymphocytes Treg prédit une durée de vie réduite des patients [85].

De plus, ces macrophages ne présentent pas les antigènes aux lymphocytes T de façon optimale et inhibent leur activation [213]. Par exemple, l'expression de B7-H4 par les TAM leur permet d'inhiber les capacités cytotoxiques des CTL [249]. Les lymphocytes Treg, via la production d'IL-10, induisent l'expression de B7-H4 sur les TAM [250,251].

De plus, les TAM produisent différentes chimiokines qui recrutent (i) les lymphocytes Treg, telles que CCL17 ou CCL22 [85] (ii) les lymphocytes Th2 (CCL17 et CCL22) [85] et (iii) les lymphocytes T naïfs (CCL18) [252]. Le recrutement de lymphocytes T naïfs dans un environnement suppresseur est favorable à l'induction d'une anergie [252].

## b) L'angiogénèse

La vascularisation de la tumeur est nécessaire à son développement. Ce phénomène est dépendant, entre autres, de facteurs angiogéniques, tels que FGF et VEGF, des médiateurs pro-inflammatoires (tels que angiopoïétines, IL-1, IL-8 et TNF $\alpha$ ) et des protéases (MMP2, MMP9) [253,254]. Ces facteurs permettent la prolifération et la migration des cellules endothéliales, le remodelage de la matrice extracellulaire et la formation des vaisseaux [253,254]. Les TAM expriment certains de ces facteurs et ont donc un rôle primordial dans la vascularisation tumorale [255].

Les TAM produisent de grandes quantités de VEGF [255,256], en réponse à l'hypoxie [244] ou en réponse à une stimulation par le M-CSF [257], induisant par là même une amplification de la vascularisation [237,258]. De plus, les TAM produisent du TNF $\alpha$  qui induit lui-même l'expression de la thymidine phosphorylase par les cellules tumorales et les TAM [259,260]. Un taux important de thymidine phosphorylase est corrélé à un mauvais pronostic dans le cancer du sein [261]. Le TNF $\alpha$  induit également la sécrétion de MMP9 qui permet la libération du VEGF de la matrice extracellulaire [154].

#### c) La formation de métastases

Les TAM produisent des métalloprotéases, en particulier MMP9, et de l'urokinase-type plasminogen activator, qui favorisent le processus métastatique en permettant le remodelage de la matrice extracellulaire et donc la migration des cellules tumorales [262,263]. De plus, dans des modèles murins de métastases du poumon, les cellules tumorales produisent du versican, un protéoglycane capable de stimuler les macrophages via TLR2, qui induit la production d'IL-6 et de TNF $\alpha$ , favorisant la formation de métastases [264].

## d) La croissance tumorale

Les TAM sécrètent de nombreux facteurs aidant à la croissance tumorale tels que FGF, EGF, PDGF et TGFβ [98,265,266].

#### 4.2.3 Immunothérapie anti-tumorale visant les TAM

La correction de l'altération (retour à l'homéostasie) s'associe à une normalisation des fonctions des macrophages; ce processus de normalisation repose sur la plasticité fonctionnelle des macrophages.

En effet, les TAM présentent différents stades d'activation (M1 et M2). Néanmoins, les TAM de type M2 sont plus abondants dans la tumeur et présentent un fort potentiel pro-tumoral. Dans un but thérapeutique, différentes stratégies ont été envisagées afin d'éliminer ou de les reprogrammer en macrophages immunostimulateurs. Les principales données mentionnées dans ce paragraphe sont détaillées dans les revues et les articles suivants [267-272] :

a) Prévenir la génération des TAM,

- **b)** Bloquer le recrutement des monocytes,
- c) Diminuer la survie des TAM,
- d) Reprogrammer les TAM en macrophages anti-tumoraux,
- e) Combiner le ciblage des TAM avec les thérapies classiques.

#### a) Prévenir la génération des TAM

-L'axe M-CSF-M-CSF-R, essentiel dans l'accumulation et la différenciation locale en macrophages M2, est une approche thérapeutique intéressante. Tout d'abord, la neutralisation de cet axe induit rapidement la diminution du nombre des TAM. Dans des modèles murins de glioblastome, l'inhibition du M-CSF-R induit une réduction importante du volume de la tumeur et une survie prolongée des souris ; cette approche n'induit pas la mort des TAM mais favorise leur polarisation en macrophages ayant des propriétés anti-tumorales (probablement acquises via le GM-CSF). Des souris présentant un M-CSF non fonctionnel (souche op/op), présentent une réduction de la progression tumorale et de la formation de métastases dans des modèles de cancer du sein et de tumeurs neuroendocrines.

De plus, l'inhibition du M-CSF-R semble améliorer l'efficacité des thérapies standards dans des modèles murins, comme la chimiothérapie dans le cancer du sein ou le cancer du pancréas, la radiothérapie dans le

cancer de la prostate ; elle augmente également les réponses aux thérapies anti-angiogéniques (Ac anti-VEGF). Ainsi, des études cliniques de phase I avec des inhibiteurs de l'axe M-CSF/M-CSF-R sont en cours, utilisant un anticorps monoclonal ciblant le M-CSF-R (RG7155) ; cet Ac induit une réduction de la fréquence de macrophages CD163<sup>+</sup> intratumoraux.

## b) Bloquer le recrutement des monocytes dans la tumeur

-L'une de ces stratégies consiste à bloquer le CCL2 ou son récepteur (CCR2) puisque cet axe a été impliqué non seulement dans le recrutement des monocytes dans plusieurs types de cancers mais également dans le trafic des monocytes de la moelle osseuse vers le sang. L'inhibition du CCL2 entraîne une diminution de la croissance tumorale et de la nécrose. Dans un modèle murin de cancer du pancréas, un anticorps antagoniste ciblant CCR2 (PF-04136309) bloque les monocytes dans la moelle osseuse, et permet donc une diminution des TAM dans la tumeur, de la croissance tumorale et des métastases. De plus, la neutralisation de CCL2 réduit le développement tumoral dans le cancer de la prostate, du sein et du poumon dans des modèles murins.

-La trabectidine, agent pro-apoptotique, cible CCL2 et inhibe le développement des TAM dans le cancer de l'ovaire chez l'homme.

-Des inhibiteurs de facteurs induisant l'hypoxie (HIF), du récepteur au VEGF 1 et 2, permettent également une réduction du nombre de TAM dans la tumeur et de la vascularisation.

## c) Diminuer la survie des TAM

-Une autre stratégie consiste à induire la mort par apoptose des TAM. Le clonodrate et l'acide zolédronique sont deux bisphosphonates qui ont été évalués pour leur capacité à induire la déplétion des TAM. Le clonodrate induit la déplétion de TAM ainsi que la régression tumorale, l'angiogénèse et les métastases dans un modèle murin du cancer du poumon. Dans le cancer du sein, l'acide zolédronique induit la déplétion sélective des TAM exprimant la métalloprotéinase MMP-9, inhibe la différenciation des cellules myéloïdes en TAM en conférant des propriétés anti-tumorales aux macrophages nouvellement générés. Certains essais cliniques ont montré une survie prolongée chez des patients atteints du cancer du sein et traités pas l'acide zolédronique.

-Des immunotoxines conjuguées à des marqueurs de surface présents sur les TAM sont utilisées (immunotoxines conjugués au SR-A et au CD52 dans le cancer de l'ovaire, immunotoxines conjugués au récepteur beta des folates (FOLR2) dans le cancer de la prostate). Ces études ont montré une déplétion sélective des macrophages pro-tumoraux sans altération des macrophages anti-tumoraux.

-Des études précliniques ont montré que certaines bactéries atténuées (notamment *Shigella flexneri, Listeria monocytogenes, Chlamydia psittaci, Legionella pneumophilia*) favorisent l'apoptose des TAM et la réduction du volume tumoral. Des essais cliniques sont en cours.

d) Reprogrammer les TAM en macrophages anti-tumoraux

Basée sur leur plasticité, une stratégie élégante consiste à reprogrammer les TAM pro-tumoraux en macrophages anti-tumoraux.

-L'activation du CD40 par un anticorps monoclonal entraîne l'expression des molécules du CMH-II et du CD86 sur les TAM. Cette activation induit également l'expression de TLR9 qui, une fois activé par un motif CpG-ODN, polarise les macrophages vers une population présentant une activité anti-tumorale.

-La combinaison du CpG-ODN avec un anticorps ciblant le récepteur de l'IL-10 a montré des effets antitumoraux sur les macrophages. -L'imiquimod (activateur du TLR7) augmente la présentation antigénique par les macrophages et favorise l'induction d'une réponse lymphocytaire T anti-tumorale.

-La modulation de l'activité de STAT1 est une cible importante pour induire un phénotype anti-tumoral sur les macrophages. In vitro, l'IFN $\gamma$ , puissant activateur de la voie STAT1, induit la génération de macrophages M1 (même en présence de facteurs favorisant les macrophages M2) ainsi que la réversion des macrophages M2 en macrophages M1 (expression d'IL-12, de CD80 et de CD86).

-STAT3 et STAT6 sont des facteurs de transcription essentiels dans la polarisation de macrophages protumoraux. La molécule WP1066, inhibiteur de STAT3, induit une réversion de la tolérance immunitaire associée aux gliomes ; ce processus est associé à une expression par les macrophages des molécules de costimulation CD80 et CD86 et une expression d'IL-12.

-Le GM-CSF, qui favorise la génération de macrophages anti-tumoraux, est utilisé en immunothérapie dans des cancers humains comme le neuroblastome.

-Le « peroxisome proliferator-activated receptor » (PPAR)- $\gamma$  est impliqué dans l'acquisition d'un phénotype pro-tumoral par les TAM. Des stratégies d'inhibition de ce récepteur sur le phénotype des TAM sont en cours d'étude.

-CD47 est une molécule « don't eat me » exprimée de manière ubiquitaire ; son expression est très augmentée sur les cellules de tumeurs solides. L'interaction de CD47 avec son récepteur SIRP $\alpha$ , exprimé principalement par les phagocytes, inhibe la phagocytose des cellules tumorales par les macrophages. Son inhibition par un anticorps monoclonal neutralisant a montré des résultats encourageants dans des modèles précliniques de lymphome humain, du cancer du côlon, de cancer du sein, de glioblastome et dans les leucémies myéloïdes et lymphocytaires aigües.

e) Combiner le ciblage des TAM avec les thérapies classiques.

La radiothérapie, souvent utilisée dans le traitement de plusieurs types de cancer, entraîne une augmentation de l'infiltrat de macrophages dans la tumeur. Par conséquent, des études ont montré un bénéfice thérapeutique en combinant la radiothérapie et l'inhibition du recrutement des macrophages (en utilisant des inhibiteurs de HIF ou du M-CSF-R), objectivé par une suppression de l'infiltrat macrophagique et une diminution de la croissance tumorale dans des modèles murins du cancer de la prostate.

## Rationnel de l'étude

Les macrophages ont un rôle central dans de nombreux processus physiologiques, tels que la défense antimicrobienne, l'inflammation et l'homéostasie tissulaire. Suite à des dommages cellulaires, les monocytes sont recrutés localement où ils se différencient en macrophages avec une remarquable plasticité et une grande diversité, en réponse à divers signaux comme les cytokines [178]. Ils acquièrent ainsi des fonctions et des phénotypes distincts, à partir desquels différentes sous-populations ont été décrites. Selon la nature des molécules effectrices qu'ils expriment, les macrophages éduquent les cellules immunitaires et modulent la nature et l'intensité de la réponse immunitaire. Les macrophages peuvent aussi contribuer à la pathogénie de maladies graves, comme la fibrose ou l'immunosuppression induite par les tumeurs [192].

Bien que différentes classifications des sous-populations macrophagiques aient été proposées, la plus communément utilisée est basée sur la dichotomie Th1/Th2 et décrit deux états de polarisation des macrophages (appelés M1 et M2, voir chapitre B-3), qui représentent les extrêmes d'un continuum de polarisation [192]. Chez l'homme, trois cytokines promeuvent la survie des monocytes et leur différenciation en macrophage : le GM-CSF, le M-CSF et l'IL-34 [198], les deux dernières partageant le même récepteur. Les macrophages générés en présence de GM-CSF (GM-CSF-M $\phi$ ) sont habituellement décrits comme des macrophages M1, alors que les macrophages générés en présence de M-CSF (M-CSF-M $\phi$ ) présentent des caractéristiques de macrophages M2.

Dans les tumeurs solides, les TAM sont de loin la population leucocytaire immunosuppressive la plus abondante. En plus de leurs propriétés immuno-régulatrices, les TAM favorisent l'angiogénèse et promeuvent la progression tumorale et les métastases via la production de facteurs de croissance, de protéases et de chimiokines. Dans des études précédentes, le laboratoire a montré que les M-CSF-M $\phi$  présentaient la plupart des caractéristiques phénotypiques (CD14<sup>+</sup> CD163<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> IL-12<sup>-</sup> CD86<sup>-</sup>) et fonctionnelles (inhibition des fonctions des lymphocytes T effecteurs) des TAM isolés des cancers de l'ovaire [213].

Dans un premier temps, je me suis donc intéressé au rôle de l'IL-34 sur (i) la différenciation des monocytes en M $\phi$  ou en DC, en comparaison aux DC, aux macrophages M1, et aux différents sous-types de M2 générés in vitro et (ii) la capacité des cellules myéloïdes induites par l'IL-34 à moduler l'activation les lymphocytes T.

Dans une seconde étude, j'ai analysé la capacité des IL-34-M $\phi$ , M-CSF-M $\phi$  et TAM à moduler la polarisation des lymphocytes T mémoires. En effet, les lymphocytes T, qui orchestrent la réponse immunitaire, gardent une plasticité et peuvent adapter leur phénotype et leurs fonctions selon la nature des signaux qu'ils reçoivent [273]. Cependant, les facteurs qui gouvernent la polarisation des lymphocytes T mémoires restent mal définis. Les macrophages (résidents et nouvellement recrutés) pouvant jouer un rôle essentiel dans ce processus, comme cela a été rapporté dans les lésions inflammatoires [191], j'ai étudié leur capacité à réguler la polarisation des lymphocytes T mémoires T mémoires T mémoires humains.

## Résultats

## **1-Publication**

L'IL-34 induit la différenciation des monocytes humains en macrophages immunosuppresseurs. Effets antagonistes du GM-CSF et de l'IFNy.

# « IL-34 induces the differentiation of human monocytes into immunosuppressive macrophages. Antagonistic effects of GM-CSF and IFNγ »

Etienne D. Foucher, Simon Blanchard, Laurence Preisser, Erwan Garo, Norbert Ifrah, Philippe Guardiola, Yves Delneste, Pascale Jeannin.

Plos One, 2013, 8(2): e56045

#### Introduction

Les monocytes circulants sont des précurseurs qui peuvent se différencier dans les tissus en macrophages, en DC, ou encore en ostéoclastes. Les macrophages jouent un rôle central dans l'homéostasie tissulaire, la défense de l'hôte, l'inflammation et la réparation tissulaire. Ils participent aussi au remodelage tissulaire dans l'ontogénèse, et au contrôle des fonctions métaboliques. Les macrophages, caractérisés par leur plasticité et leur hétérogénéité, sont très sensibles à l'environnement, et, selon les signaux rencontrés (micro-organismes, dégradation tissulaire, cytokines), peuvent acquérir un phénotype fonctionnel spécifique et présenter des profils opposés (c.-à-d. pro- versus anti-inflammatoire, immunosuppresseur versus immunostimulant). Les situations physio(patho)logiques sont habituellement associées avec des changements phénotypiques et fonctionnels des macrophages, et dans certaines, différents macrophages coexistent.

Par analogie avec la classification Th1/Th2, deux états de polarisation des macrophages ont été décrits, appelés M1 et M2, qui représentent les extrêmes d'un continuum d'état d'activation. Les macrophages M1 sont induits par la stimulation des M $\phi$  par de l'IFN $\gamma$ , seul ou avec des ligands des TLR ou des cytokines (telles que le TNF $\alpha$ ). Ils sécrètent une quantité importante d'IL-12 (IL-12<sup>élevé</sup>) et peu d'IL-10 (IL-10<sup>faible</sup>), des cytokines proinflammatoires, des dérivés oxygénés et possèdent une activité microbicide et tumoricide. Les macrophages M2, aussi appelés macrophages alternatifs, ont été initialement décrits comme des cellules générées par de l'IL-4 ou de l'IL-13 (IL-4-M $\phi$ ). Ils sont caractérisés par un profil IL-12<sup>faible</sup>/IL-10<sup>élevé</sup>, ont des propriétés phagocytaires et sont impliqués dans le remodelage tissulaire, la croissance tumorale et l'immunosuppression. D'autres sous-types de macrophages M2, qui diffèrent phénotypiquement des IL-4-M $\phi$ , ont été également caractérisés. Cependant, cette classification ne reflète pas la plasticité des macrophages et le continuum des sous-types de macrophages. Une autre classification a ainsi été proposée, basée sur trois activités homéostatiques différentes : les macrophages classiquement activés (impliqués dans la défense de l'hôte et l'immunité anti-tumorale), les macrophages impliqués dans la réparation tissulaire et les macrophages régulateurs (immunorégulation et résolution de l'inflammation).

L'IL-34 a été identifiée à la suite d'un criblage fonctionnel de protéines sécrétées, basée sur la capacité à induire la survie des monocytes humains et à favoriser, avec la même efficacité que le M-CSF, la formation de

CFU-M. L'IL-34 murine favorise également la survie des M $\phi$  péritonéaux et la prolifération des progéniteurs des macrophages de la moelle osseuse.

L'IL-34 est une glycoprotéine dimérique qui ne présente aucune homologie de séquence protéique avec le M-CSF, bien que la structure secondaire de l'IL-34 suggère l'existence de quatre hélices α, comme observé pour le M-CSF. Le M-CSF-R, également appelé c-FMS ou CD115, a été identifié comme le récepteur de l'IL-34. L'ARNm de l'IL-34 est exprimé dans de nombreux tissus, et de manière plus abondante dans la rate. L'expression spatio-temporelle des ARNm de l'IL-34 et du M-CSF diffère, suggérant que l'IL-34 et le M-CSF auraient des rôles non-redondants et complémentaires. En accord avec ces observations, deux études récentes ont démontré le rôle de l'IL-34 dans l'homéostasie des cellules de Langherans et de la microglie.

En combinaison avec le RANKL, l'IL-34 peut remplacer le M-CSF pour la différenciation des ostéoclastes humains et murins. In vivo, l'administration d'IL-34 réduit la masse osseuse et son expression restaure l'absence d'ostéoclaste chez les souris déficientes en M-CSF. Cependant, des études suggèrent que l'IL-34 et le M-CSF pourraient avoir des propriétés non-redondantes. L'IL-34 et le M-CSF diffèrent dans leur capacité à induire la production des chimiokines MCP-1 et éotaxine par les monocytes humains. Ils affectent également différemment la migration de lignées cellulaires myéloïdes murines, tandis que leur capacité à favoriser la survie des Mφ murins ou la croissance des précurseurs murins de la moelle osseuse est identique. Ainsi, il a été suggéré que l'IL-34 et le M-CSF peuvent interagir avec des régions distinctes du M-CSF-R et activer des voies de signalisation différentes.

Les rôles physio(patho)logiques potentiels de l'IL-34 demeurent mal décrits. Il a été montré que l'IL-34 est sur-exprimée dans la polyarthrite rhumatoïde associée à l'ostéoclastogénèse. Dans le cancer du sein, certaines drogues anti-tumorales induisent la production d'IL-34 et de M-CSF par les cellules épithéliales mammaires, favorisant le recrutement des M $\phi$  dans le microenvironnement tumoral.

L'objectif de cette étude a été d'analyser le rôle de l'IL-34 sur la différenciation des monocytes, la fonction des cellules induites et leur impact dans un contexte tumoral.

## Matériel et Méthodes

- Afin d'étudier le rôle de l'IL-34 sur la différenciation des monocytes humains, des monocytes circulants isolés des PBMC, ont été cultivés pendant 5 jours en présence d'IL-34, de M-CSF + IL-6 (M-CSF+IL-6-M $\phi$ ) ou en présence de GM-CSF puis les GM-CSF-M $\phi$  sont stimulés en présence d'IL-4 (IL-4-M $\phi$ ), d'IL-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ -M $\phi$ ), d'IL-10 (IL-10-M $\phi$ ).

- Analyse fonctionnelle : Nous réalisons des co-cultures de IL-34-Mφ avec des lymphocytes T mémoires afin d'évaluer la capacité à moduler la prolifération des lymphocytes T mémoires.

- Dans un but thérapeutique, les monocytes ont été incubés avec différentes cytokines, et, en présence d'IL-34, et le phénotype de ces cellules a été analysé après 5 jours de différenciation afin de sélectionner les cytokines capables d'inhiber la génération des IL-34-Mφ.

## Principaux résultats

## - L'IL-34 induit la différenciation des monocytes humains en macrophages M2

L'IL-34 permet la survie des monocytes. Le phénotype des cellules cultivées avec l'IL-34 montrent qu'elles présentent les caractéristiques des M $\phi$  (expression de CD14 et de CD163) mais pas des cellules dendritiques (absence de CD1a et aucune induction de CD83 après stimulation par le LPS).

Les IL-34-Mø produisent de l'IL-10 et peu d'IL-12 (après stimulation au LPS) comparativement aux GM-CSF-Mø. L'expression des molécules du CMH-I et du CMH-II, CD54, CD80, CD86, B7-H1, ILT3 et CD206, est équivalente à celle observée sur les M-CSF-Mø et différente de celle des GM-CSF-Mø.

Ces résultats montrent que l'IL-34 induit la différenciation des monocytes en macrophages présentant un phénotype de type M2.

## - Les IL-34-Mø sont semblables aux M-CSF-Mø

Nous avons réalisé des expériences afin de comparer le phénotype des IL-34-M $\phi$  aux quatre sous-types de macrophages M2 (M2a-d).

Le phénotype CD14<sup>élevé</sup> CD163<sup>élevé</sup> CD80<sup>faible</sup> CD86<sup>faible</sup> des IL-34-M $\varphi$  est semblable à celui des M-CSF-M $\varphi$  et diffère des IL-4-, IL-1 $\beta$ - et des IL-10-M $\varphi$ . Duluc *et al.* ont précédemment démontré que l'IL-6 facilite la consommation du M-CSF par les monocytes, augmentant le potentiel pro-M2 du M-CSF. De la même façon, les cellules cultivées en présence d'IL-34 et d'IL-6 (appelés IL-34+IL-6-M $\varphi$ ) expriment des niveaux plus élevés de CD163 et d'ILT3 que les IL-34-M $\varphi$ . De plus, l'IL-34 est consommée plus rapidement en présence d'IL-6 suggérant qu'elle augmente la consommation d'IL-34 pendant le processus de différenciation.

## - L'IL-34 induit la génération de macrophages M2 immunosuppresseurs

En accord avec des études prouvant que les macrophages M2 (IL- $10^{\text{élevé}}$  IL- $12^{\text{faible}}$ ) sont immunosuppresseurs, nous avons observé que les propriétés de co-stimulation des lymphocytes T des IL-34-M $\phi$  sont inférieures à celles des GM-CSF-M $\phi$  et les IL-34-M $\phi$  inhibent la prolifération des lymphocytes T mémoires.

Ces résultats prouvent que l'IL-34 conduit à la différenciation des monocytes en macrophages M2 immunorégulateurs.

## - L'IL-34 agit via le CD115 et indépendamment du M-CSF

Nous avons ensuite étudié le mécanisme d'action de l'IL-34 sur la différenciation des monocytes en macrophages M2. Etant donné que le M-CSF est produit par les monocytes et induit leur différenciation en M-CSF-M $\phi$  par l'intermédiaire du CD115, nous avons donc évalué si la capacité de l'IL-34 à induire la différenciation des monocytes en macrophages M2 pourrait être médiée via une activation autocrine de M-CSF.

Un anticorps monoclonal neutralisant le M-CSF n'affecte pas la capacité de l'IL-34 à induire la génération des IL-34-Mφ (phénotype CD14<sup>élevé</sup> CD163<sup>élevé</sup> CD80<sup>faible</sup> CD86<sup>faible</sup> IL-10<sup>élevé</sup> IL-12<sup>faible</sup> conservé).

Ces résultats montrent que l'IL-34 induit la différenciation des monocytes en macrophages M2 via le CD115 et indépendamment du M-CSF.

## - Le GM-CSF et l'IFNy inhibent la génération des IL-34-Mø

Tandis que les macrophages M2 jouent un rôle central dans l'homéostasie des réponses immunitaires, leur accumulation locale est préjudiciable dans des situations pathologiques, comme dans le cancer. Nous avons

donc analysé la capacité d'un panel de cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-15, IL-17A, IL-17E, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-26, IL-29, TNF $\alpha$ , GM-CSF, OSM, ou IFN $\gamma$ ) à prévenir la génération des IL-34-M $\phi$ .

 $\rightarrow$  Inhibition de la différenciation en macrophages M2.

Parmi l'ensemble des cytokines testées, seules le GM-CSF et l'IFN $\gamma$  inhibent, et de manière dépendante de la dose, la génération des IL-34-M $\phi$  avec une diminution des marqueurs CD14 et CD163, une augmentation de l'expression de CD80 et CD86 et une production d'IL-12 et peu d'IL-10 (correspondant à un profil M1).

 $\rightarrow$  Repolarisation des macrophages M2 établis.

Les macrophages sont caractérisés par leur plasticité, avec des changements dynamiques de leur polarisation en fonction de leur environnement. Nous avons ainsi évalué si le GM-CSF et l'IFN $\gamma$  peuvent également induire la réversion des IL-34-M $\phi$  établis.

Seul l'IFN $\gamma$  permet de conférer aux IL-34-M $\phi$  la capacité à produire de l'IL-12 et peu d'IL-10 et d'exprimer CD80 et CD86 en réponse au LPS.

Ces résultats prouvent que le GM-CSF et l'IFN<sub>γ</sub> contrecarrent la capacité de l'IL-34 à induire des macrophages M2 immunosuppresseurs.

En conclusion, cette étude a permis de montrer le rôle de l'IL-34 dans la différenciation des monocytes circulants en macrophages M2 (CD14<sup>élevé</sup> CD163<sup>élevé</sup> CD80<sup>faible</sup> CD86<sup>faible</sup> IL-10<sup>élevé</sup> IL-12<sup>faible</sup>) qui sont similaires aux M-CSF-M $\phi$ . De plus, dans un but thérapeutique, nous avons montré que le GM-CSF ou l'IFN $\gamma$  inhibent la génération de ces macrophages M2, alors que seul l'IFN $\gamma$  induit leur réversion en macrophages M1.

# IL-34 Induces the Differentiation of Human Monocytes into Immunosuppressive Macrophages. Antagonistic Effects of GM-CSF and IFNγ

Etienne D. Foucher<sup>1,2,3</sup>, Simon Blanchard<sup>1,2,3,4</sup>, Laurence Preisser<sup>1,2,3</sup>, Erwan Garo<sup>1,2,3,4</sup>, Norbert Ifrah<sup>1,2,3,5</sup>, Philippe Guardiola<sup>1,2,3,6</sup>, Yves Delneste<sup>1,2,3,4</sup>, Pascale Jeannin<sup>1,2,3,4</sup>\*

1 LUNAM Université d'Angers, Angers, France, 2 Inserm, unit 892, Angers, France, 3 CNRS, unit 6299, Angers, France, 4 Université d'Angers, Centre Hospitalier Universitaire, Laboratoire d'Immunologie et d'Allergologie, Angers, France, 5 Université d'Angers, Centre Hospitalier Universitaire, Service des Maladies du Sang, Angers, France, 6 Plateforme SNP, Transcriptome & Epigénomique, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France

#### Abstract

IL-34 is a recently identified cytokine that signals via the M-CSF receptor and promotes monocyte survival. Depending on the environment, monocytes can differentiate into macrophages (M $\phi$ ) or dendritic cells (DC). A wide spectrum of M $\phi$  and DC subsets, with distinct phenotypes and functions, has been described. To date, the phenotype of monocytes exposed to IL-34 remains unexplored. We report here that IL-34 induces the differentiation of monocytes into CD14<sup>high</sup> CD163<sup>high</sup> CD1a<sup>-</sup> M $\phi$  (IL-34-M $\phi$ ). Upon LPS stimulation, IL-34-M $\phi$  exhibit an IL-10<sup>high</sup> IL-12<sup>low</sup> M2 profile and express low levels of the costimulatory molecules CD80 and CD86. IL-34-M $\phi$  exhibit poor T cell costimulatory properties, and have potent immunosuppressive properties (decrease of TCR-stimulated T cell proliferation). For all the parameters analyzed, IL-34-M $\phi$  are phenotypically and functionally similar to M-CSF-M $\phi$ . IL-34 appears as efficient as M-CSF in inducing the generation of immunosuppressive M $\phi$ . Moreover, the generation of IL-34-M $\phi$  is mediated through the M-CSF receptor, is independent of endogenous M-CSF consumption and is potentiated by IL-6. In an attempt to identify strategies to prevent a deleterious M2 cell accumulation in some pathological situations, we observed that IFN $\gamma$  and GM-CSF prevent the generation of immunosuppressive M $\phi$  induced by IL-34. IFN $\gamma$  also switches established IL-34-M $\phi$  into immunosuppressive M2, in a manner similar to M-CSF, and that IFN $\gamma$  and GM-CSF prevent this effect.

**Citation:** Foucher ED, Blanchard S, Preisser L, Garo E, Ifrah N, et al. (2013) IL-34 Induces the Differentiation of Human Monocytes into Immunosuppressive Macrophages. Antagonistic Effects of GM-CSF and IFNγ. PLoS ONE 8(2): e56045. doi:10.1371/journal.pone.0056045

Editor: Serge Nataf, University of Lyon, France

Received June 19, 2012; Accepted January 8, 2013; Published February 8, 2013

**Copyright:** © 2013 Foucher et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by institutional grants from INSERM (Institut national de la santé et de la recherche médicale) and the University of Angers and by a grant from La ligue contre le Cancer (Equipe labellisée 2012–2014). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: pascale.jeannin@univ-angers.fr

• These authors contributed equally to this work.

#### Introduction

Circulating monocytes are precursors that exhibit some effector functions [1,2]. They can differentiate into a variety of tissueresident macrophages (M $\phi$ ), dendritic cells (DC), and osteoclasts [3]. Macrophages play a central role in tissue homeostasis, host defense, inflammation, and tissue repair. They also participate to tissue remodeling in ontogenesis and to the control of metabolic functions [4]. Macrophages, characterized by their plasticity and heterogeneity [4,5,6], are highly sensitive to their environment and, according to the signals encountered (microorganisms, damaged self, cytokines), may acquire distinct functional phenotypes and exhibit opposite activities (i.e. pro- versus anti-inflammatory, immunosuppressive versus immunostimulatory) [4]. Pathophysiological situations are usually associated with changes in M $\phi$  phenotypes and functions and, in some of them, M $\phi$  with different phenotypes coexist [4].

Reflecting the Th1/Th2 dichotomy, two states of  $M\phi$  polarization, called M1 and M2, which represent extremes of a

spectrum of activation states, have been described [6]. The M1 phenotype results from the stimulation of  $M\phi$  with interferon- $\gamma$  $(IFN\gamma)$ , alone or with microbial products (mainly Toll-like receptor [TLR] agonists) or cytokines (such as tumor necrosis factor-a [TNFa]). M1 cells produce high levels of IL-12 (IL- $12^{high}$ ) and low levels of IL-10 (IL-10<sup>low</sup>), proinflammatory cytokines, nitrogen and oxygen intermediates, and have potent microbicidal and tumoricidal activities [4,7,8]. M2 cells, also called "alternatively activated macrophages", were initially described as cells generated in the presence of IL-4 or IL-13. M2, characterized by an IL-12<sup>low</sup> IL-10<sup>high</sup> phenotype, have potent phagocytic properties and are involved in tissue remodeling, tumor progression, and immune suppression. Other subsets of IL-10<sup>high</sup> IL-12<sup>low</sup> M2 cells (called M2-like), that differ phenotypically from IL-4-M $\phi$ , have also been characterized [6,7,9,10]. However, this classification does not reflect the extreme plasticity of  $M\phi$  and the continuum of  $M\phi$ subsets (from M1 to M2) that can exhibit characteristics shared by more than one  $M\phi$  population. Another classification has thus been proposed, based on three different homeostatic activities:

classically activated M $\phi$  (involved in host defence and antitumoral immunity), wound healing M $\phi$  (production of extracellular matrix components) and regulatory M $\phi$  (immune regulation and resolution of inflammation) [11].

IL-34 was identified by functional screening of a library of secreted proteins, based on its ability to support human monocyte survival and to promote, with the same efficiency as macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), the formation of the colonyforming unit-macrophage (CFU-M) in human bone marrow cell cultures [12]. Murine IL-34 also promotes peritoneal Mø survival and bone marrow progenitor cell proliferation [13]. IL-34 is a dimeric glycoprotein which presents no amino-acid sequence homology with M-CSF, although human IL-34 secondary structure prediction suggests the existence of four  $\alpha$ -helical bundles, as observed for human M-CSF [14,15,16]. The M-CSF receptor (M-CSF-R), also called colony-stimulating factor 1receptor, c-fms or CD115, has been identified as an IL-34 receptor [12]. IL-34 mRNA is expressed in various tissues and is most abundant in the spleen [12]. The spatiotemporal expression patterns of IL-34 and M-CSF mRNA differ, suggesting that IL-34 and M-CSF may have non-redundant and complementary roles [17,18]. In agreement with these observations, two recent studies have evidenced the role of IL-34 in the homeostasis of Langherans cells and microglia [19,20].

When used in combination with receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL), IL-34 can replace M-CSF for human and murine osteoclast differentiation [21,22]. In vivo, administration of IL-34 reduces bone mass [21,22] and the expression of IL-34 in an M-CSF-specific manner rescues osteopetrotic deficiencies in M-CSF-deficient mice [17]. However, studies suggest that IL-34 and M-CSF may also have nonoverlapping properties [12]. IL-34 and M-CSF differ in their ability to induce the production of the chemokines MCP-1 and eotaxin by human monocytes [13]. They also differently affect the migration of a murine myeloid cell line [13], while their ability to promote the survival of murine  $M\phi$  or the growth of murine bone marrow progenitors is identical [13]. In support, it has been suggested that IL-34 and M-CSF may interact with distinct regions of M-CSF-R and activate different signaling pathways [13,16]. The potential physiopathological roles of IL-34 remain poorly described. IL-34 has been reported overexpressed in rheumatoid arthritis [23] and involved in RA-associated osteoclastogenesis [24]. In breast cancer, some antitumoral drugs induce the production of both IL-34 and M-CSF by mammary epithelial cells, which may favor the recruitment of  $M\phi$  into the tumor microenvironment [25].

Taken into account the ability of IL-34 to promote human monocyte survival and the central role played by M $\phi$  in physiological and pathological situations, the objective of this study was to analyze the phenotype and function of human M $\phi$  generated in the presence of IL-34. We report that IL-34 gives rise to immunosuppressive M $\phi$  with an IL-10<sup>high</sup> IL-12<sup>low</sup> phenotype and demonstrate that granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and IFN $\gamma$  prevent their generation, while IL-6 pushes them toward a more pronounced phenotype.

#### **Materials and Methods**

#### **Ethics Statement**

PBMCs were obtained from healthy human volunteers (Blood collection center, Angers, France; agreement #ANG-2003-2).

#### Cytokines

IL-4 and GM-CSF were purchased from CellGenix (Freiburg, Germany). IL-3, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-15, IL-21, and IFN $\gamma$  were from Immunotools (Friesoythe, Germany), IL-1 $\beta$ , IL-2, and OSM were from Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany). IL-5, IL-17A, IL-17E, IL-19, IL-20, IL-22, IL-23, IL-24, IL-26, IL-29, IL-34 and TNF $\alpha$  were from R&D Systems (Abingdon, United Kingdom). M-CSF was from ORF Genetics (Kopavogur, Iceland).

#### Cell purification and culture

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated with Lymphocyte Separation Medium (PAA Laboratories, Pashing, Austria). CD14<sup>+</sup> monocytes and CD4<sup>+</sup> T cells were sorted from PBMC by positive magnetic sorting (Miltenyi Biotec). CD4<sup>+</sup> memory T cells were sorted from PBMC by negative depletion followed by a positive magnetic sorting of CD45RO<sup>+</sup> T cells (both from Miltenyi Biotec). Myeloid cells were cultured in medium consisting of RPMI 1640 medium (Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with 10% fetal calf serum (PAA Laboratories), 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM non essential amino acids, 10 mM Hepes, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (all from Lonza). CD4<sup>+</sup> T cells were cultured in serum-free X-VIVO-20 medium (Lonza).

#### Macrophage subset generation

Macrophage subtypes are referred to as the cytokines used for their generation. IL-34-M $\phi$ , M-CSF-M $\phi$ , and GM-CSF-M $\phi$  were generated by exposing monocytes (1×10<sup>6</sup> cells/ml) for 5 days to 50 ng/ml IL-34, 50 ng/ml M-CSF or 20 ng/ml GM-CSF, respectively. In some experiments, monocytes were cultured with 50 ng/ml IL-34 plus 50 ng/ml IL-6. To generate the IL-4-M $\phi$ , IL-1 $\beta$ -M $\phi$  or IL-10-M $\phi$  subsets, monocytes were first exposed for 3 days to 20 ng/ml GM-CSF and then for 2 days to 50 ng/ml IL-4, IL-1 $\beta$  or IL-10 [6]. M-CSF+IL-6-M $\phi$  were generated by exposing monocytes to 50 ng/ml M-CSF plus 50 ng/ml IL-6 [10]. In some experiments, day-5 M $\phi$  were activated for 48 h with 200 ng/ml lipopolysaccharide (LPS) (from *E. coli* serotype O111:B4; Sigma-Aldrich, St Louis, MO).

#### Cytokine quantification

IL-10 and IL-12 were quantified using commercial ELISA from Diaclone (Dijon, France) and IL-34 using a commercial ELISA from R&D Systems.

#### Flow cytometry analysis

Cells were incubated with FITC-labeled anti-CD80, PE-labeled anti-CD86, APC-labeled anti-CD4 (all from BD Pharmingen, San Diego, CA), PE-labeled anti-CD14 (Dako, Glostrup, Denmark), PC5-labeled anti-CD163 or PE-labeled anti-CD206 (R&D Systems) mAbs. Data were acquired using a FACScalibur flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA) and analyzed with the FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR). Results are expressed as mean fluorescence intensities (MFI) after subtraction of the value obtained with the isotype control mAb or as a percentage of inhibition determined as follows: (A–B)/A×100, where A and B are the MFI values in the absence or presence of the inhibitor, respectively.

#### Cell viability analysis

The viability of cells was evaluated by annexin V labeling. Data were acquired using a FACScalibur and analyzed with the FlowJo

software. Results are expressed as a percentage of annexin  $\mathbf{V}^-$  viable cells.

## Analysis of chemokine and chemokine receptor mRNA expression

IL-34-Mq, M-CSF-Mq and GM-CSF-Mq were stimulated or not for 6 h with 200 ng/ml LPS. After cell lysis using the Trizol reagent (Life technologies, Saint Aubin, France), total RNA were extracted using the RNeasy Micro kit according to the manufacturer recommendation (Qiagen, Hilden, Germany) and reverse transcribed using the Superscript II reverse transcriptase (Life technologies). The expression of CCL1, CCL2, CCL5, CCL18, CCL17, CCL22, CCL24, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL16, CX3CL1, CCR1, CCR2, CCR8, CX3CR1, CXCR1, and CXCR2 mRNA was analyzed by qPCR using the iQ SYBR Green Supermix (Biorad, Marnes-la-Coquette, France); primer sequences are available upon request. Specific gene expression was calculated using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method using GAPDH as calibrator. The transcriptional profiles were evaluated in four donors. Omics Explorer 2.3 software was used for hierarchical clustering and principal-component analysis (PCA) (Qlucore, Lund, Sweden). Hierarchical clustering of both samples and transcripts was performed using average linkage method and the Euclidean metric, with each variable being normalized to mean 0 and variance 1.

## Inhibition of T cell proliferation and mixed lymphocyte reaction

In T cell proliferation assays,  $10^5$  allogeneic CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> memory T cells, previously incubated with 3  $\mu$ M CFDA-SE (Molecular Probes, Carlsbad, CA), were cultured in X-VIVO-20 medium supplemented with 20 U/ml IL-2, in 96-well flatbottomed plates, previously coated with 1  $\mu$ g/ml anti-CD3 mAb (clone OKT3; ATCC, Manassas, VA), without or with 2×10<sup>4</sup> allogeneic LPS-activated M $\varphi$  subsets. In MLR experiments,  $10^5$ CFDA-SE stained CD4<sup>+</sup> T cells were cultured, as described above, in non-coated plates without or with 2×10<sup>4</sup> allogeneic LPSactivated M $\varphi$  subsets, in the presence of 20 U/ml IL-2. At day 7, cells were stained with APC-labeled anti-CD4 mAb for gating on T cells and the proliferation of CD4<sup>+</sup> T cells was measured by analyzing CFDA-SE dilution. Data were subsequently analyzed using the FlowJo Proliferation Platform software v7.6.5 (Tree Star, Ashland, OR).

#### Inhibition and reversion of macrophage polarization

In order to evaluate the role of CD15 and/or M-CSF in the generation of IL-34-Mø, M-CSF-Mø and GM-CSF-Mø were generated in the presence or absence of 4 µg/ml anti-M-CSF or isotype control mAbs (both from R&D Systems), or 1 µM GW2580 (LC Laboratories, Woburn, MA), a CD115 tyrosine kinase inhibitor. In order to evaluate the capacity of some cytokines to prevent the generation of IL-34-M $\phi$ , 50 ng/ml IL-1 $\beta$ , IL-2, OSM, IL-4, GM-CSF, IL-3, IL-7, IL-8, IL-9, IL-12, IL-15, IL-21, IFN<sub>γ</sub>, IL-5, IL-17A, IL-17E, IL-19, IL-20, IL-22, IL-23, IL-24, IL-26, IL-29, or TNFa were added to monocytes at day 0 together with IL-34. In reversion experiments, established day-5 IL-34-M $\phi$  were incubated with 50 ng/ml GM-CSF or IFN $\gamma$  for 3 days. In all experiments, Mo were stimulated for 48 h with 200 ng/ml LPS before quantification of IL-12 and IL-10 by ELISA and analysis of CD80 and CD86 expression by flow cytometry.

#### Statistical analysis

Data are shown as mean  $\pm$  SD and were analyzed by the Mann-Whitney test, with p<0.05 being considered significant.

#### Results

## IL-34 induces the differentiation of human monocytes into macrophages

In order to investigate the role of IL-34 on human monocyte differentiation, highly purified peripheral blood monocytes were cultured with IL-34 for 5 days. Preliminary experiments showed, as previously reported [12,13], that IL-34 promotes monocyte survival; in our experimental conditions, the maximal survival was obtained with a concentration of 50 ng/ml IL-34 (data not shown). The phenotype of cells cultured with IL-34 was analyzed by flow cytometry and their ability to produce IL-10 and IL-12 was assessed by ELISA. IL-34 induced monocyte differentiation into cells exhibiting  $M\phi$  characteristics, as evidenced by the expression of CD14 and CD163 (Fig. 1A), but not dendritic cell features (absence of CD1a and no induction of CD83 upon LPS stimulation; data not shown). These differentiated cells were called IL-34-Mo. As controls, the macrophage differentiation factors GM-CSF (GM-CSF-Mq) and M-CSF (M-CSF-Mq) also gave rise to  ${\rm CD1a}^ {\rm CD14}^+$   ${\rm CD163}^+$  cells (Fig. 1A and data not shown) [7,10,26]. IL-34-Mo and, as previously reported [10], M-CSF-Mo, expressed higher levels of CD14 (2.5-fold increase) and CD163 (25-fold increase) than GM-CSF-Mq (Fig. 1A). IL-34 and M-CSF were equivalent in maintaining the level of CD14 (Fig. 1B, left panel) and in increasing the expression of CD163 (Fig. 1B, right panel) during the 5-days differentiation process. Interestingly, the induction of CD163 and the expression of CD14 were homogenous on the whole cell population (Fig. 1B), suggesting that IL-34 and M-CSF induce the differentiation of monocytes into a Mo subset. In contrast, GM-CSF decreased the expression of CD14 and did not induce the expression of CD163 (Fig. 1B, right panels). Finally, the expression of MHC-I, MHC-II, CD54, CD80, CD86, B7-H1, ILT3 and CD206 was similar on IL-34-Mq and M-CSF-M $\phi$  and was different to the one exhibited by GM-CSF- $M\phi$  (Table 1).

These results show that IL-34 supports the differentiation of human peripheral blood monocytes into  $M\phi$ .

#### IL-34-Mφ exhibit a M2 phenotype

We then analyzed the phenotype of activated IL-34-M $\varphi$ . Upon LPS stimulation, IL-34-M $\varphi$  and, as expected [7], M-CSF-M $\varphi$ , produced weak or undetectable levels of IL-12 (Fig. 1C). In contrast, GM-CSF-M $\varphi$  produced higher levels of IL-12 and lower levels of IL-10 than IL-34-M $\varphi$  and M-CSF-M $\varphi$  (Fig. 1C). This IL-10<sup>high</sup> IL-12<sup>low</sup> phenotype of IL-34-M $\varphi$  is typical of a M2 polarization [4,6,7,9]. The expression of CD80, CD86 (Fig. 1A) and CD206 (Table 1) was upregulated on LPS-stimulated GM-CSF-M $\varphi$ , compared to LPS-stimulated IL-34-M $\varphi$  and M-CSF-M $\varphi$ . In contrast, the expression of MHC-I, MHC-II, CD54, B7-H1 and ILT3 was similar on LPS-stimulated IL-34-M $\varphi$ , M-CSF-M $\varphi$  and GM-CSF-M $\varphi$  (Table 1).

Four M2 cell subsets elicited by exposing GM-CSF-M $\phi$  to IL-4 (IL-4-M $\phi$ ), IL-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ -M $\phi$ ), IL-10 (IL-10-M $\phi$ ) [4,5,6,27] or by exposing monocytes to M-CSF plus IL-6 (M-CSF+IL-6-M $\phi$ ) [10], have been described. These subsets are. The CD14<sup>high</sup> CD163<sup>high</sup> CD80<sup>low</sup> CD86<sup>low</sup> phenotype of IL-34-M $\phi$  is similar to the one of M-CSF-M $\phi$  and differs from IL-4-, IL-1 $\beta$ - and IL-10-M $\phi$  (Fig. 2A–D).

We have previously demonstrated that IL-6 favors M-CSF consumption by monocytes and, in the presence of M-CSF, gives



**Figure 1. IL-34 induces monocyte differentiation into M2 cells.** *A*, *IL-34-M* $\phi$  *exhibit a CD14*<sup>*high*</sup> *CD163*<sup>*high*</sup> *CD86*<sup>*low*</sup> *D086*<sup>*low*</sup> *phenotype*. The expression of CD14 and CD163 (before LPS stimulation) and of CD80 and CD86 (after LPS stimulation) was analyzed by flow cytometry on IL-34-M $\phi$ , M-CSF-M $\phi$ , and GM-CSF-M $\phi$ . For each marker, the grey histogram corresponds to isotype control mAb and is similar in the 3 experimental conditions. Results are representative of 1 of 5 experiments. *B*, *IL-34-M\phi polarization results in the maintenance of CD14 and in the acquisition of CD163*. The expression of CD14 and CD163 was analyzed by flow cytometry during the 5-day polarization of IL-34-M $\phi$ , M-CSF-M $\phi$ , and GM-CSF-M $\phi$  (left panels). Right panels, flow cytometry histograms of CD14 and CD163 expression by monocytes cultured with IL-34 and analyzed at day 1, day 3, and day5. *C*, *IL-34-M\phi display an IL-10*<sup>*high*</sup> *IL-12*<sup>*low*</sup> *phenotype*. IL-10 and IL-12 were quantified in the supernatants of IL-34-M $\phi$ , M-CSF-M $\phi$ , and GM-CSF-M $\phi$  after LPS stimulation. Results are expressed in pg/ml (IL-12) or ng/ml (IL-10) (mean ± SD, n = 5). \* p<0.05, compared to GM-CSF.

rise to cells with a more pronounced M2 phenotype [10,28]. Similarly, cells cultured with IL-34 and IL-6 (called IL-34+IL-6-M $\phi$ ) express higher levels of CD163 (Fig. 2B) and ILT3 (Fig. 2E) than IL-34-M $\phi$ . Interestingly, the concentrations of IL-34 were reduced in the supernatants of cells cultured with IL-34 plus IL-6 compared to cells cultured with IL-34 alone (Fig. 2F). This results, added to the fact that no IL-34 mRNA was detected during the 5-days culture with IL-34, in the absence or presence of IL-6 (data

not shown), suggests that IL-6 enhances the consumption of IL-34 during the differentiation process.

Previous studies suggested that M1 and M2 exhibit different chemokine and chemokine receptor patterns [6,29,30,31]. PCA of the transcriptional profiles evidenced a relationship between samples, according to the polarization, and revealed the absence of segregation between IL-34-M $\phi$  and M-CSF-M $\phi$  (Fig. 3A). Moreover, IL-34-M $\phi$  and M-CSF-M $\phi$  have lower levels of the Table 1. Analysis of cell surface markers on macrophage subsets.

Markers	Without LPS			With LPS			
	<b>IL-34-Μ</b> φ	M-CSF-Μφ	GM-CSF-Mφ	IL-34-Μφ	Μ-CSF-Μφ	GM-CSF-Μφ	
CD14	++++	++++	+++	+++	+++	++++	
CD163	+++++	+++++	++	+++++	+++++	+++	
CD80	-	-	+	-	_	+	
CD86	+	+	+	+	+	++	
B7H1	-	-	-	+	+	+	
ILT3	++++	++++	+++	++	++	+	
CD54	+	+	++	++	+++	+++	
MHC 1	+++	+++	+++	+++	+++	++++	
MHC 2	++++	++++	+++	+++	+++	++++	
CD206	-	-	+++	+	+	++	

The expression of the indicated markers was analyzed by FACS on IL-34-M $\phi$ , M-CSF-M $\phi$  and GM-CSF-M $\phi$ , stimulated or not for 48 h with 200 ng/ml LPS. Results are expressed as mean fluorescence intensity values (after subtraction of the MFI obtained with the isotype control mAb) and are representative of 4 separate experiments. +++++ indicates MFI greater than 1000; +++, MFI greater than 400 and less than 1000; +++, MFI greater than 200 and less than 400; ++, MFI greater than 100 and less than 200; +, MFI greater than 20 and less than 100 and, - indicates MFI less than 20.

doi:10.1371/journal.pone.0056045.t001

mRNA encoding CCL1, CCL17, CCL22, CCL24 and CX3CL1 than GM-CSF-M $\phi$  (Fig. 3B). We also observed that the transcripts encoding the chemokine receptors CCR2 and CXCR1 were lower in IL-34-M $\phi$  and M-CSF-M $\phi$  than in GM-CSF-M $\phi$  (Fig. 3B). Stimulation of the M $\phi$  with LPS did not modify this dual expression (Fig. 3). The expression of the mRNA encoding the

other chemokines and chemokine receptors were equivalent in the three  $M\phi$  subsets (Fig. 3B).

Together, these results show that IL-34-M $\phi$  exhibit a CD14<sup>high</sup> CD163<sup>high</sup> CD80<sup>low</sup> CD86<sup>low</sup> M2 phenotype and that IL-6 pushes them into cells with a more pronounced phenotype.



**Figure 2. IL-34 induces M2 cell generation.** *A–E, IL-34 induces monocyte differentiation into M2.* Macrophage subsets were generated as described in the Material & Methods section. The expression of CD14 (*A*) and CD163 (*B*) was analyzed by flow cytometry on non stimulated cells. The expression of CD80 (*C*), CD86 (*D*) and ILT3 (*E*) was analyzed by flow cytometry after LPS stimulation. Results are expressed in MFI values (mean  $\pm$  SD, n = 5). \* p<0.05, compared to IL-34; # p<0.05, compared to IL-34+IL-6. *F, IL-6 favors IL-34 consumption*. IL-34 was quantified at different time-points in the supernatants of monocytes exposed to 50 ng/ml IL-34, without or with 50 ng/ml IL-6. Results are expressed in ng/ml (mean  $\pm$  SD, n=4). \* p<0.05.

doi:10.1371/journal.pone.0056045.g002



**Figure 3. Analysis of chemokine and chemokine receptor mRNA expression by macrophages.** A Three-dimensional projection of PCA of *IL*-34-M $\varphi$ , *M*-CSF-M $\varphi$  and GM-CSF-M $\varphi$ . Each dot represents one M $\varphi$  subset of one donor, stimulated or not for 6 h with LPS, based on values of all 18 studied chemokines/chemokine receptors. The percentage of variances is depicted on the three axes. *B*,*Two-dimensional unsupervised hierarchical clustering analysis of the chemokines/chemokine receptors expression in the M\varphi subset. The normalized values for each chemokine/chemokine receptors from four different donors is depicted according to the color scale, where red and green represent expression above and below the mean, respectively.* 

doi:10.1371/journal.pone.0056045.g003

#### IL-34-Mφ are immunosuppressive

Macrophages participate to the control of T cell responses [4,6,10]. We have thus evaluated the ability of IL-34-M $\phi$  to affect T cell proliferation. In agreement with studies showing that IL-10<sup>high</sup> IL-12<sup>low</sup> M2 are immunosuppressive [4], we observed, in mixed lymphocyte reaction (MLR) assays, that IL-34-M $\phi$  exhibit lower T cell costimulatory properties than GM-CSF-M $\phi$  (Fig. 4A). Moreover, IL-34-M $\phi$  suppressed TCR-dependent T cell proliferation more efficiently than GM-CSF-M $\phi$  (Fig. 4B), showing that they present potent immunosuppressive properties.

These results show that IL-34 drives the differentiation of monocytes into immunosuppressive  $M\phi$ .

#### IL-34 induces M2 via CD115 and independently of M-CSF

M-CSF is produced by monocytes and induces their differentiation into M-CSF-Mq by acting via CD115 [10,32]. We therefore evaluated whether the ability of IL-34 to induce monocyte differentiation into M2 may also occur through autocrine secretion of M-CSF. A neutralizing anti-M-CSF mAb did not affect the ability of IL-34 to induce the generation of IL-34-Mo, as evidenced by the maintenance of CD14 expression (Fig. 4C, left panel), the increase of CD163 expression (Fig. 4C, right panel) and the acquisition of an IL-10<sup>high</sup>/IL-12<sup>low</sup> phenotype (Fig. 4D). The expression of CD80 and CD86 by IL-34-M $\phi$ was not modulated by an anti-M-CSF mAb (data not shown). In parallel, we analyzed the expression of M-CSF during the course of monocyte differentiation into IL-34-Mq. No M-CSF was detected in the culture supernatants collected from D1 to D5 and the expression of the transcript encoding M-CSF was not modulated by IL-34 during the 5-days culture (data not shown). In contrast, monocytes exposed to M-CSF plus an anti-M-CSF mAb rapidly died in culture (Fig. 4C&D), a result in agreement with the fact that M-CSF is a survival factor for monocytes/ macrophages.

In agreement with the fact that IL-34 and M-CSF signal via CD115, the c-fms tyrosine kinase inhibitor GW2580 [12] impaired

the survival of monocytes cultured with IL-34 or M-CSF (Fig. 4C– D). Finally, we observed that the viability of cells cultured with IL-34 and M-CSF was similar from D1 to D5 (Fig. 4E and data not shown).

Collectively, these results demonstrate that IL-34 switches monocytes into M2 by acting through CD115, in an M-CSF-independent manner.

#### GM-CSF and IFN $\gamma$ prevent IL-34-M $\phi$ generation

While immunosuppressive M2 play a central role in immune homeostasis, their local accumulation is detrimental in some pathological situations, such as in cancer [4,5,33]. We thereby screened a panel of cytokines (IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-15, IL-17A, IL-17E, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-26, IL-29, TNFa, GM-CSF, OSM, or IFN $\gamma$ ) for their ability to prevent the generation of IL-34-M $\phi$ . Monocytes were incubated with the cytokines tested, in the presence of IL-34, and the phenotype of the cells was analyzed after 5 days, with a focus on the production of IL-10 and IL-12 and on the expression of CD80 and CD86. Among all the cytokines tested, GM-CSF and IFNy were the most potent in preventing IL-34-Mo generation (Fig. S1). More precisely, compared to IL-34-Mo, monocytes cultured with IL-34 plus GM-CSF or IFN $\gamma$  retained the capacity to produce IL-12 (Fig. 5A) and to express high levels of CD80 and CD86 in response to LPS (Fig. 5B), while producing undetectable levels of IL-10 (Fig. 5A). Moreover, monocytes cultured with IL-34 plus GM-CSF or IFNy expressed lower levels of CD14 and CD163 than IL-34-Mq (Fig. 5C). The ability of GM-CSF and IFNy to prevent the generation of IL-34-Mø was dose-dependent, significant at 2 or 20 ng/ml, depending on the parameters analyzed, and maximal at the highest concentration tested (50 ng/ml) (Fig. S2).

These results show that GM-CSF and IFN $\gamma$  counteract the ability of IL-34 to generate immunosuppressive M  $\phi.$ 



PLOS ONE | www.plosone.org

**Figure 4. IL-34 induces the generation of immunosuppressive M2 independently of M-CSF.** *A&B, IL-34-M\phi are immunosuppressive.* LPSstimulated IL-34-M $\phi$ , M-CSF-M $\phi$  and GM-CSF-M $\phi$  were cultured with CFDA-SE labeled CD4<sup>+</sup> T cells in MLR experiments (*A*) or with CFDA-SE labeled memory CD45RO<sup>+</sup> T cells in T cell proliferation assays (*B*); results are expressed as a percentage of cells depending on the number of cycle division (mean  $\pm$  SD, n = 4). \* p<0.05, compared to GM-CSF-M $\phi$ . Right panels, representative histograms of CFDA-SE labeling from one donor. *C&D, IL-34 switches monocytes into M2 in an M-CSF-independent manner.* Analysis of the expression of CD14 and CD163 (*C*), and of the production of IL-10 and IL-12 (quantified after a 24 h stimulation with LPS) (*D*) by IL-34-M $\phi$ , M-CSF-M $\phi$  and GM-CSF-M $\phi$  generated in the absence or presence of a neutralizing anti-M-CSF mAb, an isotype control mAb, the kinase inhibitor GW2580, or the drug diluent. Results are expressed in MFI values or in ng/ml (mean  $\pm$ SD, n = 4). *E, Analysis of cell viability.* The viability of monocytes cultured with IL-34, M-CSF or GM-CSF, in the absence of presence of a neutralizing anti-M-CSF mAb, an isotype control mAb, the kinase inhibitor GW2580, or the drug diluent, was determined at day 3 by annexinV labeling. Results are expressed as a percentage of living cells (mean  $\pm$  SD, n = 4).  $\dagger$  means >90% of died cells. doi:10.1371/journal.pone.0056045.g004

# IFN $\gamma$ skews established IL-34-M $\phi$ cells from an immunosuppressive to an immunostimulatory IL-12<sup>high</sup> IL-10<sup>low</sup> phenotype

Macrophages are characterized by their plasticity, and dynamic changes in M $\varphi$  polarization may occur in some pathologies [4]. We previously showed that cytokines that prevent the generation of M-CSF-M $\varphi$  may also induce their reversion into immunostimulatory M1 [34]. We thus evaluated whether GM-CSF and IFN $\gamma$  may also revert the phenotype of established IL-34-M $\varphi$ . Upon IFN $\gamma$  exposure, IL-34-M $\varphi$  recovered the capacity to produce high levels of IL-12 (Fig. 5D), and to express CD80 and CD86 in response to LPS (Fig. 5E), while they expressed lower levels of IL-10 (Fig. 5D), CD14 and CD163 (Fig. 5F) than IL-34-M $\varphi$ . IL-34-M $\varphi$ , exposed to GM-CSF for 3 days, recovered the ability to express CD80 and CD86 in response to LPS (Fig. 5D). The ability of GM-CSF and IFN $\gamma$  to modulate the expression of these markers was

dose-dependent, significant at 2 or 20 ng/ml, depending on the parameters analyzed, and maximal at the highest concentration tested (50 ng/ml) (Fig. S3).

In addition to confirming the plasticity of M $\phi$  [6,34], these results show that IFN $\gamma$  switches established IL-34-M $\phi$  cells into M $\phi$  with an immunostimulatory phenotype.

#### Discussion

IL-34 signals via M-CSF-R and promotes human monocyte survival [12,13,17]. Different observations suggest that IL-34 and M-CSF might have non-redundant and complementary roles [13,17,18,19,20]. As M $\phi$  participate to the control of inflammation, tissue homeostasis and metabolism, to identify the role of IL-34 on monocyte differentiation may have potential therapeutic applications, especially when the relative expression of IL-34 and M-CSF in pathological situations will be established. To date, the phenotype of the human myeloid cells exposed to IL-34 remains



**Figure 5. GM-CSF and IFN** $\gamma$  **prevent the generation of IL-34-M** $\phi$ . A–C, GM-CSF and IFN $\gamma$  prevent the differentiation of monocytes into immunosuppressive IL-34-M $\phi$ . IL-34-M $\phi$  and GM-CSF-M $\phi$  were generated in the absence or presence of GM-CSF or IFN $\gamma$  before phenotype analysis. *D*–*F*, *IFN\gamma skews monocyte differentiation from IL-34-M\phi into immunostimulatory M\phi*. IL-34-M $\phi$  and GM-CSF-M $\phi$  were cultured for 3 days in the absence or presence of GM-CSF or IFN $\gamma$  before phenotype analysis. The expression of CD14 and CD163 (*C&F*) was analyzed on non-stimulated cells. The production of IL-10 and IL-12 (*A&D*) and the expression of CD80 and CD86 (*B&E*) was analyzed after LPS stimulation. Results are expressed in MFI values, in pg/ml (IL-12) or ng/ml (IL-10), or as a percentage of inhibition (mean ± SD, n = 7), (*A,B,D&E*), \* p<0.05, compared to IL-34-M $\phi$ .

unexplored. We show here that (i) IL-34 gives rise to immunosuppressive M $\phi$  with a phenotype similar to the one induced by M-CSF, (ii) that GM-CSF and IFN $\gamma$  prevent their generation and, (iii) that IFN $\gamma$  skews established IL-34-M $\phi$  into immunostimulatory IL-12<sup>high</sup> IL-10<sup>low</sup> M1. Previous studies have reported that M1 and M2 exhibit different profiles of chemokines and chemokine receptors [29,30,31]. We observed that IL-34-M $\phi$ and M-CSF-M $\phi$  are indistinguishable, based on selected chemokines and chemokine receptors. Interestingly, GM-CSF-M $\phi$ express higher levels of the chemokines CCL1, CCL17, CCL22, CCL24 and CX3CL1, and of the chemokine receptors CCR2 and CXCR1, than IL-34-M $\phi$  and M-CSF-M $\phi$ . These molecules may constitute, in addition to the reliable markers IL-10 and IL-12, a molecular signature allowing discriminating M1 and M2.

Although it has been suggested that M-CSF and IL-34 may differentially modulate the production of some cytokines by monocytes [13], our results show that the effects of IL-34 and M-CSF on monocyte differentiation (in term of phenotypes and functions) are superimposable, a result consistent with data from others showing that human IL-34 and M-CSF are equivalent in inducing the proliferation of a mouse macrophage cell line transfected with the human M-CSF-R [17]. Our results also support a previous study showing that IL-34 was as effective as M-CSF in inducing the survival/proliferation of human monocytes and the formation of CFU-M [12]. Although our results do not allow excluding the existence of another receptor for IL-34, distinct from M-CSF-R, as previously suspected [17,18], we demonstrate, in agreement with others [12,13], that IL-34 acts on human monocytes via the M-CSF-R. Moreover, we also report that IL-34 acts on monocytes independently of endogenous M-CSF. Reciprocally, although human monocytes express IL-34 mRNA, we failed in detecting IL-34 secretion by monocytes in response to M-CSF, suggesting that M-CSF may also act independently of endogenous IL-34. Finally, in support of our results showing that IL-34 mimics the activity of M-CSF on the differentiation of human monocytes, it has been reported by others that IL-34 can replace M-CSF for osteoclast generation [21,22].

IL-34 and M-CSF mRNA are expressed in different tissues and differences in their spatiotemporal expression have been reported [17,18,19,20]. Moreover, no compensatory IL-34 mRNA expression has been observed in M-CSF-deficient mice [17]. Both these observations suggested that IL-34 and M-CSF have complementary and independent roles. More precisely, IL-34 mRNA levels are higher than M-CSF mRNA in skin, salivary glands, and in most areas of the brain [17,35,36]. Based on our results, it is tempting to speculate that, in these organs, IL-34, rather than M-CSF, may contribute to the generation of immunosuppressive M2, able to tune inflammation and to promote tissue repair. Interestingly, microglia and bone marrow-derived  $M\phi$  are tightly down-regulated to avoid excessive and detrimental immune responses. Our results suggest that IL-34, expressed by neurons and meningeal cells [37], may contribute to the generation and/or to the maintenance of the phenotype of brain-resident myeloid cells.

We report that IL-34 induces the generation of  $M\phi$  which a phenotype and functions similar to the ones of human tumorassociated macrophages (TAM) [10]. TAM accumulate in various solid tumors, and, in most of them, their density is correlated with poor prognostic [4,5,10]. In addition to immunosuppressive properties, TAM are trophic for tumors and favor angiogenesis, dissolution of connective tissues and metastasis [4,5,6,10]. In additional experiments, we have also observed that IL-34-M $\phi$ produce similar levels of TGF $\beta$ , MMP9, and VEGF than M-CSF-M $\phi$  (personal data). TAM derive from circulating monocytes that differentiate locally into M2 in response to tumor microenvironmental factors, such as M-CSF and IL-6 [10]. Recently, DeNardo and coll reported that, in breast cancer, some antitumoral drugs induce the production of both IL-34 and M-CSF by mammary epithelial cells, suggesting that, in some circumstances, therapeutic strategies may favor tumor immune escape [25]. Based on these observations, it appears crucial to analyze, in various tumors, the relative expression of M-CSF and IL-34 by tumoral and tumorassociated stromal cells, in order to determine whether IL-34 could participate to tumor-induced immunosuppression and to determine the relative roles of IL-34 and M-CSF in different types of tumors.

While M2 maintain tissue homeostasis and prevent excessive immune responses, their accumulation in some pathologies, such as in tumor, is detrimental. Strategies to prevent cell generation and/or to reverse the immunosuppressive properties of M2 may increase the efficacy of anti-tumor immunotherapies. Interestingly, we observed that IFN $\gamma$  (i) switches established IL-34-M $\phi$  into immunostimulatory M1 and, (ii) prevents the generation of IL-34- $M\phi$ . IFN $\gamma$  is a potent activator of myeloid cells inducing the generation of immunostimulatory M1 and, as previously observed, preventing the generation of TAM-like in ovarian cancer [34]. In addition, GM-CSF was able to prevent IL-34-Mø generation. Recently, by analyzing the transcriptional profiles of GM-CSFand M-CSF-induced  $M\phi$ , it has been observed that the expression of the M-CSF-induced genes was counteracted by the addition of a low dose (1 ng/ml) of GM-CSF [38]. We also observed that GM-CSF (used at 1 to 20 ng/ml), prevented the generation of M-CSF- $M\phi$  (personal unpublished data). Supporting these observations, GM-CSF suppresses, in a murine myeloid cell line, the expression of the M-CSF-R mRNA [32] through the transcriptional activation of a ribonuclease degradation system [27]. In contrast, IFNy does not modulate M-CSF-R mRNA expression by monocytes [39]. As IL-34 signals via M-CSF-R, this result may explain why GM-CSF prevents the effect of IL-34 on monocytes while GM-CSF appears less potent than IFNy in reverting the immunosuppressive phenotype of IL-34-M $\phi$ , although we cannot exclude that this could be achieved after a prolonged time of exposure.

In conclusion, our results identify IL-34 as a novel factor involved in the control of M $\varphi$  polarization. By acting through the M-CSF-R, IL-34 switches monocytes into immunosuppressive M $\varphi$ . IL-34 may thereby play a central role in immune homeostasis, especially in the brain and skin where IL-34 is constitutively expressed. Our results also suggest that, in order to reverse tumor-associated immunosuppression mediated by myeloid cells, strategies based on the inhibition of M-CSF-R should be privileged to prevent the effects of both IL-34 and M-CSF.

#### **Supporting Information**

## **Text S1** Supporting materials and methods. (DOC)

Figure S1 Analysis of the ability of cytokines to prevent the generation of IL-34-M $\varphi$ . Monocytes were cultured for 5 days with IL-34, in the absence or presence of IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-15, IL-17A, IL-17E, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-26, IL-29, OSM, GM-CSF, IFN $\gamma$ , or TNF $\alpha$ . The expression of CD80 and CD86 (*A*) and the production of IL-10 and IL-12 (*B*) were determined after 48 h stimulation with 200 ng/ml LPS. Results were compared to those from GM-CSF-M $\varphi$  and M-CSF-M $\varphi$ . Results are expressed in MFI values or in pg/ml (IL-12) or ng/ml (IL-10). Results are representative of one of three experiments. (TIF)



Figure S2 Dose-dependent analysis of the inhibitory activity of IFNy and GM-CSF on macrophage polarization. IL-34-M $\phi$ , M-CSF-M $\phi$  and GM-CSF-M $\phi$  were generated in the absence or presence of 2, 10 or 50 ng/ml GM-CSF or IFNy. The expression of CD163 (A) was analyzed on non stimulated cells; the expression of CD80 (B) and CD86 (C) and the production of IL-12 and IL-10 (D) were analyzed after 48 h stimulation with 200 ng/ml LPS. Results are expressed in MFI values or in pg/ml (IL-12) or ng/ml (IL-10) (mean  $\pm$  SD, n = 4). (TIF)

Figure S3 Dose-dependent analysis of the inhibitory activity of IFNy and GM-CSF on macrophage reversion. IL-34-M $\phi$ , M-CSF-M $\phi$  and GM-CSF-M $\phi$  were cultured for 3 days in the absence or presence of 2, 10 or 50 ng/ml GM-CSF or IFNy. The expression of CD80 and CD86 (A) and the production of IL-12 and IL-10 (B) were analyzed after 48 h stimulation with

#### References

- Narni-Mancinelli E, Soudja SM, Crozat K, Dalod M, Gounon P, et al. (2011) Inflammatory monocytes and neutrophils are licensed to kill during memory responses in vivo. PLoS Pathog 7: e1002457. Soudja SM, Ruiz AL, Marie JC, Lauvau G (2012) Inflammatory monocytes
- activate memory CD8(+) T and innate NK lymphocytes independent of cognate antigen during microbial pathogen invasion. Immunity 37: 549-562
- Gordon S, Taylor PR (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. Nature reviews Immunology 5: 953–964.
  Sica A, Mantovani A (2012) Macrophage plasticity and polarization: in vivo
- veritas. The Journal of clinical investigation 122: 787-795
- 5. Biswas SK, Mantovani A (2010) Macrophage plasticity and interaction with Jymphocyte subsets: cancer as a paradigm. Nature immunology 11: 889–896. 6. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, et al. (2004) The
- chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. Trends in immunology 25: 677-686.
- Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, Hoeve MA, Kramer M, et al. (2004) Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101: 4560-4565.
- Lacey DC, Achuthan A, Fleetwood AJ, Dinh H, Roiniotis J, et al. (2012) Defining GM-CSF- and Macrophage-CSF-Dependent Macrophage Responses 8 by In Vitro Models. Journal of immunology 188: 5752-5765
- 9. Fleetwood AJ, Lawrence T, Hamilton JA, Cook AD (2007) Granulocytemacrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation. Journal of immunology 178: 5245–5252.
- Duluc D, Delneste Y, Tan F, Moles MP, Grimaud L, et al. (2007) Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. Blood 110: 4319-4330.
- 11. Mosser DM, Edwards JP (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. Nature reviews Immunology 8: 958-969.
- 12. Lin H, Lee E, Hestir K, Leo C, Huang M, et al. (2008) Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome. Science 320: 807-811.
- 13. Chihara T, Suzu S, Hassan R, Chutiwitoonchai N, Hiyoshi M, et al. (2010) IL-34 and M-CSF share the receptor Fms but are not identical in biological activity and signal activation. Cell death and differentiation 17: 1917–1927.
- 14. Pandit J, Bohm A, Jancarik J, Halenbeck R, Koths K, et al. (1992) Threedimensional structure of dimeric human recombinant macrophage colony-stimulating factor. Science 258: 1358–1362.
- 15. Droin N, Solary E (2010) Editorial: CSF1R, CSF-1, and IL-34, a "menage a trois" conserved across vertebrates. Journal of leukocyte biology 87: 745-747.
- 16. Ma X, Lin WY, Chen Y, Stawicki S, Mukhyala K, et al. (2012) Structural basis for the dual recognition of helical cytokines IL-34 and CSF-1 by CSF-1R. Structure 20: 676–687.
- 17. Wei S, Nandi S, Chitu V, Yeung YG, Yu W, et al. (2010) Functional overlap but differential expression of CSF-1 and IL-34 in their CSF-1 receptor-mediated regulation of myeloid cells. Journal of leukocyte biology 88: 495–505. 18. Nandi S, Gokhan S, Dai XM, Wei S, Enikolopov G, et al. (2012) The CSF-1
- receptor ligands IL-34 and CSF-1 exhibit distinct developmental brain expression patterns and regulate neural progenitor cell maintenance and maturation. Developmental biology
- 19. Greter M, Lelios I, Pelczar P, Hoeffel G, Price J, et al. (2012) Stroma-derived interleukin-34 controls the development and maintenance of langerhans cells and the maintenance of microglia. Immunity 37: 1050–1060.
- Wang Y, Szretter KJ, Vermi W, Gilfillan S, Rossini C, et al. (2012) IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. Nature immunology 13: 753-760.

200 ng/ml LPS; results are expressed in MFI values or in pg/ml (IL-12) or ng/ml (IL-10) (mean  $\pm$  SD, n = 4). (TIF)

#### Acknowledgments

We are very grateful to all members of the laboratory for critical readings and helpful discussions; for technical assistance and for comments on the paper.

We also thank members of the molecular biology and cytometry core facility (SCCAN platform).

#### **Author Contributions**

Supervised the project: PG NI YD PJ. Performed the experiments: EDF SB LP EG. Wrote the paper: PG NI YD PJ.

- 21. Chen Z, Buki K, Vaaraniemi J, Gu G, Vaananen HK (2011) The critical role of IL-34 in osteoclastogenesis. PloS one 6: e18689.
- Baud'huin M, Renault R, Charrier C, Riet A, Moreau A, et al. (2010) Interleukin-34 is expressed by giant cell tumours of bone and plays a key role in RANKL-induced osteoclastogenesis. The Journal of pathology 221: 77–86.
- 23. Chemel M, Le Goff B, Brion R, Cozic C, Berreur M, et al. (2012) Interleukin 34 expression is associated with synovitis severity in rheumatoid arthritis patients. Ann Rheum Dis 71: 150-154.
- 24. Hwang SJ, Choi B, Kang SS, Chang JH, Kim YG, et al. (2012) Interleukin-34 produced by human fibroblast-like synovial cells in rheumatoid arthritis supports osteoclastogenesis. Arthritis Res Ther 14: R14.
- 25. DeNardo DG, Brennan DJ, Rexhepaj E, Ruffell B, Shiao SL, et al. (2011) Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. Cancer Discov 1: 54-67.
- 26. Metcalf D (1991) Control of granulocytes and macrophages: molecular, cellular, and clinical aspects. Science 254: 529-533.
- 27. Gliniak BC, Park LS, Rohrschneider LR (1992) A GM-colony-stimulating factor (CSF) activated ribonuclease system transregulates M-CSF receptor express in the murine FDC-P1/MAC myeloid cell line. Molecular biology of the cell 3: 535 - 544.
- 28. Jeannin P, Duluc D, Delneste Y (2011) IL-6 and leukemia-inhibitory factor are involved in the generation of tumor-associated macrophage: regulation by IFNgamma. Immunotherapy 3: 23-26.
- 29 Fraticelli P, Sironi M, Bianchi G, D'Ambrosio D, Albanesi C, et al. (2001) Fractalkine (CX3CL1) as an amplification circuit of polarized Th1 responses The Journal of clinical investigation 107: 1173-1181.
- 30. Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A (2006) Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. Journal of immunology 177: 7303-7311.
- 31. Beyer M, Mallmann MR, Xue J, Staratschek-Jox A, Vorholt D, et al. (2012) High-resolution transcriptome of human macrophages. PloS one 7: e45466.
- 32. Gliniak BC, Rohrschneider LR (1990) Expression of the M-CSF receptor is controlled posttranscriptionally by the dominant actions of GM-CSF or multi-CSF. Cell 63: 1073-1083.
- 33. Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P (2006) Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. European journal of cancer 42: 717-727.
- 34. Duluc D, Corvaisier M, Blanchard S, Catala L, Descamps P, et al. (2009) Interferon-gamma reverses the immunosuppressive and protumoral properties and prevents the generation of human tumor-associated macrophages. International journal of cancer Journal international du cancer 125: 367-373.
- Cecchini MG, Dominguez MG, Mocci S, Wetterwald A, Felix R, et al. (1994) 35. Role of colony stimulating factor-1 in the establishment and regulation of tissue macrophages during postnatal development of the mouse. Development 120: 1357-1372
- Ginhoux F, Tacke F, Angeli V, Bogunovic M, Loubeau M, et al. (2006) Langerhans cells arise from monocytes in vivo. Nature immunology 7: 265-273.
- 37. Mizuno T, Doi Y, Mizoguchi H, Jin S, Noda M, et al. (2011) Interleukin-34 selectively enhances the neuroprotective effects of microglia to attenuate oligomeric amyloid-beta neurotoxicity. The American journal of pathology 179: 2016-2027
- 38. Brocheriou I, Maouche S, Durand H, Braunersreuther V, Le Naour G, et al. (2011) Antagonistic regulation of macrophage phenotype by M-CSF and GM-CSF: implication in atherosclerosis. Atherosclerosis 214: 316-324.
- 39. Espinoza-Delgado I, Longo DL, Gusella GL, Varesio L (1990) IL-2 enhances cfms expression in human monocytes. Journal of immunology 145: 1137-1143.

#### **Supporting information**

#### **Supporting Materials and Methods**

Role of cytokines on the generation of IL-34-M $\varphi$ . Monocytes were cultured for 5 days with 20 ng/ml GM-CSF (GM-CSF-M $\varphi$ ), 50 ng/ml M-CSF (M-CSF-M $\varphi$ ) or 50 ng/ml IL-34 (IL-34-M $\varphi$ ), in the absence or presence of 50 ng/ml of the following cytokines: IL-1 $\beta$ , IL-2, OSM (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), IL-4, GM-CSF (CellGenix, Freiburg, Germany), IL-3, IL-7, IL-8, IL-9, IL-12, IL-15, IL-21, IFN $\gamma$  (Immunotools, Friesoythe, Germany), IL-5, IL-17A, IL-17E, IL-19, IL-20, IL-22, IL-23, IL-24, IL-26, IL-29, or TNF $\alpha$  (R&D Systems, Abingdon, United Kingdom). The expression of CD80 and CD86 (analyzed by flow cytometry) and the production of IL-10 and IL-12 (quantified by ELISA) were analyzed after 2 days activation with 200 ng/ml LPS. Results are expressed in MFI values, in pg/ml (IL-12) or in ng/ml (IL-10). Results are representative of one out of three experiments.

**Dose-dependent inhibition and reversion of macrophage polarization**. Monocytes were cultured for 5 days with 50 ng/ml M-CSF (M-CSF-M $\phi$ ) or IL-34 (IL-34-M $\phi$ ) or with 20 ng/ml GM-CSF (GM-CSF-M $\phi$ ). In inhibition experiments, 2, 20 or 50 ng/ml GM-CSF or IFN $\gamma$  were added at day 0. The expression of CD163 was analyzed on non stimulated cells and the expression of CD80 and CD86 and the production of IL-10 and IL-12 were analyzed after 48 h stimulation with 200 ng/ml LPS. In reversion experiments, day-5 IL-34-M $\phi$  and M-CSF-M $\phi$  were incubated with 2, 20 and 50 ng/ml GM-CSF or IFN $\gamma$  for 3 days. The expression of CD86 and the production of IL-10 and IL-12 were analyzed after 48 h stimulation of IL-10 and IL-12 were analyzed after 48 h stimulation of IL-10 and IL-12 were analyzed after 48 h stimulation of IL-10 and IL-12 were analyzed after 48 h stimulation with 200 ng/ml GM-CSF or IFN $\gamma$  for 3 days. The expression of CD86 and the production of IL-10 and IL-12 were analyzed after 48 h stimulation with 200 ng/ml GM-CSF or IFN $\gamma$  for 3 days. The expression of CD86 and the production of IL-10 and IL-12 were analyzed after 48 h stimulation with 200 ng/ml LPS. Results are expressed in MFI values, in pg/ml (IL-12) or in ng/ml (IL-10) (mean ± SD, n=4).






## **2- Publication**

Les macrophages induits par l'IL-34 et le M-CSF polarisent les lymphocytes T mémoires en lymphocytes Th17 via l'IL-1a membranaire.

## « IL-34- and M-CSF-induced macrophages switch memory T cells into Th17 cells via membrane IL-1α »

Etienne D. Foucher, Simon Blanchard, Laurence Preisser, Philippe Descamps, Norbert Ifrah, Yves Delneste, Pascale Jeannin.

European Journal of Immunology, 2015, 45(4): 1092-102.

Contribution équivalente : Etienne D. Foucher et Simon Blanchard.

### Introduction

Les M $\phi$  ont un rôle central dans de nombreux processus physiologiques, tels que le contrôle des infections, la réparation tissulaire, l'inflammation, et l'homéostasie tissulaire. Ces cellules sont caractérisées par une plasticité et une diversité. Les monocytes et les M $\phi$  répondent rapidement aux signaux locaux, en sécrétant des cytokines, et en acquérant des phénotypes et des fonctions distincts (c.-à-d. anti- ou proinflammatoire, immunostimulant ou immunorégulateur). Ils conditionnent les cellules immunitaires et modulent la nature et l'intensité des réponses immunitaires en contrôlant, notamment, la polarisation des lymphocytes T. Les M $\phi$  peuvent également contribuer à la pathogénie de maladies graves comme la mise en place de l'immunosuppression dans les tumeurs. Actuellement, il est crucial de caractériser les facteurs impliqués dans la génération des sous-types de macrophage pour déterminer leurs rôles dans des conditions physiologiques.

Deux états de polarisation de macrophage (appelé M1 et M2), qui représentent les extrémités d'un éventail de profils de polarisation, ont été décrits. Les macrophages M1 stimulés avec l'IFN $\gamma$ , seul ou en combinaison avec des composants microbiens, produisent de l'IL-12 (IL-12<sup>élevé</sup>) et peu d'IL-10 (IL-10<sup>faible</sup>). Ils sécrètent des cytokines pro-inflammatoires et ont des propriétés antimicrobiennes et anti-tumorales. Au contraire, les macrophages M2 générés par de l'IL-4 ou de l'IL-13 comme initialement décrits, montrent un phénotype IL-10<sup>élevé</sup>/IL-12<sup>faible</sup>. L'IL-10, les glucocorticoïdes, les complexes immuns, et les ligands au CD115 induisent également différents sous-types de macrophages M2 avec des phénotypes distincts des IL-4-M $\phi$ . Les macrophages M2 sont impliqués dans des processus physiologiques (remodelage tissulaire, homéostasie des cellules immunitaires) et pathologiques (immunosuppression associée aux tumeurs).

Chez l'homme, trois cytokines, le GM-CSF, le M-CSF, et l'IL-34, favorisent la survie des monocytes et la différenciation en M $\varphi$ . Les M $\varphi$  générés en présence de GM-CSF (GM-CSF-M $\varphi$ ) produisent de l'IL-12, de l'IL-23 et des cytokines pro-inflammatoires, mais peu d'IL-10. Ils présentent des propriétés de co-stimulation des lymphocytes T, anti-tumorales, et microbicides. Les GM-CSF-M $\varphi$  sont similaires aux cellules M1 (même en l'absence de stimulation par l'IFN $\gamma$ ). L'IL-34 et le M-CSF, par l'intermédiaire du récepteur CD115, induisent la différenciation des monocytes humains en macrophages ayant des phénotypes semblables. Ces macrophages M2 (IL-10<sup>élevé</sup>/IL-12<sup>faible</sup>) ne produisent pas d'IL-23 et expriment peu les molécules du CMH-II,

CD80, et CD86. Les M-CSF-M $\phi$  et les IL-34-M $\phi$  possèdent de faibles capacités de co-stimulation des lymphocytes T et diminuent l'activité des lymphocytes T effecteurs.

Dans les tumeurs solides, les TAM sont immunosuppresseurs et sont les cellules les plus abondantes dans le microenvironnement tumoral. Dans de nombreux cancers, leur nombre est corrélé à un mauvais pronostic. En plus des propriétés immunorégulatrices, les TAM favorisent l'angiogenèse, la croissance tumorale et les métastases. Dans des études précédentes, nous avons montré que les M-CSF-Mφ et les IL-34-Mφ ont les mêmes caractéristiques phénotypiques (c.-à-d. CD14<sup>élevé</sup> CD163<sup>élevé</sup> IL-10<sup>élevé</sup> IL-12<sup>faible</sup> CD86<sup>faible</sup>) et fonctionnelles (c.-à-d. faible capacité de co-stimulation des lymphocytes T, inhibition des fonctions des lymphocytes T effecteurs) que les TAM isolés du cancer de l'ovaire.

Les lymphocytes Th CD4<sup>+</sup> orchestrent la réponse immunitaire. Selon les signaux fournis par les CPA professionnelles, les lymphocytes T naïfs CD4<sup>+</sup> s'activent et se différencient en sous-types de lymphocytes T avec des profils cytokiniques et fonctionnels distincts (tels que lymphocytes Th1, Th2, Th17, et Treg). Les lymphocytes T mémoires sont des cellules plastiques qui adaptent leur phénotype et leurs fonctions selon l'environnement. Bien que les macrophages M1 et M2 produisent des cytokines différentes impliquées dans la polarisation des lymphocytes T, leurs rôles dans ce processus en reste mal étudiés.

L'objectif de cette seconde étude a été d'évaluer la capacité des M-CSF-M $\phi$ , IL-34-M $\phi$  et TAM isolés du cancer de l'ovaire à moduler la polarisation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires humains.

### Matériel et Méthodes

- Pour évaluer la capacité des macrophages M2 à moduler la polarisation des lymphocytes T mémoires, nous réalisons une co-culture de M-CSF-M $\phi$ , de IL-34-M $\phi$  ou de TAM stimulés au LPS avec des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires en présence d'un anti-CD3 mAc. Dans certaines expériences, nous avons purifié des lymphocytes T mémoires non-Th17 IL-23R<sup>-</sup> CD161<sup>-</sup> CCR6<sup>-</sup> (n'exprimant pas RORc et ne produisant pas d'IL-17 après stimulation).

- Après la co-culture, nous analysons par cytométrie en flux, l'expression des cytokines IFN $\gamma$ , IL-17, IL-10, IL-4 qui témoignent respectivement d'une polarisation de type Th1, Th17, Tr1 ou Th2.

### Principaux résultats

### - Les M-CSF-Mø, IL-34-Mø et TAM induisent une fréquence importante de lymphocytes T produisant de l'IL-<u>17</u>

Nous avons analysé la capacité des M-CSF-Mø, IL-34-Mø et TAM à moduler la polarisation des lymphocytes T humains.

Après co-culture avec les lymphocytes T mémoires, nous observons que les M-CSF-M $\varphi$ , IL-34-M $\varphi$  et TAM induisent une fréquence et un nombre absolu important de lymphocytes T exprimant de l'IL-17. Cette fréquence est équivalente à celle obtenue lorsque les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires sont activés par un anti-CD3 mAc + anti-CD28 mAc + IL-1 $\beta$  + IL-23, décrit dans la littérature comme la condition expérimentale pour obtenir des lymphocytes Th17. Au contraire, les GM-CSF-M $\varphi$  génèrent préférentiellement une réponse de type Th1. Néanmoins, le taux d'ARNm de l'IL-17 est augmenté par les M-CSF-M $\varphi$  et les IL-34-M $\varphi$ , bien qu'à un niveau plus bas que les lymphocytes Th17 induits avec anti-CD3 mAc + anti-CD28 mAc + IL-1 $\beta$  + IL-23. Ainsi, les M-CSF-M $\varphi$ , IL-34-M $\varphi$  et TAM induisent une fréquence et un nombre absolu important de lymphocytes T mémoires exprimant de l'IL-17.

### - Les M-CSF-Mø, IL-34-Mø et TAM polarisent les lymphocytes T mémoires en lymphocytes Th17

Nous avons évalué si les M-CSF-M $\phi$  et IL-34-M $\phi$  favorisent la génération de lymphocytes Th17 (i) en polarisant les lymphocytes T mémoires non-Th17 en lymphocytes Th17 et/ou (ii) en augmentant la prolifération des lymphocytes Th17 préexistants.

Les résultats montrent que les M-CSF-M $\phi$  et les IL-34-M $\phi$  sont aussi efficaces que le stimulus anti-CD28 mAc plus IL-1 $\beta$  et IL-23 pour polariser les lymphocytes T non-Th17 en lymphocytes Th17.

Ces résultats suggèrent que l'augmentation de la fréquence des cellules IL-17<sup>+</sup> observée dans les lymphocytes T CD45RO<sup>+</sup> IL-23R<sup>-</sup> CD161<sup>-</sup> CCR6<sup>-</sup> résulte d'une polarisation de lymphocytes T en lymphocytes Th17 plutôt que d'une prolifération des lymphocytes Th17 préexistants.

### - Les lymphocytes Th17 générés présentent un phénotype conventionnel pro-inflammatoire

De par leurs propriétés immunosuppressives, notre hypothèse était que les M-CSF-M $\phi$  et IL-34-M $\phi$  favoriseraient la génération de lymphocytes T immunorégulateurs. Nous avons donc évalué si les lymphocytes Th17 générés exprimaient des marqueurs de lymphocytes Treg.

Les lymphocytes Th17 induits par les M-CSF-M $\phi$  et les IL-34-M $\phi$  expriment les marqueurs des lymphocytes Th17 conventionnels CCR4, CCR6 et CD161 et le facteur de transcription RORc, mais n'expriment pas les marqueurs associés à une activité immunorégulatrice, tels que CD39, CD73, TGF $\beta$ , FoxP3 et ne produisent pas d'IL-10 avant ou après restimulation.

Donc, les M-CSF-Mφ et les IL-34-Mφ induisent la polarisation des lymphocytes T mémoires en lymphocytes Th17 présentant un phénotype conventionnel pro-inflammatoire.

## - La polarisation des lymphocytes Th17 induite par les M-CSF-Mφ, IL-34-Mφ et TAM est médiée par l'IL-1α membranaire.

Nous nous sommes ensuite intéressés au mécanisme de polarisation des lymphocytes T mémoires en Th17 par les macrophages M2. Nous avons donc analysé l'expression des médiateurs impliqués dans la polarisation des lymphocytes Th17 humains que sont l'IL-1, l'IL-23, et l'IL-6.

Comme décrit dans la littérature, les macrophages M2 ne produisent pas ou peu d'IL-1 $\beta$ , d'IL-1 $\alpha$ , d'IL-23 et d'IL-6, contrairement aux macrophages M1 (GM-CSF-M $\phi$ ). De plus, seuls les macrophages fixés par le paraformaldéhyde (PFA), où les molécules de surface sont conservées, induisent une polarisation en lymphocytes Th17, contrairement aux surnageants. Ceci suggère que la polarisation est induite par l'expression d'une ou plusieurs molécules membranaires à la surface des macrophages M2 et non par des molécules solubles.

Une forme membranaire de l'IL-1 $\alpha$  a été décrite. Ainsi, les M-CSF-M $\phi$ , IL-34-M $\phi$  et TAM expriment constitutivement, au cours de la différenciation, de l'IL-1 $\alpha$  membranaire, contrairement aux GM-CSF-M $\phi$  qui l'expriment peu, soutenant le fait que la fixation à la PFA a considérablement réduit la capacité des GM-CSF-M $\phi$  à induire des cellules IL-17<sup>+</sup>. Finalement, un anticorps neutralisant l'IL-1 $\alpha$  membranaire réduit fortement la fréquence de lymphocytes Th17 induite par les macrophages M2, tout comme l'IL-1RA (utilisé comme contrôle positif puisqu'il se fixe sur le récepteur à l'IL-1).

En conclusion, les M-CSF-M $\phi$ , les IL-34-M $\phi$  et les TAM induisent la polarisation de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires en lymphocytes Th17 conventionnels via l'expression constitutive de l'IL-1 $\alpha$  membranaire.

### European Journal of Immunology

# IL-34- and M-CSF-induced macrophages switch memory T cells into Th17 cells via membrane IL-1 $\alpha$

Etienne D. Foucher<sup>\*1,2,3,4</sup>, Simon Blanchard<sup>\*1,2,3,4,5</sup>, Laurence Preisser<sup>1,2,3,4</sup>, Philippe Descamps<sup>1,6</sup>, Norbert Ifrah<sup>1,2,3,4,7</sup>, Yves Delneste<sup>1,2,3,4,5</sup> and Pascale Jeannin<sup>1,2,3,4,5</sup>

- <sup>1</sup> Université d'Angers, Angers, France
- <sup>2</sup> Inserm, unit 892, Angers, France
- <sup>3</sup> CNRS, unit 6299, Angers, France
- <sup>4</sup> LabEx IGO "Immunotherapy, Graft, Oncology", Angers, France
- <sup>5</sup> Université d'Angers, CHU Angers, Laboratoire d'Immunologie et d'Allergologie, Angers, France
- <sup>6</sup> CHU Angers, Service de Gynécologie, Angers, France
- <sup>7</sup> CHU Angers, Service des Maladies du Sang, Angers, France

Macrophages orchestrate the immune response via the polarization of CD4<sup>+</sup> T helper (Th) cells. Different subsets of macrophages with distinct phenotypes, and sometimes opposite functions, have been described. M-CSF and IL-34 induce the differentiation of monocytes into IL-10<sup>high</sup> IL-12<sup>low</sup> immunoregulatory macrophages, which are similar to tumor-associated macrophages (TAMs) in ovarian cancer. In this study, we evaluated the capacity of human macrophages induced in the presence of M-CSF (M-CSF macrophages) or IL-34 (IL-34 macrophages) and ovarian cancer TAMs to modulate the phenotype of human CD4<sup>+</sup> T cells. Taken together, our results show that M-CSF-, IL-34 macrophages, and TAMs switch non-Th17 committed memory CD4<sup>+</sup> T cells into conventional CCR4<sup>+</sup> CCR6<sup>+</sup> CD161<sup>+</sup> Th17 cells, expressing or not IFN-gamma. Contrary, the pro-inflammatory GM-CSF macrophages promote Th1 cells. The polarization of memory T cells into Th17 cells is mediated via membrane IL-1 $\alpha$  (mIL-1 $\alpha$ ), which is constitutively expressed by M-CSF-, IL-34 macrophages, and TAMs. This study elucidates a new mechanism that allows macrophages to maintain locally restrained and smoldering inflammation, which is required in angiogenesis and metastasis.

Keywords: IL-34 · IL-1 $\alpha$  · Inflammation · Macrophages · M-CSF · Th17 cells

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the  $\mathbf{\bar{s}}$  publisher's web-site

### Introduction

Macrophages have a central role in numerous physiological processes, such as control of infection, wound healing, inflammation, and tissue homeostasis. Tissues-resident macrophages (such as

Correspondence: Dr. Pascale Jeannin e-mail: pascale.jeannin@univ-angers.fr

© 2014 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

microglia, Kupffer cells, and osteoclasts) are found in connective tissues and in every organ in the body [1]. Moreover, upon danger signals, monocytes are rapidly recruited and differentiate into macrophages [1]. Cells of the monocyte–macrophage lineage are characterized by remarkable plasticity and diversity

<sup>\*</sup>These authors contributed equally to this work.

[2, 3]. They rapidly respond to local signals, such as cytokines, by acquiring distinct phenotypes and functions (i.e. anti- versus proinflammatory, immunostimulatory versus -regulatory) [2]. These professional antigen-presenting cells (APCs) instruct immune cells and modulate the nature and intensity of immune responses by controlling/modulating T-cell polarization. Macrophages may also contribute to the pathogenesis of severe diseases, such as tumorinduced immunosuppression [2]. Currently, to characterize the factors involved in the generation of macrophage subsets is crucial for determining their roles in physiological and pathological conditions.

Two states of macrophage polarization (called M1 and M2), which represent extremes of a spectrum of polarization profiles, have been described [2]. M1 cells stimulated with IFN-gamma, alone or in combination with microbial moieties, produce high levels of IL-12 (IL-12<sup>high</sup>) and low levels of IL-10 (IL-10<sup>low</sup>). They produce pro-inflammatory cytokines and have potent antimicrobial and tumoricidal properties. At the opposite, M2 cells, initially described as macrophages exposed to IL-4 or IL-13, exhibit an IL-10<sup>high</sup> IL-12<sup>low</sup> phenotype. IL-10, glucocorticoids, immune complexes, and CD115 ligands also induce different M2-type subsets with phenotypes distinct to those of IL-4 macrophages. M2 cells are involved in physiological (tissue remodeling, immune homeostasis) and pathological (tumor-associated immunosuppression) processes.

In human, three cytokines, GM-CSF, M-CSF, and IL-34, promote monocyte survival and differentiation into macrophages [4]. Macrophages generated in the presence of GM-CSF (GM-CSF macrophages) produce IL-12, IL-23, and proinflammatory cytokines, but low levels of IL-10 [5]. They exhibit T-cell costimulatory, antitumoral, and microbicidal properties [2]. GM-CSF macrophages are usually referred to as M1 cells (even in the absence of IFN-gamma stimulation). IL-34 and M-CSF, which signal via the M-CSF receptor (c-fms or CD115), induce the differentiation of human monocytes into macrophages with closely similar phenotypes [6]. These macrophage subsets are IL-10<sup>high</sup> IL-12<sup>low</sup> cells that do not produce IL-23 and express low levels of MHC-II, CD80, and CD86 [6, 7]. M-CSF- and IL-34 macrophages exhibit low T-cell costimulatory properties and dampen the activity of effector T cells [6, 7].

In solid tumors, tumor-associated macrophages (TAMs) are the most abundant immunosuppressive leukocytes in the tumor microenvironment and, in numerous cancers, their density is correlated with a poor prognosis [3]. In addition to immunoregulatory properties, TAMs favor angiogenesis and promote tumorcell progression and metastasis [3]. In previous studies, we have shown that IL-34- and M-CSF macrophages exhibit most of the phenotypic (i.e. CD14<sup>high</sup> CD163<sup>high</sup>IL-10<sup>high</sup> IL-12<sup>low</sup> CD86<sup>low</sup>) and functional characteristics (i.e. low T-cell costimulatory properties, inhibition of activated effector T-cell functions) of TAMs isolated from human ovarian cancer [6, 7].

CD4<sup>+</sup> T helper (Th) cells orchestrate immune responses. Upon signals provided by professional APCs, inexperienced naive CD4<sup>+</sup> T cells become activated and differentiate into various Th-cell subsets with distinct cytokine profiles and functions (such as Th1, Th2, Th17, and regulatory T (Treg) cells). A fraction of these antigenexperienced T cells constitute memory cells. There is increasing evidence that memory CD4<sup>+</sup> T cells retain unexpected flexibility and plasticity and can adapt their phenotypes and functions, depending on the signals received [8]. In inflammatory lesions, this interaction between infiltrating memory T cells with resident and newly recruited macrophages participates to this process [3]. As an example, murine macrophages from the red pulp and from the gut lamina propria favor the generation of Foxp3<sup>+</sup> Treg cells [9, 10]. Although human M1 and M2 subsets differentially produce cytokines involved in T-cell polarization [5, 11], their role in this process remains poorly studied. In this study, we analyzed the ability of the immunoregulatory M-CSF- and IL-34 macrophages and of ovarian TAMs to modulate the cytokine profiles of human CD4<sup>+</sup> T cells.

Eur. J. Immunol. 2014. 00: 1-11

### Results

### M-CSF- and IL-34 macrophages convert human memory CD4<sup>+</sup> T cells into IL-17-producing T cells

We analyzed whether M-CSF- and IL-34 macrophages may modulate the pattern of cytokines expressed by human T cells. Day 7 LPS-stimulated M-CSF- or IL-34 macrophages were cultured with highly pure memory CD4<sup>+</sup> T cells, in the presence of an anti-CD3 mAb, and in the absence of IL-2 (in order to avoid their conversion into Treg cells [12]). The intracellular expression of IFN-gamma, IL-4, IL-17, IL-10, and FoxP3, reflecting Th1-, Th2-, Th17-, Tr1-cell phenotypes and Treg-cell expansion, respectively, was analyzed by FACS.

Unexpectedly, upon contact with M-CSF- and IL-34 macrophages, a large increase in the frequency (Fig. 1A and B) and absolute number (Fig. 1C) of IL-17-producing T cells was observed in the memory CD4<sup>+</sup> T-cell population. IL-34- and M-CSF macrophages were as efficient as anti-CD28 mAb plus IL-1 $\beta$  and IL-23, a potent human Th17 inducing stimulus [13], in upregulating IL-17-producing T-cell frequency (Fig. 1B). The transcript encoding IL-17A was expressed by the M-CSF- and IL-34 macrophage induced Th17 cells, although at a lower level than Th17 cells induced with anti-CD28 mAb plus IL-1 $\beta$  and IL-23 (Fig. 2A and data not shown). Interestingly, M-CSF- and IL-34 macrophages failed to polarize naive CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> T cells into Th17 cells (Supporting Information Fig. 1A and data not shown).

M-CSF- and IL-34 macrophages are usually considered as immunoregulatory cells [2, 6] while, in contrast, GM-CSF macrophages exhibit a pro-inflammatory phenotype [2]. Results showed that GM-CSF macrophages also promoted Th17 cells (increase of cell frequency and absolute number), although in a lower extent than M-CSF- and IL-34 macrophages (Fig. 1A–C). GM-CSF macrophages also failed to polarize naive CD4+ CD45RA<sup>+</sup> T cells into Th17 cells (Supporting Information Fig. 1A).

Currently, in addition to conventional CCR4<sup>+</sup> CCR6<sup>+</sup> CD161<sup>+</sup> human Th17 cells, immunoregulatory Th17 cells (which may



**Figure 1.** M-CSF-, IL-34-macrophages, and TAMs promote IL-17-producing T cells. (A–G) GM-CSF-, M-CSF-, IL-34 macrophages, and TAMs were stimulated with LPS after 7 days culture (unless otherwise stated in D and E). The intracellular expression of IL-17 and IFN-gamma was analyzed by flow cytometry in memory CD4<sup>+</sup> T cells. (A) Contour plots from one experiment representative of five independent experiments are shown. The numbers in the dot plots represent the percentage of CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> cells expressing IFN-gamma and/or IL-17A. The (B, D, F) percentages and the (C, E, G) total numbers of IL-17-producing and IFN-gamma-producing T cells are shown. (H) Left panel; IL-23R<sup>-</sup> CCR6<sup>-</sup> CD161<sup>-</sup> and IL-23R<sup>+</sup> CCR6<sup>+</sup> CD161<sup>+</sup> memory T cells were sorted by FACS and cultured as described above, before analysis of the percentage of IL-17-producing T-cells. The frequency of IL-17-producing T cells was determined at day 7. Right panel; results are expressed as a fold increase of IL-17-producing T-cell frequency compared with nonstimulated cells. (B–H) Data are shown as mean + SD and are pooled from five independent experiments. \**p* < 0.005, Wilcoxon test.

© 2014 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

www.eji-journal.eu



**Figure 2.** IL-17<sup>+</sup> T cells induced by M-CSFor IL-34 macrophages exhibit characteristic features of conventional Th17 cells. (A-E) mRNA expression of (A) IL17A, (B) CCR6, (C) IL-21, (D) RORc, and (E) T-bet was analyzed by RT-qPCR in induced memory T cells by GM-CSF- or M-CSF macrophages. (A-E) Results are compared with in vitro generated conventional Th17 and Tr1 cells (as described in the Materials and methods). mRNA expression was normalized to GAPDH. Data are shown as mean + SEM and are pooled from four independent experiments. \*p < 0.005, Wilcoxon test.

express membrane TGF-β [14], IL-10 [15], CD39, or CD73 [16]), and IL-17-producing FoxP3<sup>+</sup>Treg cells, have been described [14, 17]. As we suspected that M-CSF- and IL-34 macrophages should favor the switch of memory T cells into Treg cells, we analyzed the expression of some Treg-associated markers by Th17 cells generated in the presence of M-CSF- and IL-34 macrophages. These Th17 cells expressed CCR4, CCR6, and CD161, but not TGF-β, CD39, CD73, IL-10, and FoxP3 (Table 1 and Supporting Information Fig. 2). In contrast, these cells express the mRNA encoding CCR6 (Fig. 2B) and IL-21 (Fig. 2C), two markers of conventional Th17 cells [18].

Two subsets of Th17 cells, expressing or not IFN-gamma, have been described [19]. Both these subsets were induced by M-CSF- and IL-34 macrophages (Fig. 1A–C) and the ratio between these two subsets was similar in Th17 cells induced by M-CSF macrophages, IL-34 macrophages, or by anti-CD28 mAb plus IL-1 $\beta$  and IL-23 (Fig. 1A–C). Accordingly, these cells express RORc and T-bet mRNA (Fig. 2D and E).

We also observed that (i) unstimulated M-CSF- and IL-34 macrophages were as efficient as LPS-stimulated macrophages in upregulating Th17-cell frequency (Fig. 1D), and (ii) that the absolute number of Th17 cells was higher with LPS-stimulated than with nonstimulated macrophages (Fig. 1E). Consequently,

LPS-stimulated macrophages were used in the following experiments, unless otherwise specified.

M-CSF- and IL-34 macrophages (either stimulated not with LPS) did not modulate the frequency or and absolute number of IFN-gamma<sup>+</sup> IL-17<sup>-</sup> Th1 cells (Fig. 1F and G), while, as expected [3, 11], GM-CSF macrophages promoted Th1 cells (Fig. 1F and G). M-CSF- and IL-34 macrophages did not induce IL-4-producing Th2 cells (data not shown) and did not modulate the frequency of IFN-gamma-IL-17- IL-10+ Tr1 cells, while they decreased the frequency of FoxP3<sup>+</sup>Treg cells (Supporting Information Figs. 2B and 3). As a positive control [12], IL-10-producing cells were detected in memory T cells cultured with anti-CD28 mAb plus IL-2 and IL-10 (Supporting Information Figs. 2B and 3).

Finally, we evaluated whether M-CSF- and IL-34 macrophages enhanced Th17-cell frequency by polarizing non-Th17-committed memory T cells into Th17 cells and/or by increasing the proliferation of preexisting Th17 cells. To address this question, we used pure (Supporting Information Fig. 4A) non-Th17 IL-23R<sup>-</sup> CD161<sup>-</sup> CCR6<sup>-</sup> and Th17-committed IL-23R<sup>+</sup> CD161<sup>+</sup> CCR6<sup>+</sup> memory CD4<sup>+</sup> T cells [13, 20], isolated by FACS sorting. Contrary to IL-23R<sup>+</sup> CD161<sup>+</sup> CCR6<sup>+</sup> Th17 cells, IL-23R<sup>-</sup> CD161<sup>-</sup> CCR6<sup>-</sup> non-Th17 cells (i) express no or low levels of RORc

	IL-17 <sup>+</sup> T cells (induced by M-CSF macrophages)	IL-17 <sup>+</sup> T cells (induced by GM-CSF macrophages)	IFN-gamma <sup>+</sup> T cells (induced by GM-CSF macrophages)	Conventional Th17 cells	Tr1	Natural Treg cells
CCR4	+++	+++	+	+++	nd	nd
CCR6	++	++	-	++	nd	nd
CD161	+	+	-	+	nd	nd
IL-10*	_	+	-	-	++	nd
FoxP3*	-	-	-	-	nd	+

**Table 1.** Analysis of CCR4, CCR6, CD161, IL-10, and FoxP3 expression by IL-17<sup>+</sup> memory T cells induced by GM-CSF-, M-CSF macrophages and byIFN-gamma<sup>+</sup>-producing memory T cells induced by GM-CSF macrophages<sup>a</sup>)

<sup>a)</sup>The expression of the indicated markers was analyzed by FACS on human memory CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> T cells induced by 7 days culture with GM-CSF-, M-CSF macrophages, or TAMs. CCR4, CCR6, CD161, IL-10, and FoxP3 were analyzed on IL-17-producing T cells ('intracellular expression). Their phenotype was compared to the one exhibited by conventional Th17 cells (induced by culturing memory T cells with anti-CD28 mAb plus IL-1β and IL-23; [13, 59]), Tr1 cells (induced by culturing memory T cells with anti-CD28 mAb plus IL-1β and IL-23; [isolated from healthy subjects). Results are representative of five independent experiments. – indicates MFI greater than 40 and less than 200; ++ indicates MFI greater than 200 and less than 2000, and +++ indicates MFI greater than 2000. nd: not done.

(Supporting Information Fig. 4B) and IL-17A mRNA (Supporting Information Fig. 4C), and (ii) do not produce IL-17A upon stimulation (Supporting Information Fig. 4D). Results showed that M-CSF- and IL-34 macrophages are as potent as anti-CD28 mAb plus IL-1 $\beta$  and IL-23 in switching IL-23R<sup>-</sup> CD161<sup>-</sup> CCR6<sup>-</sup> memory T cells into Th17 cells (Fig. 1H, left panel). The frequency of IL-17-expressing T cells was also increased in CD45RO<sup>+</sup> IL-23R<sup>+</sup> CD161<sup>+</sup> CCR6<sup>+</sup> T cells cultured with M-CSF macrophages, but at a lower extent compared with non-Th17 cells (fold increase =  $2.75 \pm 0.9$  and  $20.1 \pm 1.0$ , respectively; mean  $\pm$  SD, n = 5; Fig. 1H, right panel). Similar results were obtained when T cells are cultured with anti-CD28 mAb plus IL-1 $\beta$  and IL-23 (fold increase = 18.7  $\pm$  1.4 and 3.69  $\pm$  0.91 in CD161^- CCR6^- and CD161<sup>+</sup> CCR6<sup>+</sup> T cell subsets, respectively; Fig. 1H, right panel) and IL-34 macrophages (data not shown). These results suggest that the increase in the frequency of IL-17-producing cells observed in CD45RO+ IL-23R- CD161- CCR6- T lymphocytes cultured with M-CSF- and IL-34 macrophages results from their polarization into IL-17-producing cells rather than from the proliferation of Th17 cells. Interestingly, Th17 cells generated in the presence of M-CSF- and IL-34 macrophages did not produce IL-10 after 5-day stimulation with anti-CD3 plus anti-CD28 mAbs (data not shown). These results show that, unexpectedly, M-CSF- and IL-34 macrophages switch noncommitted human memory T cells into conventional Th17 cells.

## M-CSF- and IL-34 macrophages, but not GM-CSF macrophages, constitutively express membrane IL-1α

We analyzed the expression of the human Th17-inducing factors IL-1, IL-23, and IL-6 by M-CSF- and IL-34 macrophages. As previously reported [5, 11], IL-1 $\beta$  (Fig. 3A), IL-1 $\alpha$  (Fig. 3B), IL-23 (Fig. 3C), and IL-6 (Fig. 3D) remained low or undetectable in the supernatants of nonstimulated and LPS-stimulated M-CSF- and

IL-34 macrophages. In support of this, the supernatants of M-CSFand IL-34 macrophages failed to induce Th17 cells (Fig. 3E). In contrast, and as expected [21], these cytokines were produced by LPS-stimulated GM-CSF macrophages (Fig. 3A–D) and the supernatants of GM-CSF macrophages induced IL-17-producing cells (Fig. 3E).

Interestingly, paraformaldehyde (PFA) fixed M-CSF- and IL-34 macrophages remained as efficient as nonfixed cells in inducing Th17 cells (Fig. 3E), suggesting that they express membraneassociated Th17-inducing factor(s). In contrast to IL-1β, functional IL-1 $\alpha$  can be expressed at the cell surface [22]. Flow cytometry showed the constitutive expression of membrane IL-1 $\alpha$  (mIL-1 $\alpha$ ) on M-CSF- and IL-34 macrophages (Fig. 4A and B). This expression was not modulated by LPS (Fig. 4A). IL-34 and M-CSF upregulated, in a time-dependent manner, the expression of mIL-1 $\alpha$  during the differentiation of monocytes into macrophages, which was maximal at day 6 (Fig. 4C). In contrast, mIL-1a was poorly detectable on GM-CSF macrophages (Fig. 4A-C), supporting that fixation with PFA greatly reduced the ability of GM-CSF macrophages to induce Th17 cells (Fig. 3E). As expected [23], mIL-1 $\alpha$  was poorly expressed on freshly isolated monocytes and was upregulated by LPS (Fig. 4A).

# M-CSF- and IL-34 macrophages induce IL-17-producing T cells through mIL-1 $\alpha$

IL-1 has a central role in the generation of human Th17 cells [13, 24]. We observed that IL-1RA and a neutralizing anti-IL-1 $\alpha$  mAb prevented the M-CSF- and IL-34 macrophage induced switch of memory T cells into Th17 cells (Fig. 4D).

Given that (i) M-CSF- and IL-34 macrophages express membrane-bound IL-18, which is shed into a functional soluble form upon stimulation (Supporting Information Fig. 5 and [25]), and (ii) that IL-18 induces murine Th17 cells [26], we had to 6



Figure 3. The switch of memory T cells into IL-17-producing T cell induced by M-CSF-, IL-34 macrophages, and TAMs is dependent on membrane factor(s). (A-D) GM-CSF-, M-CSF-, IL-34 macrophages, and TAMs were stimulated or not with LPS for 24 h. The concentration of (A) IL-1 $\beta$ , (B) IL-1 $\alpha$ , (C) IL-23, and (D) IL-6 in the cell culture supernatants was measured by ELISA. (E) Memory CD4 $^+$  T cells were cultured with nonfixed or PFA-fixed LPSstimulated M-CSF macrophages, TAMs, or GM-CSF macrophages, or with the supernatants of stimulated macrophages. The frequency of IL-17-producing T cells was determined at day 7 by cytometry. (A–E) Data are shown as mean + SD and are pooled from six independent experiments. p < 0.005, Wilcoxon test.

evaluate whether IL-18 may also be involved in the M-CSF- and IL-34 macrophage induced Th17-cell conversion. A neutralizing anti-IL-18 mAb did not prevent M-CSF- and IL-34 macrophage induced Th17 cells (Fig. 4D). In support of this, IL-18, either alone or in combination with IL-1 $\beta$ , did not induce Th17 cells (Supporting Information Fig. 1B). It has been suggested that IL-6 may also favor IL-1b-induced IL-17 production [13, 27]. The ability of M-CSF- and IL-34 macrophages to induce Th17 cells was unaffected by neutralizing anti-IL-6 and anti-IL-1 $\beta$  mAbs (data not shown), a result in line with the fact that they produce low levels of IL-6 and IL-1 $\beta$ . In parallel, IL-1RA, but not a neutralizing anti-IL-1 $\alpha$  mAb, significantly prevented GM-CSF macrophage induced Th17 cells (Fig. 4D). Together, these results show that mIL-1 $\alpha$  is involved in the switch of memory T cells into Th17 cells induced by M-CSF- and IL-34 macrophages.

# TAMs from ovarian cancer induce the generation of IL-17-producing T cells via mIL-1 $\alpha$

We have previously reported that M-CSF- and IL-34 macrophages exhibit a phenotype similar to the one of TAMs isolated from ovarian cancer ascites [6, 7]. We thus evaluated the ability of TAMs to convert memory T cells into Th17 cells. Results showed that TAMs constitutively expressed mIL-1 $\alpha$  (Fig. 4A and B), did not produce detectable levels of IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-23, even after stimulation (Fig. 3A–C), and switched memory T cells into IL-17producing T cells (Fig. 1). Culture of memory T cells with PFA-fixed TAMs (Fig. 3E) or with nonfixed TAMs in the presence of IL-1RA or a neutralizing anti-IL-1 $\alpha$  mAb (Fig. 4D) confirmed the involvement of mIL-1 $\alpha$  in TAMs-induced Th17 cells. Although LPS-stimulated TAMs produced IL-6 (Fig. 3D), a neutralizing



**Figure 4.** The conversion of memory T cells into IL-17-producing T cells induced by M-CSF macrophages and TAMs is dependent on mIL-1 $\alpha$ . (A–C) GM-CSF-, M-CSF-, IL-34 macrophages, and TAMs were stimulated or not with LPS for 24 h. (A) Quantification of mIL-1 $\alpha$  was assessed by flow cytometry. (B) Representative dot plots of one of five independent experiments are shown. (C) mIL-1 $\alpha$  expression was analyzed by flow cytometry during the 6-day differentiation of GM-CSF-, M-CSF- and IL-34 macrophages. (A and C) Results are expressed as MFI values after subtraction of the MFI values obtained with the isotype control mAb. (D) Memory CD4<sup>+</sup> T cells were cultured with GM-CSF-, M-CSF macrophages, or TAMs in the presence of IL-1RA, polyclonal anti-IL-1 $\alpha$  Ab, or anti-IL-18 mAb. The frequency of IL-17-producing T cells was determined at day 7. Results are expressed as a percentage of decrease of IL-17-producing T cell frequency, as described in the Materials and methods. (A, C, D) Data are shown as mean  $\pm$  SD and are pooled from five independent experiments. \*p < 0.005, (A) Wilcoxon test or (C) two-way ANOVA.

anti-IL-6 mAb did not prevent the switch into Th17 cells (data not shown). Moreover, TAMs did not upregulate the percentage and absolute number of Th1 cells (Fig. 1F and G). Finally, these Th17 cells expressed CCR6, CCR4, and CD161, but not IL-10, FoxP3, and TGF- $\beta$  (Supporting Information Fig. 2). These results show that TAMs from ovarian cancer ascites favor the switch of memory CD4<sup>+</sup> T cells into Th17 cells via mIL-1 $\alpha$ .

#### Discussion

We demonstrate here that M-CSF and IL-34 give rise to human macrophages that constitutively express mIL-1 $\alpha$  in a similar manner than human TAMs isolated from ovarian cancer ascites. mIL-1 $\alpha$  is involved in the acquisition, by noncommitted memory T cells, of a conventional Th17-cell phenotype. These results evidence an ambivalent role of these macrophages, usually considered as immunosuppressive, which may contribute to maintain a smoldering inflammation by promoting locally Th17 cells.

Results showed that the increase in the frequency of IL-17producing cells induced by M-CSF- and IL-34 macrophages was more pronounced in non-Th17 IL-23R<sup>-</sup> CD161<sup>-</sup> CCR6<sup>-</sup> cells than in IL-23R<sup>+</sup> CD161<sup>+</sup> CCR6<sup>+</sup> Th17 cells. Even though we cannot exclude that the increase of Th17 cells induced by these macrophage subsets may result, in part, from the proliferation of Th17 cells, our data suggest that Th17 cells induced by M-CSF- and IL-34 macrophages result preferentially from the switch of non-Th17 cells into Th17 lymphocytes rather than from the marginal proliferation of already committed Th17 cells. This hypothesis is reinforced by the fact that M-CSF- and IL-34 macrophages inhibit the proliferation of memory T cells [6, 28], including human Th17-cell clones (EDF, SB, and PJ, personal observation). Different subsets of Th17 cells, expressing or not IL-10, have been described. IL-17-/IFN-gamma doublepositive T cells generated in the presence of M-CSF- and IL-34 macrophages express the Th17-associated markers RORc, IL-17A, CCR6, and CCR4, the Th1 lineage marker T-bet, and IL-21 that is involved in IL-17 production [29]. Moreover, these Th17 cells, whose induction is dependent on IL-1a, did not produce IL-10, even after restimulation. This result is in agreement with the fact that (i) the generation of IL-17-/IFN-gamma double-positive producing T cells is dependent on IL-1 [15] and (ii) that IL-1 irreversibly inhibits the production of IL-10 by Th17 cells [30]. Collectively, these data suggest that M-CSF- and IL-34 macrophage induced Th17 cells are similar to conventional Th17 cells [30] and to tumor-infiltrating Th17 cells in ovarian cancer [31].

mIL-1 $\alpha$  is expressed on several cell types, including myeloid cells [23, 32–36]. Surprisingly, the macrophage differentiation

7

factors M-CSF and IL-34, but not GM-CSF, give rise to human macrophages that constitutively express mIL-1 $\alpha$  (in the absence of stimulation). The membrane expression of IL-18, another member of the IL-1 family, is concomitantly observed on M-CSF- and IL-34 macrophages, but not on GM-CSF macrophages [25, 37], suggesting a common regulation of mIL-1 $\alpha$  and IL-18 expression. However, the outcome of the membrane forms of these two cytokines seems to differ. While stimulation with LPS induces the shedding of membrane IL-18 [25], LPS did not affect mIL-1 $\alpha$  expression nor induced soluble IL-1 $\alpha$  production by M-CSF- and IL-34 macrophages.

Through paracrine interactions, membrane IL-1 is involved in several processes, including inflammation [38] and antitumor immunity [39]. In this study, we revisit the impact of mIL-1 $\alpha$ expressed by macrophages on T cells and show that it promotes Th17-cell generation. IL-1 plays a pivotal role in the generation of human Th17 cells (reviewed in [13, 24]). IL-1 $\beta$  and IL-1 $\alpha$ , which signal via the same receptor, exhibit similar biological activities and both soluble IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  switch nonTh17-committed human memory T cells into Th17 cells with the same efficacy ([40] and EDF, SB, and PJ, personal observation). On the contrary, IL-1 does not polarize naive T cells into Th17 cells [18, 20, 41, 42]. We also failed to detect an effect of immunoregulatory macrophages on naive T-cell polarization into Th17 cells. Although a role of IL-18 in murine Th17-cell generation has been reported [26], we did not observe any effect of IL-18 on human Th17-cell induction. IL-23, in combination with IL-1β, induces Th17-cell survival and expansion [43, 44]. Although M-CSF-, IL-34 macrophages, and ovarian TAMs do not produce detectable levels of IL-23, even after LPS stimulation, they induced Th17 cells when fixed with PFA, suggesting that membrane molecules, other than IL-23, may contribute to Th17-cell survival. A recent study reported that a mouse macrophage subset exhibiting M2 characteristics also induce in vivo the generation of Th17 cells [45]. In addition to underlining their role in controlling T-cell phenotype, these results show that the biology of macrophages is more complicated than previously thought and that a macrophage subset may exhibit apparently opposite functions, that is suppression of T-cell mitosis and promotion of pro-inflammatory Th17 cells.

Moreover, given that M-CSF-, IL-34 macrophages, and ovarian TAMs exhibit immunoregulatory functions, we suspected that they could induce Treg cells, and not Th17 cells. One study showed an induction of Treg cells by M2 cells [46]. However, and supporting the implication of IL-2 and IL-15, which favor Treg-cell generation and dampen Th17-cell induction [47, 48], the generation of Treg cells induced by M2 cells was dependent on exogenous IL-2 and IL-15 [46].

IL-1 exhibits pro-inflammatory and pro-angiogenic properties, and increases tumor growth and metastasis [39, 49, 50]. The neutralization of IL-1 activity currently appears as a promising strategy to treat cancer [51, 52]. Blocking IL-1 activity reduces metastasis and angiogenesis in preclinical tumor models [49, 50, 53]. In numerous cancers, the expression of IL-1 is elevated and patients with IL-1-producing tumors have generally bad prognosis [39, 50, 54]. In the tumor microenvironment, it is thought that the

 ${\ensuremath{\mathbb C}}$  2014 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

IL-1 activity is mediated by IL-1 $\beta$  secreted by activated cells and by IL-1 $\alpha$  released from dying cells. The constitutive expression of functional mIL-1 $\alpha$  by ovarian cancer TAMs may thus contribute to the chronic inflammation associated to angiogenesis and metastasis. Based on this observation, neutralizing IL-1R could be more efficient than neutralizing IL-1 $\beta$  in cancer treatment.

The role and prognostic significance of Th17 cells in human cancer remain controversial [40, 55–57]. In established ovarian cancers, Th17 cells may support antitumor immunity [31, 58]. Among APCs present in ovarian tumor microenvironment, TAMs are the most efficient in inducing Th17 cells [31]. However, to date, the respective role of IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in TAMs-associated Th17-cell responses remained unexplored. Given (i) that TAMs express IL-1 $\beta$  mRNA, (ii) that IL-1 $\alpha$  was poorly detectable in ovarian ascites, and (iii) that an anti-IL-1R Ab inhibits TAMs-induced Th17 cells, it has been suggested that TAMs induce Th17 cells via IL-1 $\beta$  [31]. Our results evidence that mIL-1 $\alpha$ , rather than IL-1 $\beta$ , has a central role in TAMs-induced Th17 cells. Finally, we also report that TAMs-induced Th17 cells have a classical phenotype, similar to Th17 cells isolated from ovarian ascites [31].

In conclusion, this study demonstrates that, although immunoregulatory macrophages produce low levels of proinflammatory cytokines, they may locally induce a smoldering inflammation by favoring the switch of memory CD4<sup>+</sup> T cells into Th17 cells in a mIL-1 $\alpha$ -dependent manner.

### Materials and methods

#### Ethics statement

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained from healthy human volunteers (Blood collection center Angers, France; agreement ANG-2003-2). Ovarian cancer ascites were obtained with written informed consent, in accordance with the Angers University Hospital ethics committee requirements (No. 2013/38).

### Cell isolation

PBMCs and cells from ascite fluids were isolated with Lymphocyte Separation Medium (Eurobio, Courtaboeuf, France). CD14<sup>+</sup> monocytes and CD14<sup>+</sup> TAMs were isolated by positive magnetic sorting (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). CD4<sup>+</sup> T cells were sorted by negative depletion (Miltenyi Biotec) and T-cell subpopulations were then sorted by flow cytometry (FACS Aria; BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Memory CD45RO<sup>+</sup> and naive CD45RA<sup>+</sup> T cells were sorted from CD4<sup>+</sup> T cells using the combination of PerCP-labeled anti-CD4 (clone VIT4), Allophycocyanin-labeled anti-CD45RO (clone UCHL1), and Allophycocyanin-Vio770labeled anti-CD45RA (clone T6D11) Abs (all from Miltenyi Biotec). Non-Th17 IL-23R<sup>-</sup> CCR6<sup>-</sup> CD161<sup>-</sup> T cells and IL-23R<sup>+</sup> CCR6<sup>+</sup> CD161<sup>+</sup> Th17 cells [20, 28] were sorted from memory CD4<sup>+</sup> T cells using the combination of PE-labeled anti-IL-23R (R&D Systems, Friesoythe, Germany, clone 218213), PerCP-Cy5.5-labeled anti-CCR6 (clone 11A9), and Allophycocyaninlabeled anti-CD161 (clone DX12) Abs (both from BD Biosciences). Cell sorting strategy is schematized in Supporting Information Figure 4.

#### Macrophage subset generation

Monocytes were cultured in RPMI 1640 medium (Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with 10% FCS (PAA Laboratories, Pashing, Austria), and antibiotics (all from Lonza). M-CSF-, IL-34-, and GM-CSF macrophages were generated by culturing monocytes  $(1 \times 10^6 \text{ cells/mL})$  for 6 days with 50 ng/mL M-CSF (ORF Genetics, Kopavogur, Iceland), 50 ng/mL IL-34 (R&D Systems), or 20 ng/mL GM-CSF (CellGenix, Freiburg, Germany), respectively [6, 7]. In some experiments, day 6 macrophages were fixed with PBS containing 4% PFA. In other, macrophages were activated with 200 ng/mL LPS (*Escherichia coli* serotype O111:B4; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 24 or 48 h.

### **Coculture experiments**

Naive, memory, or IL-23R<sup>-</sup> CCR6<sup>-</sup> CD161<sup>-</sup> memory CD4<sup>+</sup> T cells  $(1 \times 10^5)$  were cultured in X-VIVO-20 medium (Lonza) in 96-well flat-bottomed plates coated with 1  $\mu$ g/mL anti-CD3 mAb (clone OKT3; BD Biosciences), without or with  $1 \times 10^4$  allogenic M-CSF-, IL-34-, GM-CSF macrophages, or TAMs for 7 days. In some experiments,  $10 \,\mu$ g/mL anti-IL-1 $\alpha$  polyclonal antibody, anti-IL-1 $\beta$  mAb or anti-IL-18 mAbs, or 1  $\mu g/mL$  IL-1RA (all from R&D Systems) were added in the culture. The culture of memory T cells with  $1 \mu g/mL$  soluble anti-CD28 mAb (BD Biosciences) supplemented with 50 ng/mL IL-23 (R&D Systems), 50 ng/mL IL-1β (Miltenyi Biotec), or IL-1α (Peprotech, Princeton, NJ, USA) (to favor the generation of conventional Th17 cells [13, 59]), or supplemented with 50 ng/mL IL-2 (Miltenyi Biotec) and IL-10 (Immunotools, Friesoythe, Germany) (to favor the generation of Tr1 cells [12, 15, 47]), were used as positive controls of memory T-cell differentiation. In some experiments, 200 ng/mL LPS was added in the coculture of macrophages and memory T cells. In others, T cells were cultured in the presence of cell culture supernatants from M-CSF-, IL-34-, or GM-CSF macrophages stimulated for 24 h with 200 ng/mL LPS.

### Quantitative RT-PCR analysis

Total RNA extraction and reverse transcription were performed as described [6]. The expression of the mRNA encoding IL17A, RORc, T-bet, CCR6, and IL21 was analyzed by quantitative RT-PCR at day 7 on M-CSF- or GM-CSF macrophage induced T cells and on conventional Th17 cells and Tr1 cells. Relative gene expression

)

was calculated using the  $E^{\Delta Ct}$  method with  $\Delta Ct$  values calculated from the sample with the largest Ct (fewest gene copies) and then normalized against the GAPDH (determined as the most stably expressed housekeeping gene using the geNorm method).

### Cytokine quantification

IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6 (Diaclone, Dijon, France), and IL-23 (eBioscience, San Diego, CA, USA) were quantified by ELISA.

#### Flow cytometry analysis

Monocytes, GM-CSF-, M-CSF-, and IL-34 macrophages were stimulated or not for 24 h with LPS before FACS analysis of mIL-1 $\alpha$ (using FITC anti-IL-1a mAb; R&D Systems). The intracellular expression of IL-17, IFN-gamma, IL-4, IL-10, and FoxP3 was evaluated by FACS on day 7 T cells, after a 5-h stimulation with 10 ng/mL PMA plus 1 nM ionomycin, in the presence of 10  $\mu$ g/mL of brefeldin A (all from Sigma-Aldrich). After fixation with PFA, cells were stained with the following conjugated antibodies: PE-Cy7-labeled anti-CCR4 (clone 1G1), PerCP-Cv5.5-labeled anti-CCR6 (clone 11A9), BV421-labeled anti-CD161 (clone DX12), FITC-labeled anti-IFN-gamma (clone B27) (all from BD Biosciences), AlexaFluor647-labeled anti-IL-17A Abs (clone eBio64DEC17, eBiosciences). Data were acquired using a FAC-SCantoII flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed with the FlowJo software, version 10.0.6 (Tree Star, Ashland, OR, USA). Results are expressed as mean fluorescence intensity (MFI) after subtraction of the value obtained with the isotype control mAb, in percentage or in absolute number of T-cell subsets. The percentage of decrease of IL-17-producing T-cell frequency was calculated as follows: (percentage of IL-17-producing T cells with isotype/control - percentage of IL-17-producing T cells with inhibitor)/percentage of IL-17-producing T cells with isotype/control.

#### Statistical analysis

Data were analyzed by the Wilcoxon or two-way ANOVA test, with p < 0.05 being considered significant.

Acknowledgments: This work was supported by institutional grants from INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale) and the University of Angers, and by a grant from La ligue Nationale contre le Cancer (Equipe labellisée 2012-2014). E.D.F. is supported by a grant from the French Ministry of Higher Education and Research. We thank members of the Blood collection Center of Angers for blood collection and

members of PACeM (Plateforme d'Analyse Cellulaire et Moléculaire; University of Angers) for technical assistance with the cell sorting and FACS analysis. We also sincerely acknowledge Dr. Nathalie Labarrière and Sylvain Simon (Inserm unit 892, CNRS unit 6299, Université de Nantes, Nantes, France) for helpful discussion on the biology of human T cells.

E.D.F., S.B., P.D., N.I., Y.D., and P.J. conceived and designed the experiments. E.D.F., S.B., and L.P. performed the experiments. E.D.F., S.B., Y.D., and P.J. wrote the paper.

**Conflict of interest:** The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

### References

- 1 Gordon, S. and Taylor, P. R., Monocyte and macrophage heterogeneity. Nat. Rev. Immunol. 2005. 5: 953–964.
- 2 Sica, A. and Mantovani, A., Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. J. Clin. Invest. 2012. **122**: 787–795.
- 3 Biswas, S. K. and Mantovani, A., Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. Nat. Immunol. 2010. 11: 889–896.
- 4 Lin, H., Lee, E., Hestir, K., Leo, C., Huang, M., Bosch, E., Halenbeck, R. et al., Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome. *Science* 2008. **320**: 807–811.
- 5 Verreck, F. A., de Boer, T., Langenberg, D. M., Hoeve, M. A., Kramer, M., Vaisberg, E., Kastelein, R. et al., Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2004. 101: 4560– 4565.
- 6 Foucher, E. D., Blanchard, S., Preisser, L., Garo, E., Ifrah, N., Guardiola, P., Delneste, Y. et al., IL-34 induces the differentiation of human monocytes into immunosuppressive macrophages. Antagonistic effects of GM-CSF and IFNgamma. PloS one 2013. 8: e56045.
- 7 Duluc, D., Delneste, Y., Tan, F., Moles, M. P., Grimaud, L., Lenoir, J., Preisser, L. et al., Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. Blood 2007. 110: 4319–4330.
- 8 O'Shea, J. J. and Paul, W. E., Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. Science 2010. 327: 1098-1102.
- 9 Kurotaki, D., Kon, S., Bae, K., Ito, K., Matsui, Y., Nakayama, Y., Kanayama, M. et al., CSF-1-dependent red pulp macrophages regulate CD4 T cell responses. J. Immunol. 2011. 186: 2229–2237.
- 10 Denning, T. L., Wang, Y. C., Patel, S. R., Williams, I. R. and Pulendran, B., Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nat. Immunol.* 2007. 8: 1086–1094.
- 11 Verreck, F. A., de Boer, T., Langenberg, D. M., van der Zanden, L. and Ottenhoff, T. H., Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma- and CD40L-mediated costimulation. *J. Leukoc. Biol.* 2006. **79**: 285–293.
- 12 Horwitz, D. A., Zheng, S. G. and Gray, J. D., The role of the combination of IL-2 and TGF-beta or IL-10 in the generation and function of CD4+ CD25+ and CD8+ regulatory T cell subsets. *J. Leukoc. Biol.* 2003. **74**: 471–478.
- © 2014 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

- 13 Wilson, N. J., Boniface, K., Chan, J. R., McKenzie, B. S., Blumenschein, W. M., Mattson, J. D., Basham, B. et al., Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat. Immunol.* 2007. 8: 950–957.
- 14 Zhao, F., Hoechst, B., Gamrekelashvili, J., Ormandy, L. A., Voigtlander, T., Wedemeyer, H., Ylaya, K. et al., Human CCR4+ CCR6+ Th17 cells suppress autologous CD8+ T cell responses. J. Immunol. 2012. 188: 6055– 6062.
- 15 Zielinski, C. E., Mele, F., Aschenbrenner, D., Jarrossay, D., Ronchi, F., Gattorno, M., Monticelli, S. et al., Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN-gamma or IL-10 and are regulated by IL-1beta. Nature 2012. 484: 514–518.
- 16 Chalmin, F., Mignot, G., Bruchard, M., Chevriaux, A., Vegran, F., Hichami, A., Ladoire, S. et al., Stat3 and Gfi-1 transcription factors control Th17 cell immunosuppressive activity via the regulation of ectonucleotidase expression. *Immunity* 2012. 36: 362–373.
- 17 Hoechst, B., Gamrekelashvili, J., Manns, M. P., Greten, T. F. and Korangy, F., Plasticity of human Th17 cells and iTregs is orchestrated by different subsets of myeloid cells. Blood 2011. 117: 6532–6541.
- 18 Romagnani, S., Maggi, E., Liotta, F., Cosmi, L. and Annunziato, F., Properties and origin of human Th17 cells. Mol. Immunol. 2009. 47: 3–7.
- 19 Boniface, K., Blumenschein, W. M., Brovont-Porth, K., McGeachy, M. J., Basham, B., Desai, B., Pierce, R. et al., Human Th17 cells comprise heterogeneous subsets including IFN-gamma-producing cells with distinct properties from the Th1 lineage. J. Immunol. 2010. 185: 679–687.
- 20 Cosmi, L., De Palma, R., Santarlasci, V., Maggi, L., Capone, M., Frosali, F., Rodolico, G. et al., Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor. J Exp Med2008.205: 1903–1916.
- 21 Fleetwood, A. J., Lawrence, T., Hamilton, J. A. and Cook, A. D., Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation. J. Immunol. 2007. 178: 5245–5252.
- 22 Kurt-Jones, E. A., Beller, D. I., Mizel, S. B. and Unanue, E. R., Identification of a membrane-associated interleukin 1 in macrophages. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1985. 82: 1204–1208.
- 23 Fettelschoss, A., Kistowska, M., LeibundGut-Landmann, S., Beer, H. D., Johansen, P., Senti, G., Contassot, E. et al., Inflammasome activation and IL-1beta target IL-1alpha for secretion as opposed to surface expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2011. 108: 18055–18060.
- 24 Mills, K. H., Dungan, L. S., Jones, S. A. and Harris, J., The role of inflammasome-derived IL-1 in driving IL-17 responses. J. Leukoc. Biol. 2013. 93: 489–497.
- 25 Bellora, F., Castriconi, R., Doni, A., Cantoni, C., Moretta, L., Mantovani, A., Moretta, A. et al., M-CSF induces the expression of a membrane-bound form of IL-18 in a subset of human monocytes differentiating in vitro toward macrophages. *Eur. J. Immunol.* 2012. **42**: 1618–1626.
- 26 Conforti-Andreoni, C., Spreafico, R., Qian, H. L., Riteau, N., Ryffel, B., Ricciardi-Castagnoli, P. and Mortellaro, A., Uric acid-driven Th17 differentiation requires inflammasome-derived IL-1 and IL-18. *J. Immunol.* 2011. 187: 5842–5850.
- 27 Acosta-Rodriguez, E. V., Napolitani, G., Lanzavecchia, A. and Sallusto, F., Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. Nat. Immunol. 2007. 8: 942–949.
- 28 Corvaisier, M., Delneste, Y., Jeanvoine, H., Preisser, L., Blanchard, S., Garo, E., Hoppe, E. et al., IL-26 is overexpressed in rheumatoid arthritis and induces proinflammatory cytokine production and Th17 cell generation. PLoS Biol. 2012. 10: e1001395.

11 🖊

- 29 Wei, L., Laurence, A., Elias, K. M. and O'Shea, J. J., IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner. J. Biol. Chem. 2007. 282: 34605–34610.
- 30 Sallusto, F., Zielinski, C. E. and Lanzavecchia, A., Human Th17 subsets. Eur. J. Immunol. 2012. 42: 2215–2220.
- 31 Kryczek, I., Banerjee, M., Cheng, P., Vatan, L., Szeliga, W., Wei, S., Huang, E. et al., Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood* 2009. 114: 1141–1149.
- 32 Weaver, C. T. and Unanue, E. R., T cell induction of membrane IL 1 on macrophages. J. Immunol. 1986. 137: 3868–3873.
- 33 Labadia, M., Faanes, R. B. and Rothlein, R., Role of adherence vs. spreading in the induction of membrane-associated interleukin-1 on mouse peritoneal macrophages. J. Leukoc. Biol. 1990. 48: 420–425.
- 34 Orjalo, A. V., Bhaumik, D., Gengler, B. K., Scott, G. K. and Campisi, J., Cell surface-bound IL-1alpha is an upstream regulator of the senescenceassociated IL-6/IL-8 cytokine network. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2009. 106: 17031–17036.
- 35 Dinarello, C. A., Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. Blood 1991.
  77: 1627–1652.
- 36 Kaplanski, G., Farnarier, C., Kaplanski, S., Porat, R., Shapiro, L., Bongrand, P. and Dinarello, C. A., Interleukin-1 induces interleukin-8 secretion from endothelial cells by a juxtacrine mechanism. Blood 1994. 84: 4242–4248.
- 37 Dinarello, C. A., Membrane interleukin-18 revisits membrane IL-1alpha in T-helper type 1 responses. *Eur. J. Immunol.* 2012. **42**: 1385–1387.
- 38 Niki, Y., Yamada, H., Seki, S., Kikuchi, T., Takaishi, H., Toyama, Y., Fujikawa, K. et al., Macrophage- and neutrophil-dominant arthritis in human IL-1 alpha transgenic mice. J. Clin. Invest. 2001. 107: 1127–1135.
- 39 Voronov, E., Dotan, S., Krelin, Y., Song, X., Elkabets, M., Carmi, Y., Rider, P. et al., Unique versus redundant functions of IL-1alpha and IL-1beta in the tumor microenvironment. Front Immunol. 2013. 4: 177.
- 40 Miyahara, Y., Odunsi, K., Chen, W., Peng, G., Matsuzaki, J. and Wang, R. F., Generation and regulation of human CD4+ IL-17-producing T cells in ovarian cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2008. 105: 15505–15510.
- 41 Liu, H. and Rohowsky-Kochan, C., Regulation of IL-17 in human CCR6+ effector memory T cells. J. Immunol. 2008. 180: 7948–7957.
- 42 van Beelen, A. J., Zelinkova, Z., Taanman-Kueter, E. W., Muller, F. J., Hommes, D. W., Zaat, S. A., Kapsenberg, M. L. et al., Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. *Immunity* 2007. 27: 660–669.
- 43 Sutton, C. E., Lalor, S. J., Sweeney, C. M., Brereton, C. F., Lavelle, E. C. and Mills, K. H., Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity* 2009. **31**: 331–341.
- 44 Muranski, P. and Restifo, N. P., Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. Blood 2013. **121**: 2402–2414.
- 45 Tatano, Y., Shimizu, T. and Tomioka, H., Unique macrophages different from M1/M2 macrophages inhibit T cell mitogenesis while upregulating Th17 polarization. Sci. Rep. 2014. 4: 4146.
- 46 Savage, N. D., de Boer, T., Walburg, K. V., Joosten, S. A., van Meijgaarden, K., Geluk, A. and Ottenhoff, T. H., Human anti-inflammatory

macrophages induce Foxp3+ GITR+ CD25+ regulatory T cells, which suppress via membrane-bound TGFbeta-1. J. Immunol. 2008. **181**: 2220–2226.

- 47 Banchereau, J., Pascual, V. and O'Garra, A., From IL-2 to IL-37: the expanding spectrum of anti-inflammatory cytokines. Nat. Immunol. 2012. 13: 925–931.
- 48 Martinez, G. J., Nurieva, R. I., Yang, X. O. and Dong, C., Regulation and function of proinflammatory TH17 cells. Ann. N Y Acad. Sci. 2008. 1143: 188–211.
- 49 Voronov, E., Shouval, D. S., Krelin, Y., Cagnano, E., Benharroch, D., Iwakura, Y., Dinarello, C. A. et al., IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2003. 100: 2645–2650.
- 50 Lewis, A. M., Varghese, S., Xu, H. and Alexander, H. R., Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment. J. Transl. Med. 2006. 4: 48.
- 51 Dinarello, C. A., Why not treat human cancer with interleukin-1 blockade? *Cancer Metastasis Rev.* 2010. **29**: 317–329.
- 52 Ghiringhelli, F., Bruchard, M. and Apetoh, L., Immune effects of 5fluorouracil: ambivalence matters. Oncoimmunology 2013. 2: e23139.
- 53 Bruchard, M., Mignot, G., Derangere, V., Chalmin, F., Chevriaux, A., Vegran, F., Boireau, W. et al., Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth. Nat. Med. 2013. 19: 57–64.
- 54 Carmi, Y., Rinott, G., Dotan, S., Elkabets, M., Rider, P., Voronov, E. and Apte, R. N., Microenvironment-derived IL-1 and IL-17 interact in the control of lung metastasis. *J. Immunol.* 2011. **186**: 3462–3471.
- 55 Martin, F., Apetoh, L. and Ghiringhelli, F., Controversies on the role of Th17 in cancer: a TGF-beta-dependent immunosuppressive activity? *Trends Mol. Med.* 2012. 18: 742–749.
- 56 Greten, T. F., Zhao, F., Gamrekelashvili, J. and Korangy, F., Human Th17 cells in patients with cancer: friends or foe? Oncoimmunology 2012. 1: 1438–1439.
- 57 Ji, Y. and Zhang, W., Th17 cells: positive or negative role in tumor? Cancer Immunol. Immunother 2010. 59: 979–987.
- 58 Zou, W. and Restifo, N. P., T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy. Nat. Rev. Immunol. 2010. 10: 248–256.
- 59 Mills, K. H., Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. Eur. J. Immunol. 2008. **38**: 2636–2649.

Abbreviations: mIL-1 $\alpha$ : membrane IL-1 $\alpha$  · PFA: paraformaldehyde · TAMs: tumor-associated macrophages

Full correspondence: Dr. Pascale Jeannin, UMR Inserm 892-CNRS 6299, IBS-IRIS, CHU Angers, 4, rue Larrey, 49933 Angers, France e-mail: pascale.jeannin@univ-angers.fr

Received: 27/2/2014 Revised: 8/12/2014 Accepted: 19/12/2014 Accepted article online: 26/12/2014

# European Journal of Immunology

# Supporting Information for DOI 10.1002/eji.201444606

Etienne D. Foucher, Simon Blanchard, Laurence Preisser, Philippe Descamps, Norbert Ifrah, Yves Delneste and Pascale Jeannin

IL-34- and M-CSF-induced macrophages switch memory T cells into Th17 cells via membrane IL-1 $\!\alpha$ 



**Supporting information Figure 1.** Effect of M-CSF- and GM-CSF-macrophages and of IL-18 on the expression of IL-17 by naive and memory human  $CD4^+$  T cells. (A)  $CD45RO^+$   $CD45RA^-$  memory and  $CD45RA^+$   $CD45RO^-$  naive T cells were cultured for 7 days with GM-CSF- or M-CSF-macrophages. (B)  $CD45RO^+$   $CD45RA^-$  memory T cells were cultured for 7 days with anti-CD28 mAb plus IL-18, without or with IL-1 $\beta$  and IL-23, or with anti-CD28 mAb plus IL-1 $\beta$  and IL-23 (used as a positive control of IL-17 production; Wilson N. J et al. *Nat Immunol.* 2007;8:950-957). (A&B) The frequency of Th17 cells was determined by FACS (intracellular staining); results are expressed as a frequency of IL-17-producing cells (mean  $\pm$  SEM, n=4).



**Supporting information Figure 2.** FACS histograms of IL-17-expressing T cells. (A) CD45RO<sup>+</sup> CD45RA<sup>-</sup> memory T cells were cultured for 7 days with GM-CSF- or M-CSF-macrophages. The expression of CCR4 and CCR6 was analyzed by FACS on IL-17<sup>+</sup> T cells or on IFN-g<sup>+</sup> IL-17<sup>-</sup> T cells induced by GM-CSF- or M-CSF-macrophages, and compared to conventional Th17 cells (generated by culturing memory T cells with anti-CD28 mAb plus IL-1 $\beta$  and IL-23; Wilson N. J et al. *Nat Immunol.* 2007;8:950-957). Representative histograms of one of five independent experiments are shown. (B) Intracellular expression of IL-10 and FoxP3 was determined on GM-CSF-macrophage- or M-CSF-macrophage-induced T cells compared to the expression in Tr1 cells (generated by culturing memory T cells with anti-CD28 mAb plus IL-10; Horwitz et al. *J Leukoc Biol* 2003. 74:471) and Treg cells (isolated from healthy subjects); representative histograms of one of five independent experiments are shown.



**Supporting information Figure 3.** M-CSF-macrophages do not induce the generation of regulatory T cells. After 7 days culture with GM-CSF- or M-CSF-macrophages, the intracellular expression of IL-10 (using PE anti-IL-10 mAb; clone JES3-907, eBiosciences) (A) and FoxP3 (using PE anti-FoxP3 mAb; clone PCH101, eBiosciences) (B) was analyzed by flow cytometry in memory CD4<sup>+</sup> T cells. The expression was compared to the one of T cells maintained in culture without macrophage (none) and by in vitro generated Tr1 cells (generated by culturing memory T cells with anti-CD28 mAb plus IL-2 and IL-10; Horwitz et al. *J Leukoc Biol* 2003. 74:471) (A), and to the frequency of natural Treg present in human memory CD4<sup>+</sup> T cells from healthy subjects (B). Data are shown as mean  $\pm$  SD, (n=3); \*p<0.005, Wilcoxon test.



**Supporting information Figure 4.** Schematic representation of the isolation procedure of non Th17 memory T cells. (A-C) Human CD4<sup>+</sup> T cells were isolated from PBMC using a CD4 isolation kit (Miltenyi Biotech). CD45RO<sup>+</sup> CD45RA<sup>-</sup> memory T cells and CD45RO<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> naive T cells were then isolated from CD4<sup>+</sup> T cells by FACS sorting. Non Th17-committed IL-23R<sup>-</sup> CD161<sup>-</sup> CCR6<sup>-</sup> (Liu et al. J Immunol 2008. 180:7948-7957; Cosmi et al. J Exp Med 2008. 205:1903-1916) were isolated from CD45RO<sup>+</sup> CD45RA<sup>-</sup> memory T cells by a two-step FACS sorting (isolation of IL-23R<sup>-</sup> T cells followed by isolation of CCR6<sup>-</sup> CD161<sup>-</sup> T cells). This strategy allowed isolating pure IL-23R<sup>-</sup> CCR6<sup>-</sup> CD161<sup>-</sup> CD45RO<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells (purity routinely >98%) (A). (B&C) The expression of the mRNA encoding RORc (B) and IL-17A (C) was analyzed by RT-qPCR in IL-23R<sup>-</sup> CCR6<sup>-</sup> CD161<sup>-</sup> memory T cells and CCR6<sup>+</sup> CD161<sup>+</sup> memory T cells. Results are expressed as a level of mRNA expression normalized to GAPDH (mean ± SEM, n=4); \*p<0.005, Wilcoxon test. (D) The expression of IL-17 by IL-23R<sup>-</sup> CCR6<sup>-</sup> CD161<sup>-</sup> and IL-23R<sup>+</sup> CCR6<sup>+</sup> CD161<sup>+</sup> memory T cells was analyzed by FACS after a 4 h stimulation with 10 ng/mL PMA plus 1 nM ionomycin. Dot plots are representative of one of 4 independent experiments.



Supporting information Figure 5. M-CSF- and IL-34-macrophages constitutively express membrane IL-18. *Left panel*, monocytes, GM-CSF-, M-CSF- and IL-34-macrophages were stimulated or not with LPS for 24 h and the expression of membrane IL-18 (using anti-IL-18 mAb; clone 125-2H, MBL, Woburn, MA) was analyzed by FACS. Results are expressed in MFI values (mean  $\pm$  SD, n=5); \*p<0.005, Wilcoxon test. *Right panels*, representative histograms of one out of five separate experiments.

## Discussion

Nous avons montré que le M-CSF et l'IL-34 induisent la différenciation de monocytes en macrophages immunorégulateurs qui expriment constitutivement l'IL-1 $\alpha$  en membrane, de manière similaire aux TAM isolés d'ascites de cancer de l'ovaire. L'IL-1 $\alpha$  membranaire est impliquée dans l'acquisition d'un phénotype Th17 par les lymphocytes T mémoires non encore engagés dans une voie de différenciation Th17. Cette observation démontre un rôle ambivalent de ces sous-populations de macrophages, habituellement considérés comme immunosuppresseurs, mais qui pourraient également contribuer à maintenir une inflammation à bas bruit via la génération de lymphocytes Th17.

# 1- L'IL-34 et le M-CSF agissent de manière similaire sur la différenciation des monocytes en macrophages

L'IL-34 agit via le M-CSF-R et favorise la survie des monocytes humains [197,198]. Différentes observations suggèrent que l'IL-34 et le M-CSF pourraient avoir des rôles non-redondants et complémentaires. En effet, il a été suggéré que le M-CSF et l'IL-34 pourrait moduler différemment la production de cytokines par les monocytes [197].

A l'initial de cette étude, le phénotype des cellules myéloïdes humaines exposées à l'IL-34 était inconnu.

Nous avons montré que l'IL-34 induit la différenciation des monocytes en macrophages immunosuppresseurs avec un phénotype semblable à celui induit par le M-CSF et à celui des TAM isolés du cancer de l'ovaire. Les études précédentes ont indiqué que les M1 et les M2 présentent différents profils d'expression des chimiokines et des récepteurs aux chimiokines. Nous avons observé que les IL-34-Mφ et les M-CSF-Mφ sont identiques, basés sur l'expression de chimiokines et de récepteurs aux chimiokines sélectionnées. De manière intéressante, les GM-CSF-Mφ expriment plus fortement les chimiokines CCL1, CCL17, CCL22, CCL24 et CX3CL1, et les récepteurs CCR2 et CXCR1, que les IL-34-Mφ et M-CSF-Mφ. Ces molécules peuvent constituer, en plus des marqueurs fiables IL-10 et IL-12, une signature moléculaire pouvant distinguer les M1 des M2.

Nos résultats soutiennent également le fait que l'IL-34 soit aussi efficace que le M-CSF en induisant la survie/prolifération des monocytes humains et la formation de CFU-M [198]. Ainsi, avec l'appui de nos résultats prouvant que l'IL-34 agit de façon similaire que le M-CSF sur la différenciation des monocytes humains, d'autres études ont montré que l'IL-34 peut aussi remplacer le M-CSF dans la différenciation en ostéoclastes [203,204].

Bien que nos résultats n'excluent pas l'existence d'un autre récepteur pour l'IL-34, distinct du M-CSF-R, comme précédemment suspecté [202,274], nous démontrons, en accord avec d'autres [197,198], que l'effet de l'IL-34 sur les monocytes humains est médié par l'intermédiaire du M-CSF-R.

De plus, nous rapportons que l'IL-34 agit sur les monocytes indépendamment du M-CSF endogène. Réciproquement, bien que les monocytes humains expriment l'ARNm de l'IL-34, nous n'avons pas détecté de sécrétion d'IL-34 par des monocytes en réponse au M-CSF, suggérant que le M-CSF peut également agir indépendamment de l'IL-34 endogène.

En conclusion, l'IL-34 et le M-CSF ont des effets similaires, indépendamment l'un de l'autre, sur la différenciation des monocytes en macrophages immunosuppresseurs via le CD115.

## *a) Perspectives : Etude du phénotype des macrophages humains dans différentes conditions environnementales rencontrés au sein de la tumeur*

D'une part, au regard des études réalisées sur les « immunes checkpoints » sur les lymphocytes et leur importance dans l'immunothérapie anti-tumorale, il serait intéressant d'analyser la modulation de l'expression de molécules de co-inhibition et/ou de co-stimulation par les différents sous-types de macrophages ainsi que par des TAM isolés de tumeurs et leurs rôles sur les lymphocytes T.

D'autre part, dans un contexte tumoral, les macrophages sont exposés à différents facteurs du microenvironnement. Il serait donc intéressant d'analyser l'effet de facteurs métaboliques, comme l'hypoxie et l'acide lactique, sur la production de M-CSF et/ou d'IL-34 par les macrophages ou les lymphocytes T et sur la différenciation des monocytes en macrophages en présence de M-CSF, d'IL-34 ou de GM-CSF.

# 2- Analyse de la présence d'IL-34 et/ou de M-CSF dans différents tissus tumoraux

### a) Les IL-34-Mø et les M-CSF-Mø sont similaires aux TAM isolés du cancer de l'ovaire

Les TAM s'accumulent dans diverses tumeurs solides, et, dans la plupart d'entre elles, leur densité est corrélée avec un mauvais pronostic [191,192,213]. En plus des propriétés immunosuppressives, les TAM sont trophiques pour les tumeurs et favorisent l'angiogenèse, la dissolution des tissus conjonctifs et les métastases [191-193,213].

Nous rapportons que l'IL-34 induit la génération de macrophages présentant un phénotype et des fonctions semblables aux TAM du cancer de l'ovaire [213]. Dans des expériences supplémentaires, nous avons également observé que les IL-34-M $\phi$  expriment autant de TGF $\beta$ , de MMP9, et de VEGF que les M-CSF-M $\phi$ . Les TAM dérivent des monocytes circulants qui se différencient localement en M2 en réponse au microenvironnement tumoral tels que le M-CSF et l'IL-6 [213].

Récemment, des études ont montré, dans le cancer du sein, que des drogues anti-tumorales induisent la production d'IL-34 et de M-CSF par les cellules épithéliales mammaires, suggérant que, dans certaines circonstances, les stratégies thérapeutiques peuvent favoriser l'échappement tumoral [275].

Basé sur nos résultats, nous pouvons spéculer que, dans ces organes, l'IL-34, plutôt que le M-CSF, pourrait contribuer à la génération de macrophages M2 immunosuppresseurs, capables de contrôler l'inflammation et de favoriser la réparation de tissus ou de participer aux pathologies impliquant les macrophages.

## b) Expression différentielle de l'IL-34 et du M-CSF

Les ARNm de l'IL-34 et du M-CSF sont exprimés dans différents tissus et des différences dans leur expression spatio-temporelle ont été rapportées [195,196,202,274]. Il n'a été observé aucune expression compensatoire de l'ARNm de l'IL-34 chez les souris déficientes en M-CSF [202]. Ces deux observations suggèrent que l'IL-34 et le M-CSF ont des rôles complémentaires et indépendants. Notamment, les niveaux d'expression d'ARNm d'IL-34 sont plus élevés que ceux du M-CSF dans la peau, les glandes salivaires, et dans la plupart des compartiments du cerveau [202,276,277].

## c) Perspectives : analyse de l'expression de l'IL-34 et M-CSF dans différentes tumeurs humaines

Basé sur ces observations, il semble crucial d'analyser, dans diverses tumeurs, l'expression relative du M-CSF et de l'IL-34 par les cellules tumorales et les cellules du stroma, afin (i) de déterminer si l'IL-34 et/ou le M-CSF participent à l'immunosuppression dans tout type de tumeur et (ii) de préciser les rôles relatifs de l'IL-34

et du M-CSF dans les tumeurs qui les expriment. Ce dernier travail est en cours de réalisation, par l'analyse par immunohistochimie de l'expression de l'IL-34 et du M-CSF dans de nombreuses tumeurs notamment le cancer du sein et le mésothéliome afin d'identifier une signature IL-34 et/ou M-CSF en comparaison avec les tissus sains et par la suite d'analyser les TAM présents dans ces tumeurs.

## 3- Expression et impact de l'IL-1 dans le cancer

### a) Propriétés de l'IL-1 dans le cancer et l'induction de lymphocytes Th17

D'une part, l'IL-1 possède des propriétés pro-inflammatoires et pro-angiogéniques, accélère la croissance tumorale et l'apparition de métastases [278]. Dans de nombreux cancers, l'expression de l'IL-1 est élevée et les patients ayant des tumeurs productrices d'IL-1 ont un pronostic défavorable [278,279]. La neutralisation de l'activité de l'IL-1 semble être actuellement une stratégie prometteuse pour traiter le cancer [280,281]. Bloquer l'activité de l'IL-1 réduit les métastases et l'angiogénèse dans des modèles précliniques de tumeurs [279,282].

D'autre part, l'IL-1 joue un rôle pivot dans la génération des cellules Th17 humaines [283,284]. L'IL-1 $\beta$  et l'IL-1 $\alpha$ , qui se fixent sur le même récepteur, présentent les mêmes activités biologiques et les deux polarisent avec la même efficacité des lymphocytes humains non-Th17 en lymphocytes Th17 [285,286]. Au contraire, l'IL-1 ne polarise pas les lymphocytes T naïfs en lymphocytes Th17 [287-290].

### b) Expression de l'IL-1a membranaire

L'IL-1 $\alpha$  membranaire a été rapportée comme étant exprimée par différents types cellulaires, incluant des cellules myéloïdes (monocytes [284] et cellules dendritiques humaines [291], macrophages murins [292]) et des cellules non-immunitaires (fibroblastes sénescents [293], cellules endothéliales [291]). Son expression est induite par des signaux de danger tels que le LPS.

De façon surprenante, et contrairement au GM-CSF, les facteurs de différenciation macrophagique M-CSF et IL-34 génèrent des macrophages qui expriment à leur membrane l'IL-1 $\alpha$ . L'expression membranaire de l'IL-18, un autre membre de la famille de l'IL-1, est observée dans le même temps sur les M-CSF-M $\phi$  et IL-34-M $\phi$ , mais pas sur les GM-CSF-M $\phi$  [294,295], suggérant une régulation commune de l'expression membranaire de l'IL-1 $\alpha$  et de l'IL-18. L'insertion de l'IL-1 $\alpha$  dans la membrane plasmique requiert la myristoylation de son précurseur, la pro-IL-1 $\alpha$  [296]. Un site potentiel de myristoylation sur le précurseur de l'IL-18 a été suspecté, mais son implication dans l'insertion membranaire reste incertaine [294]. Cependant, le devenir des formes membranaires de ces deux cytokines semble diverger puisqu'une stimulation au LPS induit le clivage de l'IL-18 membranaire sur les M-CSF-M $\phi$  et IL-34-M $\phi$  [295]. Bien qu'un rôle de l'IL-18 sur la génération de lymphocytes Th17 murins ait été rapporté [297], nous n'avons observé aucun effet de la forme membranaire ou soluble de l'IL-18 sur la génération de lymphocytes Th17 humains.

### c) Rôles de l'IL-1a membranaire

Par des interactions paracrines, l'IL-1 $\alpha$  membranaire est aussi impliquée dans plusieurs processus, y compris l'inflammation [298] et l'immunité anti-tumorale [278].

Dans cette étude, nous revisitons l'impact de l'IL-1 $\alpha$  membranaire exprimée par des macrophages sur la polarisation des lymphocytes T et prouvons qu'elle favorise la génération de lymphocytes Th17. Les résultats montrent que les M-CSF-M $\phi$  et des IL-34-M $\phi$  polarisent les lymphocytes T mémoires en lymphocytes

produisant de l'IL-17. Bien que nous ne puissions exclure que l'augmentation des lymphocytes Th17 induite par ces sous-types de macrophage peut résulter, en partie, de la prolifération des lymphocytes Th17, nos données suggèrent que les lymphocytes Th17 induits par les M-CSF-M $\phi$  et les IL-34-M $\phi$  proviennent préférentiellement de la polarisation des lymphocytes non-Th17 en lymphocytes Th17 plutôt que de la prolifération des lymphocytes Th17 préexistants. Cette hypothèse est renforcée par le fait que les M-CSF-M $\phi$ et les IL-34-M $\phi$  empêchent la prolifération des lymphocytes T mémoires [299,300], y compris des clones humains Th17 (données personnelles non publiées). De plus, l'IL-23, en combinaison avec l'IL-1 $\beta$ , induit la survie et l'expansion des lymphocytes Th17 [301]. Bien que les M-CSF-M $\phi$ , IL-34-M $\phi$  et TAM du cancer de l'ovaire ne produisent pas de quantité détectable d'IL-23, et ce même après stimulation au LPS, ils induisent la génération de lymphocytes Th17 quand ils sont fixés au PFA, ce qui suggère que des molécules membranaires autres que l'IL-23 pourraient contribuer à la survie des lymphocytes Th17.

### d) Induction de lymphocytes Th17 par les TAM via l'IL-1a membranaire

Au niveau du microenvironnement tumoral, la théorie actuelle veut que l'activité de l'IL-1 soit fonction de l'IL-1 $\beta$  sécrétée par les cellules activées, soit par l'IL-1 $\alpha$  libérée par les cellules mourantes. En effet, parmi les CPA présentes dans le microenvironnement du cancer ovarien, les TAM sont les plus efficaces pour induire les lymphocytes Th17 [49]. Jusqu'à présent, le rôle respectif de l'IL-1 $\alpha$  et de l'IL-1 $\beta$  dans l'induction de lymphocytes Th17 par les TAM était encore mal connu. Des études ont suggéré que, étant donné que (i) les TAM expriment l'ARNm de l'IL-1 $\beta$ , (ii) que l'IL-1 $\alpha$  est peu exprimée dans l'ascite du cancer de l'ovaire, et (iii) qu'un anticorps anti-IL-1R empêche la génération de lymphocytes Th17 induite par les TAM, les TAM induisent la génération de lymphocytes Th17 par l'intermédiaire de l'IL-1 $\beta$  [49].

Cependant, nos résultats démontrent que l'IL-1 $\alpha$  membranaire, plutôt que l'IL-1 $\beta$ , a un rôle central dans la génération des lymphocytes Th17 induits par les TAM. Nous rapportons également que les cellules Th17 induites par les TAM ont un phénotype classique et semblable aux lymphocytes Th17 isolés dans l'ascite ovarien.

### e) Perspectives : Neutralisation de l'IL-1.

Ainsi, les TAM, habituellement considérés comme immunosuppresseurs, peuvent contribuer à maintenir une inflammation à bas bruit en favorisant localement les lymphocytes Th17 qui potentialise l'immunosuppression. D'une part, l'expression constitutive et fonctionnelle de l'IL-1 $\alpha$  membranaire par les TAM du cancer de l'ovaire pourrait donc contribuer à l'inflammation chronique associée à l'angiogénèse et aux métastases. D'autre part, elle participe à l'immunosuppression en recrutant des cellules immunitaires par l'intermédiaire de la génération de lymphocytes Th17 puis les cellules recrutées seront inhibées (anergie) ou polarisées en cellules immunosuppressives via les facteurs du microenvironnement (IL-10).

Fort de ces observations, la neutralisation du récepteur à l'IL-1 pourrait être plus efficace que la neutralisation de l'IL-1 $\beta$  dans le traitement du cancer.

## 4- Rôles controversés des lymphocytes Th17

Le rôle des lymphocytes Th17 dans le cancer humain demeurent controversés [286,302-304]. Dans le cancer de l'ovaire, les lymphocytes Th17 peuvent soutenir l'immunité anti-tumorale [49,107]. Par ailleurs, il a été décrit un rôle pro-tumoral des lymphocytes Th17 dans certaines tumeurs. Différents sous-types de

lymphocytes Th17, qui produisent de l'IL-10 ou qui expriment à leur surface du TGF $\beta$ , ont été décrits [116,305].

### a) Phénotype conventionnel des lymphocytes Th17 générés par les M-CSF-Mø et les IL-34-Mø

Nos résultats montrent que les lymphocytes T IL-17<sup>+</sup>/IFN $\gamma^+$  induits par les M-CSF-M $\phi$  et les IL-34-M $\phi$  expriment les marqueurs de lymphocytes Th17 conventionnels tels que RORc, CCR6, et CCR4, le marqueur des lymphocytes Th1 T-bet, et l'IL-21 qui est impliquée dans la production d'IL-17. Les lymphocytes induits n'expriment pas les marqueurs de lymphocytes T immunosuppresseurs (CD39, CD73, TGF $\beta$ , CTLA-4, FoxP3) [306]. D'ailleurs, ces lymphocytes Th17, dont l'induction dépend de l'IL-1 $\alpha$ , ne produisent pas d'IL-10, même après restimulation. Ce résultat est en accord avec le fait que (i) la génération des lymphocytes T IL-17<sup>+</sup>/IFN $\gamma^+$  est dépendante de l'IL-1 [305] et (ii) que l'IL-1 empêche de façon irréversible la production d'IL-10 par les lymphocytes Th17 [307].

Collectivement, ces données suggèrent que les lymphocytes Th17 induits par les M-CSF-M $\phi$  et les IL-34-M $\phi$  sont semblables aux lymphocytes Th17 conventionnels [307] et aux lymphocytes Th17 infiltrant la tumeur dans le cancer de l'ovaire [49].

Néanmoins, il serait nécessaire de réaliser une analyse fonctionnelle des lymphocytes Th17 générés par les M-CSF-M $\phi$  et les IL-34-M $\phi$  et des lymphocytes Th17 infiltrant la tumeur ou dans les ascites ovariens afin de définir leur rôle pro- ou anti- tumoral notamment l'effet sur l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>.

### b) Limites de l'étude

Etant donné que les M-CSF-M $\phi$ , IL-34-M $\phi$  et TAM du cancer de l'ovaire présentent des fonctions immunorégulatrices, une hypothèse séduisante était qu'ils favoriseraient la génération de lymphocytes Treg. Ainsi, une étude a montré une induction de lymphocytes Treg par des macrophages de type M2 [308]. Corroborant l'implication de l'IL-2 et de l'IL-15, qui favorisent la génération des lymphocytes Treg et atténuent l'induction de lymphocytes Th17 [309], cette étude montre que les macrophages M2 induisent la génération de lymphocytes Treg fortement immunosuppresseurs, seulement en présence d'IL-2 et d'IL-15 exogène [308,310]. Ces différents résultats montrent les limites apportées par le modèle et le protocole utilisés. Dans notre cas, de par le rôle de l'IL-2 sur la génération des lymphocytes Treg [81,309], nous ne voulions pas ajouter de facteurs favorisant une population de lymphocyte T, afin d'identifier le rôle propre des TAM dans la polarisation des lymphocytes T.

# *c) Perspectives : Etude du devenir des lymphocytes Th17 induits dans un modèle favorisant la génération des lymphocytes Treg*

De par la plasticité des lymphocytes T et le lien entre les lymphocytes Th17 et Treg, il serait donc intéressant d'évaluer la polarisation des lymphocytes T mémoires par les M-CSF-M $\phi$ , IL-34-M $\phi$  et les TAM soit (i) en présence d'IL-2 ou d'IL-15, soit (ii) en utilisant des « transwell » afin de voir l'effet des cytokines sécrétées par les TAM (IL-10). Il serait également intéressant d'analyser la polarisation des lymphocytes T mémoires au cours du temps avec, par exemple, une génération de lymphocytes Th17 dans un premier temps puis une polarisation des lymphocytes Th17 en lymphocytes Treg plus tardivement. Cette dernière hypothèse pourrait expliquer le lien entre les lymphocytes Th17 et Treg décrits dans la littérature.

## 5- Immunothérapie anti-tumorale envisagée

## a) Le GM-CSF et l'IFNy inhibent les macrophages M2

Alors que les macrophages M2 maintiennent l'homéostasie tissulaire et empêchent des réponses immunitaires excessives, leur accumulation dans certaines pathologies, comme dans les tumeurs, porte préjudice. Les stratégies pour empêcher leur génération et/ou induire la réversion des propriétés immunosuppressives des macrophages M2, peuvent augmenter l'efficacité des immunothérapies anti-tumorales.

Nous avons observé que (i) l'IFN $\gamma$  induit la réversion des IL-34-M $\phi$  en M1 immunostimulants et (ii) que le GM-CSF et l'IFN $\gamma$  empêchent la génération des IL-34-M $\phi$ .

En analysant les profils transcriptionnels des GM-CSF-M $\phi$  et des M-CSF-M $\phi$ , nous observons que l'expression des gènes induits par le M-CSF est contrecarrée par l'addition d'une faible dose (1 ng/ml) de GM-CSF [311].

Soutenant ces observations, le GM-CSF supprime, dans des lignées cellulaires myéloïdes murines, l'expression de l'ARNm du M-CSF-R [312] par l'activation transcriptionelle d'un système de dégradation de ribonucléase [313].

L'IFNγ est un activateur efficace des cellules myéloïdes induisant la génération de macrophages M1 immunostimulants et, comme précédemment observé, empêchant la génération des TAM dans le cancer ovarien [271]. En revanche, l'IFNγ ne module pas l'expression de l'ARNm du M-CSF-R par les monocytes [314].

Comme l'IL-34 et le M-CSF agissent via le M-CSF-R, ce résultat peut expliquer pourquoi le GM-CSF empêche l'effet de l'IL-34 et du M-CSF sur les monocytes tandis que le GM-CSF semble moins efficace que l'IFN $\gamma$  pour induire la réversion du phénotype immunosuppresseur des IL-34-M $\phi$ , bien que nous ne pouvons pas exclure que ceci pourrait être réalisé après un temps d'exposition prolongé.

### b) Perspectives : Immunothérapie ciblant les TAM dans un modèle tumoral

De nombreuses stratégies visant les TAM sont à l'étude. Selon nos résultats, l'IFNγ serait une bonne approche. Néanmoins, aujourd'hui, l'IFNγ n'est plus utilisé, du fait de sa toxicité.

Une stratégie intéressante serait de combiner plusieurs approches :

- (i) inhiber les macrophages M2

- (ii) différencier les monocytes en macrophages M1

- (iii) améliorer l'efficacité des propriétés anti-tumorales des macrophages M1

Pour cela, il serait intéressant (i) d'inhiber la différenciation en macrophages M2 immunosuppresseurs en utilisant un Ac neutralisant le CD115 (récepteur du M-CSF et de l'IL-34) ; (ii) de différencier les monocytes recrutés au niveau de la tumeur en macrophages immunostimulants anti-tumoraux par le GM-CSF ou par un Ac agoniste du CD40 (sécrétion d'IL-12 et présentation antigénique entraînant une réponse lymphocytaire anti-tumorale) ; et (iii) de neutraliser le CD47 présent sur les cellules tumorales afin d'augmenter l'activité phagocytaire des macrophages.

## **Conclusion générale**



Figure 16. Représentation schématique des principaux résultats obtenus, montrant le rôle des macrophages immunorégulateurs dans un contexte tumoral.

En conclusion, l'IL-34 et le M-CSF induisent la génération de macrophages immunorégulateurs via le CD115 qui peuvent, via la sécrétion d'IL-10, induire un environnement immunosuppresseur, et également, via l'expression constitutive de l'IL-1 $\alpha$  membranaire, induire la génération de lymphocytes Th17. Dans un contexte tumoral, ce processus pourrait contribuer à maintenir, localement, une inflammation modérée nécessaire pour les phénomènes d'angiogenèse, de métastases dans les tumeurs. Ceci pourrait également favoriser la mise en place de l'immunosuppression par le recrutement de cellules immunitaires qui, au contact du microenvironnement tumoral, deviendront anergiques ou seront polarisées en cellules immunosuppressives. Le GM-CSF et l'IFN $\gamma$  inhibent la génération et/ou induisent la réversion de ces macrophages en macrophages immunostimulants et semblent donc des cibles de choix pour obtenir un environnement pro-inflammatoire et anti-tumoral.

# **Bibliographie**

- 1. Abbas A.K LAH, Pillai S (2013) Les bases de l'immunologie foncdamentale et clinique.
- 2. Medzhitov R, Janeway C, Jr. (2000) Innate immune recognition: mechanisms and pathways. Immunological reviews 173: 89-97.
- 3. Medzhitov R, Janeway C, Jr. (2000) Innate immunity. N Engl J Med 343: 338-344.
- 4. Janeway CA, Jr., Medzhitov R (2002) Innate immune recognition. Annu Rev Immunol 20: 197-216.
- 5. Rubartelli A, Lotze MT (2007) Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. Trends Immunol 28: 429-436.
- 6. Fearon DT, Locksley RM (1996) The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. Science 272: 50-53.
- 7. Caligiuri MA (2008) Human natural killer cells. Blood 112: 461-469.
- 8. Goldrath AW, Bevan MJ (1999) Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. Nature 402: 255-262.
- 9. Zhu J, Paul WE (2010) Heterogeneity and plasticity of T helper cells. Cell Res 20: 4-12.
- 10. Gutcher I, Becher B (2007) APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. J Clin Invest 117: 1119-1127.
- Spel L, Boelens JJ, Nierkens S, Boes M (2013) Antitumor immune responses mediated by dendritic cells: How signals derived from dying cancer cells drive antigen cross-presentation. Oncoimmunology 2: e26403.
- 12. Stutman O (1974) Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. Science 183: 534-536.
- 13. Ikehara S, Pahwa RN, Fernandes G, Hansen CT, Good RA (1984) Functional T cells in athymic nude mice. Proc Natl Acad Sci U S A 81: 886-888.
- 14. Maleckar JR, Sherman LA (1987) The composition of the T cell receptor repertoire in nude mice. J Immunol 138: 3873-3876.
- Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, et al. (1998) Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 7556-7561.
- 16. Street SE, Cretney E, Smyth MJ (2001) Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. Blood 97: 192-197.
- 17. van den Broek ME, Kagi D, Ossendorp F, Toes R, Vamvakas S, et al. (1996) Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. J Exp Med 184: 1781-1790.
- 18. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ (2014) New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. Curr Opin Immunol 27: 16-25.
- 19. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD (2002) Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. Nat Immunol 3: 991-998.
- 20. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD (2004) The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. Immunity 21: 137-148.
- 21. Bhardwaj N (2007) Harnessing the immune system to treat cancer. J Clin Invest 117: 1130-1136.
- 22. Ostrand-Rosenberg S (2008) Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity. Curr Opin Genet Dev 18: 11-18.
- 23. Tartour E Mécanismes de l'immunosurveillance anti-tumorales.
- 24. Hannani D, Locher C, Yamazaki T, Colin-Minard V, Vetizou M, et al. (2014) Contribution of humoral immune responses to the antitumor effects mediated by anthracyclines. Cell Death Differ 21: 50-58.
- 25. Nelson BH (2008) The impact of T-cell immunity on ovarian cancer outcomes. Immunol Rev 222: 101-116.
- 26. Harty JT, Bevan MJ (1999) Responses of CD8(+) T cells to intracellular bacteria. Curr Opin Immunol 11: 89-93.
- 27. Kagi D, Ledermann B, Burki K, Seiler P, Odermatt B, et al. (1994) Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. Nature 369: 31-37.
- 28. Smyth MJ, Thia KY, Street SE, MacGregor D, Godfrey DI, et al. (2000) Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. J Exp Med 192: 755-760.
- 29. Cao X, Cai SF, Fehniger TA, Song J, Collins LI, et al. (2007) Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. Immunity 27: 635-646.

- 30. Brincks EL, Katewa A, Kucaba TA, Griffith TS, Legge KL (2008) CD8 T cells utilize TRAIL to control influenza virus infection. J Immunol 181: 4918-4925.
- 31. Snijders A, Kalinski P, Hilkens CM, Kapsenberg ML (1998) High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals. Int Immunol 10: 1593-1598.
- 32. Verneris MR, Karimi M, Baker J, Jayaswal A, Negrin RS (2004) Role of NKG2D signaling in the cytotoxicity of activated and expanded CD8+ T cells. Blood 103: 3065-3072.
- 33. Vivier E, Ugolini S, Blaise D, Chabannon C, Brossay L (2012) Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. Nat Rev Immunol 12: 239-252.
- 34. Waldhauer I, Steinle A (2008) NK cells and cancer immunosurveillance. Oncogene 27: 5932-5943.
- 35. Carding SR, Egan PJ (2002) Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity. Nat Rev Immunol 2: 336-345.
- 36. Bonneville M, Scotet E (2006) Human Vgamma9Vdelta2 T cells: promising new leads for immunotherapy of infections and tumors. Curr Opin Immunol 18: 539-546.
- 37. Wu YL, Ding YP, Tanaka Y, Shen LW, Wei CH, et al. (2014) gammadelta T cells and their potential for immunotherapy. Int J Biol Sci 10: 119-135.
- 38. Fujii S, Shimizu K, Okamoto Y, Kunii N, Nakayama T, et al. (2013) NKT cells as an ideal anti-tumor immunotherapeutic. Front Immunol 4: 409.
- 39. Ruffell B, DeNardo DG, Affara NI, Coussens LM (2010) Lymphocytes in cancer development: polarization towards pro-tumor immunity. Cytokine Growth Factor Rev 21: 3-10.
- 40. Hemdan NY (2013) Anti-cancer versus cancer-promoting effects of the interleukin-17-producing T helper cells. Immunol Lett 149: 123-133.
- 41. Benchetrit F, Ciree A, Vives V, Warnier G, Gey A, et al. (2002) Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism. Blood 99: 2114-2121.
- 42. Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD (2006) Interferons, immunity and cancer immunoediting. Nat Rev Immunol 6: 836-848.
- 43. Kennedy R, Celis E (2008) Multiple roles for CD4+ T cells in anti-tumor immune responses. Immunol Rev 222: 129-144.
- 44. Spolski R, Leonard WJ (2010) IL-21 is an immune activator that also mediates suppression via IL-10. Crit Rev Immunol 30: 559-570.
- 45. Bailey SR, Nelson MH, Himes RA, Li Z, Mehrotra S, et al. (2014) Th17 cells in cancer: the ultimate identity crisis. Front Immunol 5: 276.
- 46. Hugues Ga (2015) Th17 cell plasticity and functions in cancer immunity.
- 47. Sfanos KS, Bruno TC, Maris CH, Xu L, Thoburn CJ, et al. (2008) Phenotypic analysis of prostateinfiltrating lymphocytes reveals TH17 and Treg skewing. Clin Cancer Res 14: 3254-3261.
- 48. Ye ZJ, Zhou Q, Gu YY, Qin SM, Ma WL, et al. (2010) Generation and differentiation of IL-17producing CD4+ T cells in malignant pleural effusion. J Immunol 185: 6348-6354.
- 49. Kryczek I, Banerjee M, Cheng P, Vatan L, Szeliga W, et al. (2009) Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. Blood 114: 1141-1149.
- 50. Palucka K, Banchereau J (2013) Dendritic-cell-based therapeutic cancer vaccines. Immunity 39: 38-48.
- 51. Wesa AK, Storkus WJ (2008) Killer dendritic cells: mechanisms of action and therapeutic implications for cancer. Cell Death Differ 15: 51-57.
- 52. Orange DE, Jegathesan M, Blachere NE, Frank MO, Scher HI, et al. (2004) Effective antigen crosspresentation by prostate cancer patients' dendritic cells: implications for prostate cancer immunotherapy. Prostate Cancer Prostatic Dis 7: 63-72.
- 53. Miyagawa S, Soeda J, Takagi S, Miwa S, Ichikawa E, et al. (2004) Prognostic significance of mature dendritic cells and factors associated with their accumulation in metastatic liver tumors from colorectal cancer. Hum Pathol 35: 1392-1396.
- 54. Shurin MR, Shurin GV, Lokshin A, Yurkovetsky ZR, Gutkin DW, et al. (2006) Intratumoral cytokines/chemokines/growth factors and tumor infiltrating dendritic cells: friends or enemies? Cancer Metastasis Rev 25: 333-356.
- 55. Ishida T, Oyama T, Carbone DP, Gabrilovich DI (1998) Defective function of Langerhans cells in tumor-bearing animals is the result of defective maturation from hemopoietic progenitors. J Immunol 161: 4842-4851.

- 56. Gabrilovich DI, Ishida T, Nadaf S, Ohm JE, Carbone DP (1999) Antibodies to vascular endothelial growth factor enhance the efficacy of cancer immunotherapy by improving endogenous dendritic cell function. Clin Cancer Res 5: 2963-2970.
- 57. Almand B, Resser JR, Lindman B, Nadaf S, Clark JI, et al. (2000) Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. Clin Cancer Res 6: 1755-1766.
- 58. Wojas K, Tabarkiewicz J, Jankiewicz M, Rolinski J (2004) Dendritic cells in peripheral blood of patients with breast and lung cancer--a pilot study. Folia Histochem Cytobiol 42: 45-48.
- 59. Della Bella S, Gennaro M, Vaccari M, Ferraris C, Nicola S, et al. (2003) Altered maturation of peripheral blood dendritic cells in patients with breast cancer. Br J Cancer 89: 1463-1472.
- 60. Yu S, Liu C, Su K, Wang J, Liu Y, et al. (2007) Tumor exosomes inhibit differentiation of bone marrow dendritic cells. J Immunol 178: 6867-6875.
- 61. Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A (2008) The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. Immunol Rev 222: 155-161.
- 62. Pozzi LA, Maciaszek JW, Rock KL (2005) Both dendritic cells and macrophages can stimulate naive CD8 T cells in vivo to proliferate, develop effector function, and differentiate into memory cells. J Immunol 175: 2071-2081.
- 63. Mantovani A (2014) Macrophages, Neutrophils, and Cancer: A Double Edged Sword. New Journal of Science 2014: 14 pages.
- 64. Piccard H, Muschel RJ, Opdenakker G (2012) On the dual roles and polarized phenotypes of neutrophils in tumor development and progression. Crit Rev Oncol Hematol 82: 296-309.
- 65. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD (2004) The three Es of cancer immunoediting. Annu Rev Immunol 22: 329-360.
- 66. Fulda S (2009) Tumor resistance to apoptosis. Int J Cancer 124: 511-515.
- 67. Weiner LM (2008) Cancer immunotherapy--the endgame begins. N Engl J Med 358: 2664-2665.
- 68. Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM (2007) Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. Annu Rev Immunol 25: 267-296.
- 69. Swann JB, Smyth MJ (2007) Immune surveillance of tumors. J Clin Invest 117: 1137-1146.
- 70. Urosevic M, Dummer R (2008) Human leukocyte antigen-G and cancer immunoediting. Cancer Res 68: 627-630.
- Munn DH, Sharma MD, Hou D, Baban B, Lee JR, et al. (2004) Expression of indoleamine 2,3dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. J Clin Invest 114: 280-290.
- 72. Bell D, Chomarat P, Broyles D, Netto G, Harb GM, et al. (1999) In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas. J Exp Med 190: 1417-1426.
- 73. Aspord C, Pedroza-Gonzalez A, Gallegos M, Tindle S, Burton EC, et al. (2007) Breast cancer instructs dendritic cells to prime interleukin 13-secreting CD4+ T cells that facilitate tumor development. J Exp Med 204: 1037-1047.
- 74. Zou W (2006) Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. Nat Rev Immunol 6: 295-307.
- 75. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ (2008) How regulatory T cells work. Nat Rev Immunol 8: 523-532.
- 76. Shevach EM (2006) From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. Immunity 25: 195-201.
- 77. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, et al. (2006) CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. J Exp Med 203: 1701-1711.
- 78. Ebert LM, Tan BS, Browning J, Svobodova S, Russell SE, et al. (2008) The regulatory T cellassociated transcription factor FoxP3 is expressed by tumor cells. Cancer Res 68: 3001-3009.
- 79. Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, et al. (2000) Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. J Exp Med 192: 303-310.
- 80. Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S (2002) Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. Nat Immunol 3: 135-142.
- Zheng SG, Wang JH, Gray JD, Soucier H, Horwitz DA (2004) Natural and induced CD4+CD25+ cells educate CD4+CD25- cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF-beta, and IL-10. J Immunol 172: 5213-5221.

- Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Galle PR, et al. (2004) Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and downregulation of Smad7. J Immunol 172: 5149-5153.
- 83. Curiel TJ (2007) Tregs and rethinking cancer immunotherapy. J Clin Invest 117: 1167-1174.
- 84. Vence L, Palucka AK, Fay JW, Ito T, Liu YJ, et al. (2007) Circulating tumor antigen-specific regulatory T cells in patients with metastatic melanoma. Proc Natl Acad Sci U S A 104: 20884-20889.
- 85. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, et al. (2004) Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. Nat Med 10: 942-949.
- 86. Cools N, Van Tendeloo VF, Smits EL, Lenjou M, Nijs G, et al. (2008) Immunosuppression induced by immature dendritic cells is mediated by TGF-beta/IL-10 double-positive CD4(+) regulatory T cells. J Cell Mol Med 12: 690-700.
- 87. Levings MK, Gregori S, Tresoldi E, Cazzaniga S, Bonini C, et al. (2005) Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells. Blood 105: 1162-1169.
- Ghiringhelli F, Puig PE, Roux S, Parcellier A, Schmitt E, et al. (2005) Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. J Exp Med 202: 919-929.
- 89. Curiel TJ, Wei S, Dong H, Alvarez X, Cheng P, et al. (2003) Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. Nat Med 9: 562-567.
- 90. Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L (1999) B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. Nat Med 5: 1365-1369.
- 91. Curti A, Pandolfi S, Valzasina B, Aluigi M, Isidori A, et al. (2007) Modulation of tryptophan catabolism by human leukemic cells results in the conversion of CD25- into CD25+ T regulatory cells. Blood 109: 2871-2877.
- 92. Fallarino F, Grohmann U, You S, McGrath BC, Cavener DR, et al. (2006) The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. J Immunol 176: 6752-6761.
- 93. Sharma MD, Baban B, Chandler P, Hou DY, Singh N, et al. (2007) Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. J Clin Invest 117: 2570-2582.
- 94. Serafini P, Mgebroff S, Noonan K, Borrello I (2008) Myeloid-derived suppressor cells promote crosstolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells. Cancer Res 68: 5439-5449.
- 95. Berrebi D, Bruscoli S, Cohen N, Foussat A, Migliorati G, et al. (2003) Synthesis of glucocorticoidinduced leucine zipper (GILZ) by macrophages: an anti-inflammatory and immunosuppressive mechanism shared by glucocorticoids and IL-10. Blood 101: 729-738.
- 96. Cohen N, Mouly E, Hamdi H, Maillot MC, Pallardy M, et al. (2006) GILZ expression in human dendritic cells redirects their maturation and prevents antigen-specific T lymphocyte response. Blood 107: 2037-2044.
- 97. Sica A, Saccani A, Bottazzi B, Polentarutti N, Vecchi A, et al. (2000) Autocrine production of IL-10 mediates defective IL-12 production and NF-kappa B activation in tumor-associated macrophages. J Immunol 164: 762-767.
- 98. Biswas SK, Gangi L, Paul S, Schioppa T, Saccani A, et al. (2006) A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation). Blood 107: 2112-2122.
- 99. Smith TR, Kumar V (2008) Revival of CD8(+) Treg-mediated suppression. Trends Immunol 29: 337-342.
- 100. Jarnicki AG, Lysaght J, Todryk S, Mills KH (2006) Suppression of antitumor immunity by IL-10 and TGF-beta-producing T cells infiltrating the growing tumor: influence of tumor environment on the induction of CD4+ and CD8+ regulatory T cells. J Immunol 177: 896-904.
- 101. Filaci G, Fenoglio D, Fravega M, Ansaldo G, Borgonovo G, et al. (2007) CD8+ CD28- T regulatory lymphocytes inhibiting T cell proliferative and cytotoxic functions infiltrate human cancers. J Immunol 179: 4323-4334.
- 102. Chang CC, Ciubotariu R, Manavalan JS, Yuan J, Colovai AI, et al. (2002) Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. Nat Immunol 3: 237-243.
- 103. Kiniwa Y, Miyahara Y, Wang HY, Peng W, Peng G, et al. (2007) CD8+ Foxp3+ regulatory T cells mediate immunosuppression in prostate cancer. Clin Cancer Res 13: 6947-6958.

- 104. Wei S, Kryczek I, Zou L, Daniel B, Cheng P, et al. (2005) Plasmacytoid dendritic cells induce CD8+ regulatory T cells in human ovarian carcinoma. Cancer Res 65: 5020-5026.
- 105. Nam JS, Terabe M, Kang MJ, Chae H, Voong N, et al. (2008) Transforming growth factor beta subverts the immune system into directly promoting tumor growth through interleukin-17. Cancer Res 68: 3915-3923.
- 106. Benevides L, da Fonseca DM, Donate PB, Tiezzi DG, De Carvalho DD, et al. (2015) IL17 Promotes Mammary Tumor Progression by Changing the Behavior of Tumor Cells and Eliciting Tumorigenic Neutrophils Recruitment. Cancer Res 75: 3788-3799.
- 107. Zou W, Restifo NP (2010) T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy. Nat Rev Immunol 10: 248-256.
- 108. Zhang B, Rong G, Wei H, Zhang M, Bi J, et al. (2008) The prevalence of Th17 cells in patients with gastric cancer. Biochem Biophys Res Commun.
- 109. Kryczek I, Wei S, Zou L, Altuwaijri S, Szeliga W, et al. (2007) Cutting edge: Th17 and regulatory T cell dynamics and the regulation by IL-2 in the tumor microenvironment. J Immunol 178: 6730-6733.
- 110. Ciree A, Michel L, Camilleri-Broet S, Jean Louis F, Oster M, et al. (2004) Expression and activity of IL-17 in cutaneous T-cell lymphomas (mycosis fungoides and Sezary syndrome). Int J Cancer 112: 113-120.
- 111. Lin WW, Karin M (2007) A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. J Clin Invest 117: 1175-1183.
- 112. Tartour E, Fossiez F, Joyeux I, Galinha A, Gey A, et al. (1999) Interleukin 17, a T-cell-derived cytokine, promotes tumorigenicity of human cervical tumors in nude mice. Cancer Res 59: 3698-3704.
- 113. Zhang JP, Yan J, Xu J, Pang XH, Chen MS, et al. (2009) Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. J Hepatol 50: 980-989.
- 114. Derhovanessian E, Adams V, Hahnel K, Groeger A, Pandha H, et al. (2009) Pretreatment frequency of circulating IL-17+ CD4+ T-cells, but not Tregs, correlates with clinical response to whole-cell vaccination in prostate cancer patients. Int J Cancer 125: 1372-1379.
- 115. Chen X, Wan J, Liu J, Xie W, Diao X, et al. (2010) Increased IL-17-producing cells correlate with poor survival and lymphangiogenesis in NSCLC patients. Lung Cancer 69: 348-354.
- 116. Zhao F, Hoechst B, Gamrekelashvili J, Ormandy LA, Voigtlander T, et al. (2012) Human CCR4+ CCR6+ Th17 cells suppress autologous CD8+ T cell responses. J Immunol 188: 6055-6062.
- 117. Chalmin F, Mignot G, Bruchard M, Chevriaux A, Vegran F, et al. (2012) Stat3 and Gfi-1 transcription factors control Th17 cell immunosuppressive activity via the regulation of ectonucleotidase expression. Immunity 36: 362-373.
- 118. Agarwal A, Verma S, Burra U, Murthy NS, Mohanty NK, et al. (2006) Flow cytometric analysis of Th1 and Th2 cytokines in PBMCs as a parameter of immunological dysfunction in patients of superficial transitional cell carcinoma of bladder. Cancer Immunol Immunother 55: 734-743.
- 119. Kanazawa M, Yoshihara K, Abe H, Iwadate M, Watanabe K, et al. (2005) Effects of PSK on T and dendritic cells differentiation in gastric or colorectal cancer patients. Anticancer Res 25: 443-449.
- 120. Sheu BC, Lin RH, Lien HC, Ho HN, Hsu SM, et al. (2001) Predominant Th2/Tc2 polarity of tumorinfiltrating lymphocytes in human cervical cancer. J Immunol 167: 2972-2978.
- 121. Terabe M, Park JM, Berzofsky JA (2004) Role of IL-13 in regulation of anti-tumor immunity and tumor growth. Cancer Immunol Immunother 53: 79-85.
- 122. Gumus E, Erdamar S, Demirel G, Horasanli K, Kendirci M, et al. (2004) Association of positive serum anti-p53 antibodies with poor prognosis in bladder cancer patients. Int J Urol 11: 1070-1077.
- 123. Shah S, Divekar AA, Hilchey SP, Cho HM, Newman CL, et al. (2005) Increased rejection of primary tumors in mice lacking B cells: inhibition of anti-tumor CTL and TH1 cytokine responses by B cells. Int J Cancer 117: 574-586.
- 124. Yu P, Lee Y, Liu W, Chin RK, Wang J, et al. (2004) Priming of naive T cells inside tumors leads to eradication of established tumors. Nat Immunol 5: 141-149.
- 125. Troy A, Davidson P, Atkinson C, Hart D (1998) Phenotypic characterisation of the dendritic cell infiltrate in prostate cancer. J Urol 160: 214-219.
- 126. Troy AJ, Summers KL, Davidson PJ, Atkinson CH, Hart DN (1998) Minimal recruitment and activation of dendritic cells within renal cell carcinoma. Clin Cancer Res 4: 585-593.

- 127. Steinbrink K, Wolfl M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH (1997) Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. J Immunol 159: 4772-4780.
- 128. Enk AH, Jonuleit H, Saloga J, Knop J (1997) Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma. Int J Cancer 73: 309-316.
- 129. Huang H, Dawicki W, Zhang X, Town J, Gordon JR (2010) Tolerogenic dendritic cells induce CD4+CD25hiFoxp3+ regulatory T cell differentiation from CD4+CD25-/loFoxp3- effector T cells. J Immunol 185: 5003-5010.
- 130. Gabrilovich DI, Corak J, Ciernik IF, Kavanaugh D, Carbone DP (1997) Decreased antigen presentation by dendritic cells in patients with breast cancer. Clin Cancer Res 3: 483-490.
- 131. Gabrilovich D (2004) Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. Nat Rev Immunol 4: 941-952.
- 132. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, et al. (2002) Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. Nat Med 8: 793-800.
- 133. Zou W, Chen L (2008) Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. Nat Rev Immunol 8: 467-477.
- 134. Jablonska J, Leschner S, Westphal K, Lienenklaus S, Weiss S (2010) Neutrophils responsive to endogenous IFN-beta regulate tumor angiogenesis and growth in a mouse tumor model. J Clin Invest 120: 1151-1164.
- 135. Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, et al. (2009) Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. Cancer Cell 16: 183-194.
- 136. Bronte V, Chappell DB, Apolloni E, Cabrelle A, Wang M, et al. (1999) Unopposed production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by tumors inhibits CD8+ T cell responses by dysregulating antigen-presenting cell maturation. J Immunol 162: 5728-5737.
- 137. Bronte V, Wang M, Overwijk WW, Surman DR, Pericle F, et al. (1998) Apoptotic death of CD8+ T lymphocytes after immunization: induction of a suppressive population of Mac-1+/Gr-1+ cells. J Immunol 161: 5313-5320.
- 138. Gabrilovich DI, Bronte V, Chen SH, Colombo MP, Ochoa A, et al. (2007) The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. Cancer Res 67: 425; author reply 426.
- 139. Serafini P, Borrello I, Bronte V (2006) Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression. Semin Cancer Biol 16: 53-65.
- 140. Bronte V, Apolloni E, Cabrelle A, Ronca R, Serafini P, et al. (2000) Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells. Blood 96: 3838-3846.
- 141. Huang B, Pan PY, Li Q, Sato AI, Levy DE, et al. (2006) Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. Cancer Res 66: 1123-1131.
- 142. Gallina G, Dolcetti L, Serafini P, De Santo C, Marigo I, et al. (2006) Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells. J Clin Invest 116: 2777-2790.
- 143. Gabrilovich DI, Velders MP, Sotomayor EM, Kast WM (2001) Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells. J Immunol 166: 5398-5406.
- 144. Movahedi K, Guilliams M, Van den Bossche J, Van den Bergh R, Gysemans C, et al. (2008) Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. Blood 111: 4233-4244.
- 145. Almand B, Clark JI, Nikitina E, van Beynen J, English NR, et al. (2001) Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. J Immunol 166: 678-689.
- 146. Diaz-Montero CM, Salem ML, Nishimura MI, Garrett-Mayer E, Cole DJ, et al. (2008) Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. Cancer Immunol Immunother.
- 147. Kusmartsev SA, Li Y, Chen SH (2000) Gr-1+ myeloid cells derived from tumor-bearing mice inhibit primary T cell activation induced through CD3/CD28 costimulation. J Immunol 165: 779-785.
- 148. Mazzoni A, Bronte V, Visintin A, Spitzer JH, Apolloni E, et al. (2002) Myeloid suppressor lines inhibit T cell responses by an NO-dependent mechanism. J Immunol 168: 689-695.
- 149. Nagaraj S, Gupta K, Pisarev V, Kinarsky L, Sherman S, et al. (2007) Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. Nat Med 13: 828-835.

- 150. Bronte V, Serafini P, De Santo C, Marigo I, Tosello V, et al. (2003) IL-4-induced arginase 1 suppresses alloreactive T cells in tumor-bearing mice. J Immunol 170: 270-278.
- 151. Brooks JC, Hoskin DW (1994) The inhibitory effect of cyclophosphamide-induced MAC-1+ natural suppressor cells on IL-2 and IL-4 utilization in MLR. Transplantation 58: 1096-1103.
- 152. Sinha P, Clements VK, Bunt SK, Albelda SM, Ostrand-Rosenberg S (2007) Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response. J Immunol 179: 977-983.
- 153. Hoechst B, Ormandy LA, Ballmaier M, Lehner F, Kruger C, et al. (2008) A new population of myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients induces CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells. Gastroenterology 135: 234-243.
- 154. Yang L, DeBusk LM, Fukuda K, Fingleton B, Green-Jarvis B, et al. (2004) Expansion of myeloid immune suppressor Gr+CD11b+ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis. Cancer Cell 6: 409-421.
- 155. Muller AJ, Scherle PA (2006) Targeting the mechanisms of tumoral immune tolerance with smallmolecule inhibitors. Nat Rev Cancer 6: 613-625.
- 156. Mellman I, Coukos G, Dranoff G (2011) Cancer immunotherapy comes of age. Nature 480: 480-489.
- 157. Kalos M, June CH (2013) Adoptive T cell transfer for cancer immunotherapy in the era of synthetic biology. Immunity 39: 49-60.
- 158. Zou W (2005) Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. Nat Rev Cancer 5: 263-274.
- 159. Sandoval F, Terme M, Nizard M, Badoual C, Bureau MF, et al. (2013) Mucosal imprinting of vaccineinduced CD8(+) T cells is crucial to inhibit the growth of mucosal tumors. Sci Transl Med 5: 172ra120.
- 160. Bercovici N, Haicheur N, Massicard S, Vernel-Pauillac F, Adotevi O, et al. (2008) Analysis and characterization of antitumor T-cell response after administration of dendritic cells loaded with allogeneic tumor lysate to metastatic melanoma patients. J Immunother 31: 101-112.
- 161. Finn OJ (2008) Cancer immunology. N Engl J Med 358: 2704-2715.
- 162. Lizee G, Cantu MA, Hwu P (2007) Less yin, more yang: confronting the barriers to cancer immunotherapy. Clin Cancer Res 13: 5250-5255.
- 163. Chester C, Dorigo O, Berek JS, Kohrt H (2015) Immunotherapeutic approaches to ovarian cancer treatment. J Immunother Cancer 3: 7.
- 164. Byrne KT, Vonderheide RH, Jaffee EM, Armstrong TD (2015) Special Conference on Tumor Immunology and Immunotherapy: A New Chapter. Cancer Immunol Res.
- 165. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM (2015) Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. Cancer Cell 27: 450-461.
- 166. Sharma P, Allison JP (2015) Immune checkpoint targeting in cancer therapy: toward combination strategies with curative potential. Cell 161: 205-214.
- 167. Onishi H, Morisaki T, Katano M (2012) Immunotherapy approaches targeting regulatory T-cells. Anticancer Res 32: 997-1003.
- 168. Nishikawa H, Sakaguchi S (2014) Regulatory T cells in cancer immunotherapy. Curr Opin Immunol 27: 1-7.
- 169. Bayry J, Tartour E, Tough DF (2014) Targeting CCR4 as an emerging strategy for cancer therapy and vaccines. Trends Pharmacol Sci 35: 163-165.
- 170. Bulliard Y, Jolicoeur R, Zhang J, Dranoff G, Wilson NS, et al. (2014) OX40 engagement depletes intratumoral Tregs via activating FcgammaRs, leading to antitumor efficacy. Immunol Cell Biol 92: 475-480.
- 171. Schaer DA, Budhu S, Liu C, Bryson C, Malandro N, et al. (2013) GITR pathway activation abrogates tumor immune suppression through loss of regulatory T cell lineage stability. Cancer Immunol Res 1: 320-331.
- 172. Terme M, Pernot S, Marcheteau E, Sandoval F, Benhamouda N, et al. (2013) VEGFA-VEGFR pathway blockade inhibits tumor-induced regulatory T-cell proliferation in colorectal cancer. Cancer Res 73: 539-549.
- 173. Sieweke MH, Allen JE (2013) Beyond stem cells: self-renewal of differentiated macrophages. Science 342: 1242974.
- 174. Sheng J, Ruedl C, Karjalainen K (2015) Most Tissue-Resident Macrophages Except Microglia Are Derived from Fetal Hematopoietic Stem Cells. Immunity 43: 382-393.

- 175. Epelman S, Lavine KJ, Randolph GJ (2014) Origin and functions of tissue macrophages. Immunity 41: 21-35.
- 176. Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR (2013) Tissue-resident macrophages. Nat Immunol 14: 986-995.
- 177. Varol C, Mildner A, Jung S (2015) Macrophages: development and tissue specialization. Annu Rev Immunol 33: 643-675.
- 178. Gordon S, Taylor PR (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. Nature reviews Immunology 5: 953-964.
- 179. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F (2009) Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. Annual review of immunology 27: 669-692.
- Biswas SK, Mantovani A (2012) Orchestration of metabolism by macrophages. Cell Metab 15: 432-437.
- 181. Slauch JM (2011) How does the oxidative burst of macrophages kill bacteria? Still an open question. Mol Microbiol 80: 580-583.
- 182. Weiss G, Schaible UE (2015) Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. Immunol Rev 264: 182-203.
- 183. Flannagan RS, Cosio G, Grinstein S (2009) Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. Nat Rev Microbiol 7: 355-366.
- 184. Erwig LP, Henson PM (2008) Clearance of apoptotic cells by phagocytes. Cell Death Differ 15: 243-250.
- 185. Krispin A, Bledi Y, Atallah M, Trahtemberg U, Verbovetski I, et al. (2006) Apoptotic cell thrombospondin-1 and heparin-binding domain lead to dendritic-cell phagocytic and tolerizing states. Blood 108: 3580-3589.
- 186. Ravichandran KS, Lorenz U (2007) Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. Nat Rev Immunol 7: 964-974.
- 187. Oberyszyn TM (2007) Inflammation and wound healing. Front Biosci 12: 2993-2999.
- Soehnlein O, Lindbom L (2010) Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. Nat Rev Immunol 10: 427-439.
- 189. Buckley CD, Gilroy DW, Serhan CN, Stockinger B, Tak PP (2013) The resolution of inflammation. Nat Rev Immunol 13: 59-66.
- 190. Mosser DM, Edwards JP (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. Nat Rev Immunol 8: 958-969.
- 191. Biswas SK, Mantovani A (2010) Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. Nature immunology 11: 889-896.
- 192. Sica A, Mantovani A (2012) Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. The Journal of clinical investigation 122: 787-795.
- 193. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, et al. (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. Trends in immunology 25: 677-686.
- 194. Lacey DC, Achuthan A, Fleetwood AJ, Dinh H, Roiniotis J, et al. (2012) Defining GM-CSF- and Macrophage-CSF-Dependent Macrophage Responses by In Vitro Models. Journal of immunology 188: 5752-5765.
- 195. Greter M, Lelios I, Pelczar P, Hoeffel G, Price J, et al. (2012) Stroma-derived interleukin-34 controls the development and maintenance of langerhans cells and the maintenance of microglia. Immunity 37: 1050-1060.
- 196. Wang Y, Szretter KJ, Vermi W, Gilfillan S, Rossini C, et al. (2012) IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. Nat Immunol 13: 753-760.
- 197. Chihara T, Suzu S, Hassan R, Chutiwitoonchai N, Hiyoshi M, et al. (2010) IL-34 and M-CSF share the receptor Fms but are not identical in biological activity and signal activation. Cell death and differentiation 17: 1917-1927.
- 198. Lin H, Lee E, Hestir K, Leo C, Huang M, et al. (2008) Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome. Science 320: 807-811.
- 199. Pandit J, Bohm A, Jancarik J, Halenbeck R, Koths K, et al. (1992) Three-dimensional structure of dimeric human recombinant macrophage colony-stimulating factor. Science 258: 1358-1362.
- 200. Droin N, Solary E (2010) Editorial: CSF1R, CSF-1, and IL-34, a "menage a trois" conserved across vertebrates. Journal of leukocyte biology 87: 745-747.
- 201. Nakamichi Y, Udagawa N, Takahashi N (2013) IL-34 and CSF-1: similarities and differences. J Bone Miner Metab 31: 486-495.
- 202. Wei S, Nandi S, Chitu V, Yeung YG, Yu W, et al. (2010) Functional overlap but differential expression of CSF-1 and IL-34 in their CSF-1 receptor-mediated regulation of myeloid cells. Journal of leukocyte biology 88: 495-505.
- 203. Chen Z, Buki K, Vaaraniemi J, Gu G, Vaananen HK (2011) The critical role of IL-34 in osteoclastogenesis. PloS one 6: e18689.
- 204. Baud'huin M, Renault R, Charrier C, Riet A, Moreau A, et al. (2010) Interleukin-34 is expressed by giant cell tumours of bone and plays a key role in RANKL-induced osteoclastogenesis. The Journal of pathology 221: 77-86.
- 205. Ma X, Lin WY, Chen Y, Stawicki S, Mukhyala K, et al. (2012) Structural basis for the dual recognition of helical cytokines IL-34 and CSF-1 by CSF-1R. Structure 20: 676-687.
- 206. Mantovani A, Sica A, Locati M (2005) Macrophage polarization comes of age. Immunity 23: 344-346.
- 207. Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, Lin HH, Brown GD, et al. (2005) Macrophage receptors and immune recognition. Annual review of immunology 23: 901-944.
- 208. MacMicking J, Xie QW, Nathan C (1997) Nitric oxide and macrophage function. Annu Rev Immunol 15: 323-350.
- 209. Klimp AH, de Vries EG, Scherphof GL, Daemen T (2002) A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. Crit Rev Oncol Hematol 44: 143-161.
- 210. Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, Hoeve MA, Kramer M, et al. (2004) Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 4560-4565.
- 211. Fleetwood AJ, Lawrence T, Hamilton JA, Cook AD (2007) Granulocyte-macrophage colonystimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation. Journal of immunology 178: 5245-5252.
- 212. Qasimi P, Ming-Lum A, Ghanipour A, Ong CJ, Cox ME, et al. (2006) Divergent mechanisms utilized by SOCS3 to mediate interleukin-10 inhibition of tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production by macrophages. The Journal of biological chemistry 281: 6316-6324.
- 213. Duluc D, Delneste Y, Tan F, Moles MP, Grimaud L, et al. (2007) Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. Blood 110: 4319-4330.
- 214. Lee SB, Kalluri R (2010) Mechanistic connection between inflammation and fibrosis. Kidney Int Suppl: S22-26.
- 215. White ES, Mantovani AR (2013) Inflammation, wound repair, and fibrosis: reassessing the spectrum of tissue injury and resolution. J Pathol 229: 141-144.
- 216. Czaja AJ (2014) Hepatic inflammation and progressive liver fibrosis in chronic liver disease. World J Gastroenterol 20: 2515-2532.
- 217. Wick G, Grundtman C, Mayerl C, Wimpissinger TF, Feichtinger J, et al. (2013) The immunology of fibrosis. Annu Rev Immunol 31: 107-135.
- 218. Pellicoro A, Ramachandran P, Iredale JP, Fallowfield JA (2014) Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. Nat Rev Immunol 14: 181-194.
- 219. Koh TJ, DiPietro LA (2011) Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. Expert Rev Mol Med 13: e23.
- 220. Weidenbusch M, Anders HJ (2012) Tissue microenvironments define and get reinforced by macrophage phenotypes in homeostasis or during inflammation, repair and fibrosis. J Innate Immun 4: 463-477.
- 221. Preisser L, Miot C, Le Guillou-Guillemette H, Beaumont E, Foucher ED, et al. (2014) IL-34 and macrophage colony-stimulating factor are overexpressed in hepatitis C virus fibrosis and induce profibrotic macrophages that promote collagen synthesis by hepatic stellate cells. Hepatology 60: 1879-1890.
- 222. Iero M, Valenti R, Huber V, Filipazzi P, Parmiani G, et al. (2008) Tumour-released exosomes and their implications in cancer immunity. Cell Death Differ 15: 80-88.
- 223. Valenti R, Huber V, Filipazzi P, Pilla L, Sovena G, et al. (2006) Human tumor-released microvesicles promote the differentiation of myeloid cells with transforming growth factor-beta-mediated suppressive activity on T lymphocytes. Cancer Res 66: 9290-9298.

- 224. Valenti R, Huber V, Iero M, Filipazzi P, Parmiani G, et al. (2007) Tumor-released microvesicles as vehicles of immunosuppression. Cancer Res 67: 2912-2915.
- 225. Hagemann T, Wilson J, Burke F, Kulbe H, Li NF, et al. (2006) Ovarian cancer cells polarize macrophages toward a tumor-associated phenotype. J Immunol 176: 5023-5032.
- 226. Chomarat P, Banchereau J, Davoust J, Palucka AK (2000) IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. Nat Immunol 1: 510-514.
- 227. Menetrier-Caux C, Montmain G, Dieu MC, Bain C, Favrot MC, et al. (1998) Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34(+) progenitors by tumor cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor. Blood 92: 4778-4791.
- 228. Kacinski BM (1995) CSF-1 and its receptor in ovarian, endometrial and breast cancer. Ann Med 27: 79-85.
- 229. Kacinski BM (1997) CSF-1 and its receptor in breast carcinomas and neoplasms of the female reproductive tract. Mol Reprod Dev 46: 71-74.
- 230. Lin EY, Gouon-Evans V, Nguyen AV, Pollard JW (2002) The macrophage growth factor CSF-1 in mammary gland development and tumor progression. J Mammary Gland Biol Neoplasia 7: 147-162.
- 231. Scholl SM, Pallud C, Beuvon F, Hacene K, Stanley ER, et al. (1994) Anti-colony-stimulating factor-1 antibody staining in primary breast adenocarcinomas correlates with marked inflammatory cell infiltrates and prognosis. J Natl Cancer Inst 86: 120-126.
- 232. Saji H, Koike M, Yamori T, Saji S, Seiki M, et al. (2001) Significant correlation of monocyte chemoattractant protein-1 expression with neovascularization and progression of breast carcinoma. Cancer 92: 1085-1091.
- 233. Milliken D, Scotton C, Raju S, Balkwill F, Wilson J (2002) Analysis of chemokines and chemokine receptor expression in ovarian cancer ascites. Clin Cancer Res 8: 1108-1114.
- 234. Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P (2006) Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. Eur J Cancer 42: 717-727.
- 235. Mantovani A, Bonecchi R, Locati M (2006) Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more. Nat Rev Immunol 6: 907-918.
- 236. Azenshtein E, Luboshits G, Shina S, Neumark E, Shahbazian D, et al. (2002) The CC chemokine RANTES in breast carcinoma progression: regulation of expression and potential mechanisms of promalignant activity. Cancer Res 62: 1093-1102.
- 237. Duyndam MC, Hilhorst MC, Schluper HM, Verheul HM, van Diest PJ, et al. (2002) Vascular endothelial growth factor-165 overexpression stimulates angiogenesis and induces cyst formation and macrophage infiltration in human ovarian cancer xenografts. Am J Pathol 160: 537-548.
- 238. Adini A, Kornaga T, Firoozbakht F, Benjamin LE (2002) Placental growth factor is a survival factor for tumor endothelial cells and macrophages. Cancer Res 62: 2749-2752.
- 239. Allavena P, Sica A, Solinas G, Porta C, Mantovani A (2008) The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. Crit Rev Oncol Hematol 66: 1-9.
- 240. Colegio OR, Chu NQ, Szabo AL, Chu T, Rhebergen AM, et al. (2014) Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. Nature 513: 559-563.
- 241. Talks KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, et al. (2000) The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. Am J Pathol 157: 411-421.
- 242. Lewis JS, Landers RJ, Underwood JC, Harris AL, Lewis CE (2000) Expression of vascular endothelial growth factor by macrophages is up-regulated in poorly vascularized areas of breast carcinomas. J Pathol 192: 150-158.
- 243. Du R, Lu KV, Petritsch C, Liu P, Ganss R, et al. (2008) HIF1alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. Cancer Cell 13: 206-220.
- 244. White JR, Harris RA, Lee SR, Craigon MH, Binley K, et al. (2004) Genetic amplification of the transcriptional response to hypoxia as a novel means of identifying regulators of angiogenesis. Genomics 83: 1-8.
- 245. Guida E, Stewart A (1998) Influence of hypoxia and glucose deprivation on tumour necrosis factoralpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expression in human cultured monocytes. Cell Physiol Biochem 8: 75-88.

- 246. Hempel SL, Monick MM, Hunninghake GW (1996) Effect of hypoxia on release of IL-1 and TNF by human alveolar macrophages. Am J Respir Cell Mol Biol 14: 170-176.
- 247. Balkwill F, Charles KA, Mantovani A (2005) Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. Cancer Cell 7: 211-217.
- 248. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F (2008) Cancer-related inflammation. Nature 454: 436-444.
- 249. Kryczek I, Zou L, Rodriguez P, Zhu G, Wei S, et al. (2006) B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma. J Exp Med 203: 871-881.
- 250. Kryczek I, Wei S, Zhu G, Myers L, Mottram P, et al. (2007) Relationship between B7-H4, regulatory T cells, and patient outcome in human ovarian carcinoma. Cancer Res 67: 8900-8905.
- 251. Kryczek I, Wei S, Zou L, Zhu G, Mottram P, et al. (2006) Cutting edge: induction of B7-H4 on APCs through IL-10: novel suppressive mode for regulatory T cells. J Immunol 177: 40-44.
- 252. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A (2002) Macrophage polarization: tumorassociated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. Trends Immunol 23: 549-555.
- 253. Carmeliet P, Jain RK (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. Nature 407: 249-257.
- 254. Boudreau N, Myers C (2003) Breast cancer-induced angiogenesis: multiple mechanisms and the role of the microenvironment. Breast Cancer Res 5: 140-146.
- 255. Lin EY, Pollard JW (2007) Tumor-associated macrophages press the angiogenic switch in breast cancer. Cancer Res 67: 5064-5066.
- 256. Lin EY, Li JF, Bricard G, Wang W, Deng Y, et al. (2007) VEGF Restores Delayed Tumor Progression in Tumors Depleted of Macrophages. Mol Oncol 1: 288-302.
- 257. Varney ML, Olsen KJ, Mosley RL, Singh RK (2005) Paracrine regulation of vascular endothelial growth factor--a expression during macrophage-melanoma cell interaction: role of monocyte chemotactic protein-1 and macrophage colony-stimulating factor. J Interferon Cytokine Res 25: 674-683.
- 258. Melani C, Chiodoni C, Forni G, Colombo MP (2003) Myeloid cell expansion elicited by the progression of spontaneous mammary carcinomas in c-erbB-2 transgenic BALB/c mice suppresses immune reactivity. Blood 102: 2138-2145.
- 259. Ueno T, Toi M, Saji H, Muta M, Bando H, et al. (2000) Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer. Clin Cancer Res 6: 3282-3289.
- 260. Eda H, Fujimoto K, Watanabe S, Ura M, Hino A, et al. (1993) Cytokines induce thymidine phosphorylase expression in tumor cells and make them more susceptible to 5'-deoxy-5-fluorouridine. Cancer Chemother Pharmacol 32: 333-338.
- 261. Leek RD, Landers R, Fox SB, Ng F, Harris AL, et al. (1998) Association of tumour necrosis factor alpha and its receptors with thymidine phosphorylase expression in invasive breast carcinoma. Br J Cancer 77: 2246-2251.
- 262. Marconi C, Bianchini F, Mannini A, Mugnai G, Ruggieri S, et al. (2008) Tumoral and macrophage uPAR and MMP-9 contribute to the invasiveness of B16 murine melanoma cells. Clin Exp Metastasis 25: 225-231.
- 263. Hildenbrand R, Jansen C, Wolf G, Bohme B, Berger S, et al. (1998) Transforming growth factor-beta stimulates urokinase expression in tumor-associated macrophages of the breast. Lab Invest 78: 59-71.
- 264. Kim S, Takahashi H, Lin WW, Descargues P, Grivennikov S, et al. (2009) Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. Nature 457: 102-106.
- 265. Lewis CE, Leek R, Harris A, McGee JO (1995) Cytokine regulation of angiogenesis in breast cancer: the role of tumor-associated macrophages. J Leukoc Biol 57: 747-751.
- 266. Pollard JW (2004) Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. Nat Rev Cancer 4: 71-78.
- 267. Panni RZ, Linehan DC, DeNardo DG (2013) Targeting tumor-infiltrating macrophages to combat cancer. Immunotherapy 5: 1075-1087.
- 268. Ries CH, Cannarile MA, Hoves S, Benz J, Wartha K, et al. (2014) Targeting tumor-associated macrophages with anti-CSF-1R antibody reveals a strategy for cancer therapy. Cancer Cell 25: 846-859.
- 269. Mantovani A, Allavena P (2015) The interaction of anticancer therapies with tumor-associated macrophages. J Exp Med 212: 435-445.

- 270. Noy R, Pollard JW (2014) Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. Immunity 41: 49-61.
- 271. Duluc D, Corvaisier M, Blanchard S, Catala L, Descamps P, et al. (2009) Interferon-gamma reverses the immunosuppressive and protumoral properties and prevents the generation of human tumor-associated macrophages. Int J Cancer 125: 367-373.
- 272. Liu X, Pu Y, Cron K, Deng L, Kline J, et al. (2015) CD47 blockade triggers T cell-mediated destruction of immunogenic tumors. Nat Med.
- 273. O'Shea JJ, Paul WE (2010) Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. Science 327: 1098-1102.
- 274. Nandi S, Gokhan S, Dai XM, Wei S, Enikolopov G, et al. (2012) The CSF-1 receptor ligands IL-34 and CSF-1 exhibit distinct developmental brain expression patterns and regulate neural progenitor cell maintenance and maturation. Dev Biol 367: 100-113.
- 275. DeNardo DG, Brennan DJ, Rexhepaj E, Ruffell B, Shiao SL, et al. (2011) Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. Cancer Discov 1: 54-67.
- 276. Cecchini MG, Dominguez MG, Mocci S, Wetterwald A, Felix R, et al. (1994) Role of colony stimulating factor-1 in the establishment and regulation of tissue macrophages during postnatal development of the mouse. Development 120: 1357-1372.
- 277. Ginhoux F, Tacke F, Angeli V, Bogunovic M, Loubeau M, et al. (2006) Langerhans cells arise from monocytes in vivo. Nat Immunol 7: 265-273.
- 278. Voronov E, Dotan S, Krelin Y, Song X, Elkabets M, et al. (2013) Unique Versus Redundant Functions of IL-1alpha and IL-1beta in the Tumor Microenvironment. Front Immunol 4: 177.
- 279. Lewis AM, Varghese S, Xu H, Alexander HR (2006) Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment. J Transl Med 4: 48.
- 280. Dinarello CA (2010) Why not treat human cancer with interleukin-1 blockade? Cancer Metastasis Rev 29: 317-329.
- 281. Ghiringhelli F, Bruchard M, Apetoh L (2013) Immune effects of 5-fluorouracil: Ambivalence matters. Oncoimmunology 2: e23139.
- 282. Bruchard M, Mignot G, Derangere V, Chalmin F, Chevriaux A, et al. (2013) Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the NIrp3 inflammasome and promotes tumor growth. Nat Med 19: 57-64.
- 283. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, et al. (2007) Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. Nat Immunol 8: 950-957.
- 284. Fettelschoss A, Kistowska M, LeibundGut-Landmann S, Beer HD, Johansen P, et al. (2011) Inflammasome activation and IL-1beta target IL-1alpha for secretion as opposed to surface expression. Proc Natl Acad Sci U S A 108: 18055-18060.
- 285. Foucher ED, Blanchard S, Preisser L, Descamps P, Ifrah N, et al. (2015) IL-34- and M-CSF-induced macrophages switch memory T cells into Th17 cells via membrane IL-1alpha. Eur J Immunol 45: 1092-1102.
- 286. Miyahara Y, Odunsi K, Chen W, Peng G, Matsuzaki J, et al. (2008) Generation and regulation of human CD4+ IL-17-producing T cells in ovarian cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 105: 15505-15510.
- 287. Romagnani S, Maggi E, Liotta F, Cosmi L, Annunziato F (2009) Properties and origin of human Th17 cells. Mol Immunol 47: 3-7.
- 288. Cosmi L, De Palma R, Santarlasci V, Maggi L, Capone M, et al. (2008) Human interleukin 17producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor. J Exp Med 205: 1903-1916.
- 289. Liu H, Rohowsky-Kochan C (2008) Regulation of IL-17 in human CCR6+ effector memory T cells. J Immunol 180: 7948-7957.
- 290. van Beelen AJ, Zelinkova Z, Taanman-Kueter EW, Muller FJ, Hommes DW, et al. (2007) Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. Immunity 27: 660-669.
- 291. Dinarello CA (1991) Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. Blood 77: 1627-1652.
- 292. Labadia M, Faanes RB, Rothlein R (1990) Role of adherence vs. spreading in the induction of membrane-associated interleukin-1 on mouse peritoneal macrophages. J Leukoc Biol 48: 420-425.

- 293. Orjalo AV, Bhaumik D, Gengler BK, Scott GK, Campisi J (2009) Cell surface-bound IL-1alpha is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network. Proc Natl Acad Sci U S A 106: 17031-17036.
- 294. Dinarello CA (2012) Membrane interleukin-18 revisits membrane IL-1alpha in T-helper type 1 responses. Eur J Immunol 42: 1385-1387.
- 295. Bellora F, Castriconi R, Doni A, Cantoni C, Moretta L, et al. (2012) M-CSF induces the expression of a membrane-bound form of IL-18 in a subset of human monocytes differentiating in vitro toward macrophages. Eur J Immunol 42: 1618-1626.
- 296. Gabay C, Lamacchia C, Palmer G (2010) IL-1 pathways in inflammation and human diseases. Nat Rev Rheumatol 6: 232-241.
- 297. Conforti-Andreoni C, Spreafico R, Qian HL, Riteau N, Ryffel B, et al. (2011) Uric acid-driven Th17 differentiation requires inflammasome-derived IL-1 and IL-18. J Immunol 187: 5842-5850.
- 298. Niki Y, Yamada H, Seki S, Kikuchi T, Takaishi H, et al. (2001) Macrophage- and neutrophil-dominant arthritis in human IL-1 alpha transgenic mice. J Clin Invest 107: 1127-1135.
- 299. Foucher ED, Blanchard S, Preisser L, Garo E, Ifrah N, et al. (2013) IL-34 induces the differentiation of human monocytes into immunosuppressive macrophages. antagonistic effects of GM-CSF and IFNgamma. PLoS One 8: e56045.
- 300. Mills KH, Dungan LS, Jones SA, Harris J (2013) The role of inflammasome-derived IL-1 in driving IL-17 responses. J Leukoc Biol 93: 489-497.
- 301. Sutton CE, Lalor SJ, Sweeney CM, Brereton CF, Lavelle EC, et al. (2009) Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. Immunity 31: 331-341.
- 302. Martin F, Apetoh L, Ghiringhelli F (2012) Controversies on the role of Th17 in cancer: a TGF-betadependent immunosuppressive activity? Trends Mol Med 18: 742-749.
- 303. Greten TF, Zhao F, Gamrekelashvili J, Korangy F (2012) Human Th17 cells in patients with cancer: Friends or foe? Oncoimmunology 1: 1438-1439.
- 304. Ji Y, Zhang W (2010) Th17 cells: positive or negative role in tumor? Cancer Immunol Immunother 59: 979-987.
- 305. Zielinski CE, Mele F, Aschenbrenner D, Jarrossay D, Ronchi F, et al. (2012) Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN-gamma or IL-10 and are regulated by IL-1beta. Nature 484: 514-518.
- 306. Wei L, Laurence A, Elias KM, O'Shea JJ (2007) IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner. J Biol Chem 282: 34605-34610.
- 307. Sallusto F, Zielinski CE, Lanzavecchia A (2012) Human Th17 subsets. Eur J Immunol 42: 2215-2220.
- 308. Savage ND, de Boer T, Walburg KV, Joosten SA, van Meijgaarden K, et al. (2008) Human antiinflammatory macrophages induce Foxp3+ GITR+ CD25+ regulatory T cells, which suppress via membrane-bound TGFbeta-1. J Immunol 181: 2220-2226.
- 309. Banchereau J, Pascual V, O'Garra A (2012) From IL-2 to IL-37: the expanding spectrum of antiinflammatory cytokines. Nat Immunol 13: 925-931.
- 310. Bezie S, Picarda E, Ossart J, Tesson L, Usal C, et al. (2015) IL-34 is a Treg-specific cytokine and mediates transplant tolerance. J Clin Invest 125: 3952-3964.
- 311. Brocheriou I, Maouche S, Durand H, Braunersreuther V, Le Naour G, et al. (2011) Antagonistic regulation of macrophage phenotype by M-CSF and GM-CSF: implication in atherosclerosis. Atherosclerosis 214: 316-324.
- 312. Gliniak BC, Rohrschneider LR (1990) Expression of the M-CSF receptor is controlled posttranscriptionally by the dominant actions of GM-CSF or multi-CSF. Cell 63: 1073-1083.
- 313. Gliniak BC, Park LS, Rohrschneider LR (1992) A GM-colony-stimulating factor (CSF) activated ribonuclease system transregulates M-CSF receptor expression in the murine FDC-P1/MAC myeloid cell line. Mol Biol Cell 3: 535-544.
- 314. Espinoza-Delgado I, Longo DL, Gusella GL, Varesio L (1990) IL-2 enhances c-fms expression in human monocytes. J Immunol 145: 1137-1143.





# Thèse de Doctorat

## Etienne FOUCHER

Génération et fonctions des macrophages immunorégulateurs

**Generation and functions of immunoregulatory macrophages** 

#### Résumé

Selon les facteurs solubles de l'environnement (cytokines), les monocytes peuvent se différencier en macrophages (M $\phi$ ) ou en cellules dendritiques. Mes travaux de thèse montrent que l'IL-34, un second ligand du M-CSF-R (c-fms ou CD115), induit la différenciation de monocytes humains en macrophages CD14<sup>+</sup> CD163<sup>+</sup> (IL-34-M $\phi$ ), phénotypiquement et fonctionnellement similaires aux M-CSF-M $\phi$  et aux macrophages associés aux tumeurs (TAM) isolés du cancer de l'ovaire. Ils possèdent des propriétés immunosuppressives et diminuent la prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> activés.

Comme les M $\phi$  orchestrent la réponse immunitaire, j'ai évalué la capacité des M-CSF-M $\phi$ , IL-34-M $\phi$  et des TAM à polariser les LT CD4<sup>+</sup> mémoires. Les résultats montrent qu'ils polarisent des LT non-Th17 mémoires en LTh17 CCR4<sup>+</sup> CCR6<sup>+</sup> CD161<sup>+</sup> conventionnels exprimant ou non de l'IFN $\gamma$ . Ce processus est médié par l'expression constitutive de l'IL-1 $\alpha$  membranaire exprimées sur ces macrophages.

Dans le but d'identifier des stratégies pour prévenir l'accumulation de ces M $\phi$  dans le cancer, j'ai montré que (i) l'IFN $\gamma$  et le GM-CSF inhibent la différenciation des M-CSF-M $\phi$  et IL-34-M $\phi$  et que (ii) l'IFN $\gamma$  permet la réversion des M-CSF-M $\phi$  et IL-34-M $\phi$  en M $\phi$  immunostimulants.

En conclusion, mes travaux montrent que les M-CSF-M $\phi$ , IL-34-M $\phi$  et les TAM, considérés initialement comme anti-inflammatoires, induisent la génération de lymphocytes Th17 via une expression constitutive de l'IL-1 $\alpha$ . Ce processus pourrait contribuer à maintenir, localement, une inflammation modérée nécessaire au développement tumoral.

Mots clés IL-34, Macrophage, TAM, propriétés immunosuppressives, Th17, IL-1α.

### Abstract

According to the soluble factors in the environment (cytokines), monocytes differentiate into macrophages (M $\phi$ ) or dendritic cells. This project demonstrates that IL-34, a second ligand of the M-CSF receptor (c-fms or CD115), induces the differentiation of human monocytes into CD14<sup>high</sup> CD163<sup>high</sup> M $\phi$  (IL-34-M $\phi$ ), phenotypically and functionally similar to M-CSF-M $\phi$  and to tumorassociated macrophages (TAM) isolated from the ovarian cancer. They exhibit potent immunosuppressive properties and decrease the proliferation of stimulated T cells.

As M $\phi$  orchestrate the immune response, I have evaluated the capacity of M-CSF-M $\phi$ , IL-34-M $\phi$  and TAM to polarize human memory CD4<sup>+</sup> T cells. Unexpectedly, results showed that they switch non-Th17 memory CD4<sup>+</sup> T cells into conventional CCR4<sup>+</sup> CCR6<sup>+</sup> CD161<sup>+</sup> Th17 cells, expressing or not IFN $\gamma$ . This process is mediated by the constitutive expression of membrane IL-1 $\alpha$  on these M $\phi$  subsets.

In an attempt to identify strategies to prevent an accumulation of immunomodulatory  $M\phi$  in cancer, I have shown that (i) IFN<sub>Y</sub> and GM-CSF prevent M-CSFand IL-34-induced monocyte differentiation into immunosuppressive  $M\phi$  and (ii) that IFN<sub>Y</sub> switches established M-CSF-M $\phi$  and IL-34-M $\phi$  into immunostimulatory M $\phi$ .

In conclusion, this study demonstrates that human M-CSF-M $\phi$ , IL-34-M $\phi$  and TAM initially considered as antiinflammatory cells, induce in vitro Th17 cell generation via a constitutive expression of membrane IL-1 $\alpha$ . This process may contribute to maintain locally a restrained and smoldering inflammation required for angiogenesis and metastasis in tumors.

#### Key Words

IL-34, Macrophage, TAM, immunosuppressive properties, Th17, IL-1 $\alpha$ .