



HAL
open science

Caractérisation des neutrophiles circulants et associés aux tumeurs aux stades précoces et tardifs de la tumorigenèse

Pacôme Lecot

► **To cite this version:**

Pacôme Lecot. Caractérisation des neutrophiles circulants et associés aux tumeurs aux stades précoces et tardifs de la tumorigenèse. Immunothérapie. Université de Lyon, 2020. Français. NNT : 2020LYSE1147 . tel-03351405

HAL Id: tel-03351405

<https://theses.hal.science/tel-03351405>

Submitted on 22 Sep 2021

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.



N° d'ordre NNT : 2020LYSE1147

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 340
(Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire)

Spécialité de doctorat : Biologie moléculaire et cellulaire
Discipline : Immuno-oncologie

Soutenue publiquement le 25/09/2020, par :

Pacôme LECOT

**Caractérisation des neutrophiles circulants
et associés aux tumeurs aux stades
précoces et tardifs de la tumorigenèse**

Devant le jury composé de :

- **Dr. Jean-Jacques FOURNIE** Rapporteur
DRCE CNRS, ERL 5294 - CRCT, Toulouse
- **Dr. Catherine PAUL** Rapporteur
Directeur d'études, EA7269 - LIIC EPHE, Dijon
- **Dr. Véronique BRAUD** Examinatrice
DR2 CNRS, UMR 7275 - IPMC, Nice
- **Pr. Caroline MOYRET-LALLE** Examinatrice
PU, UMR5286 - CRCL, Lyon
- **Dr. Julien CHERFILS-VICINI** Examineur
CRCN CNRS, UMR 7284 - IRCAN, Nice

- **Dr. Marie-Cécile MICHALLET** Directrice de thèse
CRCN CNRS, UMR 5286 - CRCL, Lyon

**Caractérisation des neutrophiles circulants et
associés aux tumeurs aux stades précoces et tardifs
de la tumorigenèse**

Neutrophiles et Cancer

REMERCIEMENTS

Je tenais tout d'abord à remercier tous les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse : **Prof. Caroline MOYRET-LALLE** (Présidente du jury), **Dr. Jean-Jacques FOURNIE** (Rapporteur), **Dr. Catherine PAUL** (Rapporteur), **Dr. Véronique BRAUD** (Examinatrice) et **Dr. Julien CHERFILS-VICINI** (Examineur).

Dr. Marie-Cécile MICHALLET, « at a glande », je tenais du fond du cœur à te remercier de m'avoir si bien accompagné scientifiquement en tant que directrice de thèse pendant ces cinq dernières années dans le laboratoire du Dr. Christophe CAUX. Je voulais souligner certaines de tes qualités qui m'ont permis de m'accomplir professionnellement. Ce que j'ai vraiment apprécié chez toi, c'est tout d'abord ton *ouverture d'esprit*. Tu as toujours été ouverte à mes propositions scientifiques, ce qui a réellement rendu ma thèse plus vivante et plus excitante. Ta deuxième qualité est celle du *sens du collectif*. Je pense que tu es la personne qui m'a convaincu plus que tout que tout seul on va plus vite mais ensemble on va plus loin. Certes, c'est souvent plus dur de s'organiser à plusieurs, mais une fois qu'on y arrive, c'est là où on fait quelque chose de grand. Ta troisième qualité, c'est la *persévérance*. J'avais déjà pu appréhender cette notion en tant qu'athlète lorsque j'étais en sport-étude. C'est une qualité que j'ai continué de développer vraiment grâce à toi. Enfin, je voulais souligner ta rigueur qui est un atout incontournable en recherche tant sur le fond que sur la forme. J'ai beaucoup appris sur ce plan là et je t'en remercie. Tu as été bien plus qu'une directrice de thèse pour moi, un réel coach toujours disponible. Un coaching à chaque présentation orale pour donner le meilleur de moi-même. Je retiendrai ce prix de la meilleure présentation orale au Symposium HTE de scRNAseq de Lille en Octobre 2019, après ce matin footing matinal avec toi à 6h00 du matin sous la pluie. Merci à toi d'avoir aussi été présente dans les moments forts de ma vie personnelle, de nous avoir offert ce séjour aux Deux-Alpes à Lucie et moi-même pour fêter nos fiançailles. Et plus récemment merci d'avoir été là pour notre mariage. Merci de la confiance que tu m'as accordé, merci à toi pour cette belle aventure scientifique et humaine qui aujourd'hui me rend fier de ce que j'ai accompli et surtout heureux dans ma vie.

Dr. Christophe CAUX, merci à toi de m'avoir accepté dans ton laboratoire et de la confiance que tu m'as accordé. Merci de m'avoir aidé à mener à bien mes projets de thèse. Merci pour ton écoute et ton ouverture d'esprit.

Anaïs, ma co-thésarde alias France Gall ou Ananas. Ce fut un réel plaisir de partager ces cinq années avec toi dans ce laboratoire. Pas facile cette aventure de thèse, mais on y est arrivé. Tu l'auras mérité ce massage post-thèse au Spa QC Therme face au Mont Blanc. Prends soin de toi. « Allez je me casse »...

Maude, merci à toi pour tes conseils sur le plan bio-informatique. Merci de ton implication dans mon article de thèse.

Céline, merci de ta rigueur pour le maniement de la pipette !! Non sérieux, ce fut un réel plaisir de travailler avec toi. Ta bonne humeur est un atout formidable dans ce labo !!

Paola, Ce fut un grand plaisir de travailler avec toi. Ta bonne humeur et ta joie de vivre font de toi une belle personne. Merci pour l'initiation au Hockey subaquatique. C'était génial !! Et bon courage pour la suite chez DepilTech.

Lyvia, tu te rends compte, déjà cinq ans qu'on se connaît. Que de bons souvenirs que je garde de toi. Merci de m'avoir appris à rédiger un vrai protocole de manip. Un sens de la rigueur exemplaire. Merci d'avoir été présente le jour de notre mariage. J'espère que Christian s'est remis de mes amis qui n'avais pas de maison et qui dormaient sous tente, le week-end du mariage, lol !! Sinon, oui je te dois plein de fondants au chocolat, promis tu les auras.

Aurélien, tout de suite là comme ça, me vient le souvenir des fondants au chocolat chez Marion. « Un bon fondant, ça se déguste,... » Je te laisse compléter. Une tradition à faire perdurer sans modération.

Marion, bon du coup je ne vais pas te ressortir le coup des fondants, mais plutôt celui des huîtres, lol. Ce fut un réel plaisir de travailler avec toi. Bon il faut qu'on se la fasse cette rando en Chartreuse.

Aurélien-Amélien-Aurélien, mon petit lapin, de bons fous rires en pièces culture de souris, n'est-ce pas ?! Plein de belles choses à toi, ta compagne et votre petite pour la suite.

Margaux, si jamais un jour tu as un problème pour sortir ta voiture d'un parking souterrain, tu m'appelles, je serai ravi de pouvoir t'aider. Et molo sur le Champagne quand même, lol !!

Anne-Claire, bon si jamais j'ai besoin d'un truc pour le bébé, je te demanderai.

Dominique, de bons délires en pièces culture de souris quand même, il faut dire que ça rajeunit, non ?

Coline, j'espère que ton post-doc au US se passe bien. Viens nous chercher en avion. Je pars aussi en post-doc au US.

Julie-Mussard, comme pour Margaux, si jamais un jour tu as un problème pour sortir ta voiture d'un parking souterrain, tu m'appelles, je serai ravi de pouvoir t'aider.

Yasmine, bon si jamais tu as une question sur R, il y aura Vincent qui sera bien t'aider. Prend soin de toi et courage pour cette deuxième partie de thèse !!

Valentin, if you want to come to the next TR conference, it is next year, April 26th in Feast Town.

Candice, think like a neutron and stay neutrophil.

Vincent, bon a quand les concours de culturisme. Tu as du potentiel et tu le sais. Alors n'attends plus fonce !!! De chouettes années de thèse passées à tes côtés ! Merci pour tes conseils en bio-info. Je te souhaite de belles aventures pour ta suite en clinique, de bien terminer ta thèse. Allez prends soin de toi ! A bientôt sur un vélo ou sur des skis de rando. Et bon courage pour la suite chez DepilTech.

Hélène, dear Hélène, inutile de rappeler que ce fut une de mes plus belles années de thèse grâce à ta toi lorsque tu as rejoint le laboratoire pour ton stage de M2. A très vite pour de nouvelles aventures outdoor et musicales.

Anthony, merci pour les cours d'italiens. Garde bien des talents de pâtissier ou même plus largement de cuisinier je crois !!

Antoine, bienvenue à toi dans le meilleur sous-groupe du laboratoire du Dr. Christophe CAUX. Et bon courage pour la suite.

Manuela, et bien à mon tour de te dire que tu as été la meilleure étudiante que je n'ai jamais eue. Ne commence pas à prendre la grosse tête, tu es la seule pour l'instant que j'ai encadré. Merci pour ton implication et ton sérieux dans ce beau projet EpCAM. Nous le mènerons à bien !! Et oui, à toi aussi je dois des fondants au chocolat.

Virginie, doucement sur le pinard, ce n'est pas parce que tu habites dans la vallée du Rhône que... Prends soin de toi et bon courage pour la suite chez DepilTech.

Olivia, bon courage pour cette belle thèse. Courage au moment de la relecture par Bertrand, lol !!

Mathilde, je te souhaite tout plein de bonheur dans cette nouvelle vie de maman. Je te souhaite bon vent pour tes nouvelles aventures en cliniques.

Elisa, je te souhaite tout plein de bonheur dans cette nouvelle vie de maman. Tout plein de courage pour cette thèse de science ! ça va être une belle thèse, j'en suis sûr !!!

Arthur, tout comme Manuela, ce fut un réel plaisir de t'avoir encadré pour ton stage de M2. Tu as été mon meilleur étudiant masculin. Merci pour ton abonnement à « Pour la Science », tu m'as permis de me passionner pour l'astronomie sur cette dernière année de thèse de biologie. Peut-être qu'il y a quelque chose à faire en astrobiologie ? Allez, bon courage à toi pour cette belle thèse que tu nous prépares.

Mathieu, ce fut un réel plaisir d'avoir fait un bout de chemin de thèse à tes côtés. Je te souhaite plein de force et de courage pour la fin de cette belle thèse, je n'en doute pas un seul instant. Et encore merci pour l'ordonnance du Repevax.

Pauline, elles sont où ces CD34⁺ ?! Très heureux d'avoir fait ta connaissance, une personnalité bien positive et enthousiaste comme j'aime. Reste comme ça ne change rien, on a besoin de personne comme toi. J'espère bien pouvoir un jour passer chez toi en vélo pour prendre le café et même profitez du jacuzzi ?

Ramdane, quel souvenir inoubliable tu nous auras laissé pour notre mariage avec Lucie. Tes morceaux de piano oriental résonnent encore dans ma tête. Quels beaux souvenirs de notre medley pour la retraite de département IVI 2018 à Autrans : *English man in New-York, Jimmy, I'm in love with the shape of you...* Bon courage pour ta thèse qui sera magnifique, j'en suis sûr !!

Stéphane D, dans quelques mois, je consacrerai tout mon temps à l'étude la sénescence. Tout ce que tu souhaitais pour moi depuis des années. Bon, le jour où je trouve un HERV intéressant associé à la sénescence, je t'appelle !

Sara, merci pour ton aide précieuse dans la lecture anapath de nos coupes de tumeurs. Merci de l'intérêt que tu portes à notre projet MMTV-NeuT.

Merci à tous les autres chefs de sous-groupe (de « groupe », pardon Bertrand) de l'équipe du Dr. Christophe CAUX pour avoir contribué à l'amélioration de mon article de thèse.

A **Lucie**, mon épouse, sans qui je n'aurais jamais pu accomplir tout cela. Merci de la force que tu m'as donné au quotidien jusqu'au à la dernière minute de l'écriture de ce manuscrit. Merci de m'avoir fait confiance dans cette aventure qui va se poursuivre maintenant de l'autre côté de l'atlantique avec notre bébé que nous attendons avec impatience.

À ma famille, toujours présente dans les bons comme dans les mauvais moments. Merci à toi **Maman** pour tout le soutien psychologique et tes paroles toujours positives et réconfortantes. Merci à toi **Papa** d'avoir toujours contribué à maintenir mon équilibre avec le sport. Merci à toi Lorris, mon petit « grand » frère pour ton écoute et ton soutien !!!

À tous mes **amis**, qui m'ont permis de garder un certain équilibre dans cette aventure de thèse.

Merci à tout le personnel du CRCL, merci à toi **Sébastien Dussurgey** de la plateforme de cytométrie de Gerland pour ton implication dans mon article de thèse.

RESUME DE LA THESE EN FRANCAIS

Le neutrophile est la cellule immunitaire la plus abondante dans le sang périphérique chez l'Homme. Alors que son rôle est plutôt bien défini dans les maladies infectieuses et auto-immunes, le neutrophile a récemment été découvert pour être impliqué dans le cancer. Dans une première partie de mon projet de thèse, je me suis intéressé au rôle des neutrophiles circulants chez les patients atteints du cancer du poumon. Une concentration élevée en neutrophiles circulants chez les patients porteurs de tumeurs solides est généralement associée à un mauvais pronostic. A récemment émergé dans la littérature la notion d'hétérogénéité phénotypique des neutrophiles circulants, en particulier dans le cancer. Le but principal de ce projet a été d'identifier une sous-population particulière de neutrophiles pouvant contribuer à la progression du cancer. Les plaquettes ont la capacité d'interagir avec les neutrophiles du sang périphérique créant des agrégats neutrophile-plaquettes (ANP). Cette interaction est documentée pour potentialiser les fonctions effectrices des neutrophiles dans plusieurs pathologies. Cependant, aucune étude à ce jour ne s'était intéressée au rôle des ANP dans le cancer. Grâce à la cytométrie d'image (ImageStream®X), nous avons pu identifier précisément les ANP dans le sang périphérique de patients atteints de cancer du poumon et de donneurs sains. Sur la base de l'expression protéique des marqueurs CD15 et CD14, nous avons montré que les neutrophiles agrégés aux plaquettes étaient différents des neutrophiles libres. Nous avons observé que les plaquettes s'agrégeaient préférentiellement aux neutrophiles de densités faibles (LDN) par opposition aux neutrophiles de densités normales (NDN). En ré-analysant des données transcriptomiques publiques à l'échelle de la cellule unique (scRNAseq) de leukocytes du sang de patients atteints de cancer du poumon (GSE127465) nous avons pu identifier une sous-population de neutrophiles exprimant fortement des gènes plaquettaires, qui semble correspondre aux ANP. Nous avons montré que cette sous-population de neutrophiles possédait un transcriptome bien distinct des autres neutrophiles. Nous avons ainsi pu générer une signature génique spécifique des ANP. Nous avons ensuite cherché à identifier la valeur pronostique de cette signature en utilisant la base de donnée publique TCGA. Nous avons montré que la signature des neutrophiles des ANP était associée à une moins bonne survie des patients atteints de cancer du pancréas et à une meilleure survie dans le mélanome uvéal. Notre étude aura permis de découvrir une nouvelle sous-population de neutrophiles agrégés aux plaquettes qui semble avoir une relevance clinique dans le microenvironnement tumoral.

Présent au sein de la masse tumorale, plusieurs évidences ont montré que les neutrophiles associés aux tumeurs (« TAN » en anglais) pouvaient empêcher la progression du cancer au stade précoce de la tumorigenèse ou au contraire la promouvoir au stade tardif. Cependant, la caractérisation phénotypique des TAN au stade précoce ou tardif de la

tumorigenèse reste encore très limitée à ce jour. Dans un deuxième axe de ma thèse, nous avons étudié l'hétérogénéité des TAN, tout au long de la tumorigenèse dans le modèle murin MMTV-NeuT de tumeurs mammaires spontanées. Nous avons pu mettre en évidence sur la base de marqueurs issus de la littérature, la présence de deux sous-populations de TAN spécifiques des stades tardifs que sont les TAN siglecF⁺ et les TAN CMH-II⁺ PD-L1⁺. De manière intéressante, nous avons observé que la plupart des TAN exprimaient à leur surface le marqueur de cellule épithélial « EpCAM » et que l'expression de celui-ci était spécifique des TAN par rapport aux neutrophiles de la rate et de la moelle osseuse. De plus, EpCAM est exprimé à la surface des TAN dès les stades le plus précoces de la tumorigenèse mammaire. En analysant des données transcriptomiques publiques de TAN issus de tumeurs murines pulmonaires, nous avons mis en évidence que le gène EpCAM n'était pas exprimé de manière endogène par les TAN. Ceci suggère que l'expression d'EpCAM à la surface des TAN résulterait de la « trogocytose » de cellules épithéliales tumorales bien que cela reste à être démontré dans de futures investigations.

THESIS ABSTRACT IN ENGLISH

Neutrophil is the most abundant immune cell type in human peripheral blood. Whereas its role is well defined in infectious and auto-immune diseases, neutrophil has recently been discovered to be involved in cancer. As the first part of my PhD thesis, I studied the role of circulating neutrophils in lung cancer patients. An elevated concentration of circulating neutrophils in cancer patients with solid tumors is usually associated with a poorer prognosis. Recently emerged from the literature, the concept of phenotypic heterogeneity applied to circulating neutrophils, in particular in cancer. The main goal of this project was to identify a subset of neutrophils that could contribute to cancer progression. Platelets are used to interact with neutrophils in peripheral blood, forming neutrophil-platelet aggregates (NPA). This interaction was documented to enhance effector functions of neutrophils in various pathologies. Nevertheless, no studies have yet studied the role of NPA in cancer. Through imaging flow cytometry (ImageStream®X), we could precisely identify NPA in lung cancer patients and healthy donors' peripheral blood. Based on protein expression of CD15 and CD14 markers, we could showed that neutrophils aggregated to platelets were different from free neutrophils. We showed that platelets preferentially bound to low-density neutrophils (LDN), as opposed to normal-density neutrophils (NDN). By re-analyzing public single cell transcriptomic data (scRNAseq) of lung cancer patients' leukocytes from whole blood (GSE127465), we could identify a subset of neutrophils that highly expressed platelet genes that may correspond to NPA. We could showed that this subset of neutrophil possessed a specific molecular signature as compared with the other neutrophil subsets. We next evaluated the pronostique impact of NPA specific signature using the TCGA database. We could show that this signature was associated with a poorer

prognosis in pancreas cancer patients but with a better overall survival in uveal melanoma. Our study have shedded light on a new subset of neutrophil aggregated to platelets that seem to be clinically relevant in tumor microenvironment.

Present in the tumor microenvironment, several evidence have shown that tumor-associated neutrophils (termed « TAN ») could prevent cancer progression at early-stage of tumorigenesis or in contrast promote it at late-stage of tumorigenesis. Nevertheless, phenotypic characterisation of TAN at early and late-stage of tumorigenesis remains limited. As the second part of my PhD thesis, I studied TAN heterogeneity throughout tumorigenesis in a MMTV-NeuT murin model of spontaneous breast tumors. We found based on markers identified in the literature the presence of 2 subsets of TAN that were specific to late-stage tumors, which are siglecF⁺ TAN and CMH-II⁺ PD-L1⁺ TAN. Interestingly, we could observed that most of TAN expressed at their surface the epithelial cell marker « EpCAM » and that its expression was restricted to TAN compared with neutrophils from spleen and bone marrow. Moreover, EpCAM was expressed at the cell-surface of TAN as soon as the earliest stage of breast tumorigenesis. By re-analyzing public transcriptomic data of TAN from lung tumors, we could show that EpCAM gene was not endogenously expressed by TAN. This suggests that EpCAM expression at the cell-surface of TAN would result from « trogocytosis » of tumor epithelial cells, although it remains to be demonstrated in future investigations.

TABLE DE MATIERES

LISTE DES FIGURES, TABLEAUX ET ANNEXES	15
LISTE DES ABREVIATIONS	17
PREFACE	19
INTRODUCTION	25
CHAPITRE 1 : Développement et hétérogénéité des neutrophiles dans les conditions homéostatiques et pathologiques	26
1.1 Rôles physiologiques des neutrophiles dans les infections et processus d'inflammation	26
1.1.1 Processus de recrutement des neutrophiles au site infectieux	26
1.1.1.1 L'attache	26
1.1.1.2 Le roulement	26
1.1.1.3 L'adhésion	26
1.1.1.4 Le « crawling »	27
1.1.1.5 La migration trans-endothéliale	27
1.1.2 Mécanismes de défenses antibactériens	28
1.1.2.1 La phagocytose	28
1.1.2.2 La production de molécules antibactériennes	28
1.1.2.3 Les productions de NET	29
1.2 La granulopoïèse médullaire	30
1.3 Régulation de la granulopoïèse médullaire	32
1.4 La granulopoïèse extra-médullaire	34
1.5 Sous-populations de neutrophiles	35
1.5.1 Les neutrophiles de faible densité (LDN)	35
1.5.2 Les neutrophiles « âgés » CXCR4 ⁺ CD62L ^{low}	37
1.5.3 Les neutrophiles CD177 ⁺	39
1.5.4 Les neutrophiles « hyper-segmentés » CD11c ^{bright} CD62L ^{dim} CD11b ^{bright} CD16 ^{bright}	39
1.5.5 Neutrophiles exprimant les gènes de réponse à l'interféron au niveau transcriptomique	40
1.6 Les récepteurs activateurs et inhibiteurs des neutrophiles	42
1.6.1 Les récepteurs activateurs	42
1.6.1.1 Les récepteurs couplés au protéines-G	42
1.6.1.2 Les récepteurs Fc.....	43
1.6.1.2.1 FcγRIIIB (CD16B).....	43
1.6.1.2.2 FcγRIIIA (CD16A).....	44
1.6.1.2.3 FcγRIIA (CD32A).....	44
1.6.1.2.4 FcγRI (CD64)	44
1.6.1.2.5 FcαRI (CD89)	45
1.6.1.3 La famille des récepteurs à l'IL-1 et à l'IL-18.....	45
1.6.1.4 Le récepteur au TNF	46
1.6.1.5 Les récepteurs aux TGF-β	46
1.6.1.6 Les récepteurs « Toll-like » (TLR).....	46
1.6.1.7 Les lectines de type-C.....	47
1.6.1.8 TREM	48
1.6.1.9 OSCAR.....	48
1.6.1.10 CEACAM3	49
1.6.2 Les récepteurs inhibiteurs	50
1.6.2.1 FcγRIIB (CD32B).....	50
1.6.2.2 CEACAM-1	50
1.6.2.3 SIRPα.....	51
1.6.2.4 SIGLEC-5 et SIGLEC-9.....	51
1.7 Les agrégats neutrophiles-plaquettes (ANP)	53
1.7.1 Impact de l'agrégation plaquettaire sur les fonctions des neutrophiles.....	53
1.7.1.1 Augmentation des capacités d'extravasation des neutrophiles	53
1.7.1.2 Stimulation des fonctions pro-inflammatoires des neutrophiles	54

1.7.2 Méthodes pour visualiser les ANP	55
1.7.2.1 Cytométrie en flux « classique » et cytométrie en image (ImageStream®X)	56
1.7.2.2 Immunohistochimie <i>in situ</i>	56
1.7.2.3 Microscopie intravitale	57
1.7.2.4 Système microfluidique	57
1.7.3 Origines de la formation des ANP	57
1.7.3.1 Formation des ANP dépendante de l'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales	58
1.7.3.2 Formation des ANP indépendante de l'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales	58
1.7.4 Récepteurs/ligands impliqués dans l'interaction entre le neutrophile et la plaquette ainsi que leurs inhibiteurs	59
1.7.4.1 Le couple sélectine-P/PSGL-1 ou CD15 ou CD24	59
1.7.4.2 Le couple Glycoprotéine Iba (GPIb α)/MAC-1	60
1.7.4.3 Le couple intégrines α IIb β 3/MAC-1	61
1.7.4.4 Le couple molécules d'adhésion jonctionnelle-3 (JAM-3)/MAC-1	61
1.7.4.5 Le couple intégrine α L β 2 (aussi connu sous le nom de LFA-1)/ICAM-2	62
CHAPITRE 2 : Rôle des neutrophiles dans le cancer	63
2.1 Évaluation de l'impact pronostique des neutrophiles	63
2.1.1 Neutrophiles, MDSC, G-MDSC ou PMN-MDSC : un consensus ?	63
2.1.2 Impact pronostique des neutrophiles dans le sang périphérique	64
2.1.3 Impacts pronostiques des neutrophiles dans les tumeurs précoces et tardives ...	66
2.1.4 Outils permettant de quantifier l'abondance en TAN à partir de données transcriptomiques de masses tumorales	68
2.1.4.1 MCP counter	68
2.1.4.2 ssGSEA	69
2.1.4.3 CIBERSORT	70
2.2 Hétérogénéité des neutrophiles dans le cancer	73
2.2.1 Dans le sang périphérique	73
2.2.1.1 Les neutrophiles de faible densité (LDN)	73
2.2.1.2 Les neutrophiles immatures	74
2.2.2 Dans la tumeur	75
2.2.2.1 Les neutrophiles LOX-1	75
2.2.2.2 Neutrophiles immatures/matures	75
2.3 Mécanismes pro-tumoraux des neutrophiles dans les tumeurs avancées	76
2.3.1 Promotion de la prolifération des cellules tumorales	76
2.3.2 Inhibition des effecteurs de l'immunité anti-tumorale	77
2.3.3 Processus de dissémination des cellules métastatiques	78
2.3.4 Rôle dans l'angiogenèse	80
2.4 Mécanismes anti-tumoraux des neutrophiles dans les tumeurs précoces	81
2.4.1 Cytotoxicité directe des neutrophiles sur les cellules tumorales	81
2.4.2 Détachement des cellules tumorales de la membrane basale	82
2.4.3 Stimulation de l'immunité adaptative anti-tumorale	83
2.4.3.1 Coopération avec les plasmocytes	83
2.4.3.2 Coopération avec les lymphocytes T	84
CHAPITRE 3 : Une place pour les neutrophiles dans l'immunothérapie de demain en oncologie	85
3.1 Inhibition de la sortie des neutrophiles de la moelle osseuse et de l'entrée des neutrophiles au site tumoral	87
3.1.1 Modulation de l'axe G-CSF/IL-17	87
3.1.2. Inhibition de CXCR2/CXCR4	87
3.1.3 Inhibition de c-MET	88
3.2 Élimination des neutrophiles	89
3.2.1 Anticorps agonistes de TRAIL-R2	89
3.2.2 Chimiothérapies	90
3.3 Diminution des fonctions pro-tumorales des neutrophiles inhibant la prolifération des lymphocytes T cytotoxiques	90
3.3.1 Inhibition de l'arginase 1	90
3.3.2 Inhibition des tyrosines kinases	91

3.3.3 Blocage de C5aR	91
3.3.4 Inhibition de STAT3	92
3.3.5 Inhibition des transporteurs lipidiques	92
3.3.6 Fas-Fc soluble	93
3.4 Inhibition des fonctions pro-tumorales des neutrophiles favorisant la prolifération et la migration des cellules cancéreuses.....	93
3.4.1 Inhibition de la netose	93
3.4.2 Inhibition de l'arachidonate 5-Lipoxygenase (Alox5).....	94
3.4.3 Blocage de l'interaction entre les neutrophiles et les cellules circulantes tumorales	94
3.5 Promotion des fonctions anti-tumorales des neutrophiles	95
3.5.1 Cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (ADCC).....	95
3.5.2 Stimulation de la production de ROS par les neutrophiles dans les tumeurs précoces.....	95
3.5.2.1 Production de ROS par levée de l'hypoxie tumorale	95
3.5.2.2 Augmentation de la production de ROS par l'inhibition de la voie de signalisation du TGFβ	96
3.5.3 Blocage des récepteurs inhibiteurs des neutrophiles.....	97
OBJECTIFS DE LA THESE	98
RESULTATS	99
ARTICLE DE THESE.....	100
« Les neutrophiles circulants liés aux plaquettes possèdent une signature transcriptomique distincte qui est associée au pronostic du patient dans certains types de tumeurs ».....	100
Caractérisation des neutrophiles au cours de la tumorigenèse de la glande mammaire dans le modèle murin MMTV-NeuT.....	150
DISCUSSION.....	161
ANNEXES.....	171
Annexe 1. Caractérisation des neutrophiles au cours de la tumorigenèse de la glande mammaire dans le modèle murin MMTV-NeuT - Matériels et méthodes.....	172
Annexe 2. Revue sur les neutrophiles dans le cancer.	173
Annexe 3. Revue sur les effets de la senescence dans le cancer.....	193
Annexe 4. Article sur le phénotype sécrétoire particulier des cellules sénescents induites par un dysfonctionnement mitochondrial.....	199
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	232

LISTE DES FIGURES, TABLEAUX ET ANNEXES

FIGURES

Figure 1. Concept d'immunoediting.

Figure 2. Chronologie des découvertes majeures concernant les rôles anti et pro-tumoraux des neutrophiles et leurs caractérisations à l'échelle transcriptomique dans le cancer.

Figure 3. Processus de recrutement des neutrophiles au site infectieux.

Figure 4. Mécanismes de défense antibactériens.

Figure 5. La granulopoïèse médullaire chez l'Homme.

Figure 6. Régulation de la granulopoïèse médullaire en contextes physiologiques et pathologiques.

Figure 7. Les récepteurs activateurs et inhibiteurs des neutrophiles.

Figure 8. Rôles des ANP en contextes physiopathologiques.

Figure 9. Origines de la formation des ANP.

Figure 10. Récepteurs/ligands impliqués dans l'interaction entre le neutrophile et la plaquette ainsi que leurs inhibiteurs.

Figure 11. Mécanismes pro-tumoraux des neutrophiles présents dans les tumeurs avancées.

Figure 12. Les neutrophiles escortent les cellules tumorales circulantes dans la circulation sanguine.

Figure 13. Mécanismes anti-tumoraux des neutrophiles présents dans les tumeurs précoces.

Figure 14. Stratégies thérapeutiques basées sur les neutrophiles.

Figure 15. Hypothèses tentant d'expliquer l'agrégation préférentielle des plaquettes sur les LDN par rapport aux NDN.

TABLEAUX

Tableau 1. Les sous-populations de neutrophiles en contextes physiopathologiques.

Tableau 2. Impacts pronostiques des TAN dans les tumeurs précoces et tardives.

Tableau 3. Méthodes de quantification des neutrophiles à partir de données transcriptomiques de bulk tumoral.

Tableau 4. Les sous-populations de neutrophiles dans le sang et la tumeur chez les patients et les souris porteuses de tumeurs.

ANNEXES

Annexe 1. Caractérisation des neutrophiles au cours de la tumorigenèse de la glande mammaire dans le modèle murin MMTV-NeuT - Matériels et méthodes.

Annexe 2. Revue sur les neutrophiles dans le cancer.

Annexe 3. Revue sur les effets de la senescence dans le cancer.

Annexe 4. Article sur le phénotype sécrétoire particulier des cellules sénescents induites par un dysfonctionnement mitochondrial.

LISTE DES ABREVIATIONS

Acronymes	Noms complets
ADCC	Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
alox5	Arachidonate 5-Lipoxygenase
C5a	Complement component 5a
C5aR	Complement component fragment 5a receptor
CCDC25	Coiled-Coil Domain Containing Protein – 25
CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2
CCR2	C-C chemokine receptor type 2
c-MET	hepatocyte growth factor receptor (HGFR)
CSF1	Colony Stimulating Factor 1
CXCL12	C-X-C Motif Chemokine Ligand 12
CXCR2	C-X-C Motif Chemokine Receptor 2
CXCR4	C-X-C Motif Chemokine Receptor 4
DEG	differentially-expressed genes
DHR	Dihydrorodhamine
DNA	Deoxyribonucleic acid
DT	Diphtheria toxin
DTR	diphtheria toxin receptor
EMT	epithelial–mesenchymal transition
ERK	extracellular signal-regulated kinase
Fas-Fc	Recombinant soluble dimers of the Fas death receptor extracellular domain
FPR	Formyl-peptide receptors
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor
G-CSF-R	granulocyte colony-stimulating factor receptor
GEM	Granulopoïèse extra-médullaire
GFP	green fluorescent protein
GMP	Granulocyte-monocyte progenitors
HSC	Hematopoietic stem cells
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
ICAM-2	Intercellular Adhesion Molecule 2
IFN- γ	Interferon gamma
IL-17	Interleukin 17A
IL-8	chemokine (C-X-C motif) ligand 8
ISG	interferon-stimulated gene
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM	immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
JAM-3	Junctional Adhesion Molecule 3
kDA	kilodalton
LDN	Low-density neutrophils
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1
Lin-	Lineage negative
LOX-1	Oxidized low-density lipoprotein receptor 1
LPS	Lipopolysaccharides
LTB4	Leukotriene B4
LUSC	Carcinome épidermoïde du poumon
MAC-1	Macrophage-1 antigen
MCL-1	Induced myeloid leukemia cell differentiation protein

MIP-2	equivalent to CXCL2
MMP9	Matrix metalloproteinase 9
MPO	Myeloperoxidase
NDN	Normal-density neutrophil
NET	Neutrophil extracellular traps
NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NO	Nitric oxide
NOS	nitric oxide synthase
NPA	Neutrophil-platelet aggregates
PECAM	Platelet endothelial cell adhesion molecule
PMA	Phorbol myristate acetate
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reactive oxygen species
scRNAseq	single-cell RNA sequencing
SLE	Systemic lupus erythematosus
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
sTRAIL	Soluble tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand
TAN	tumor-associated neutrophils
TLR	Toll-like receptors
TLR4	Toll-like receptor 4
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
TNP	Triple negative population (CD11b ⁺ Ly6C ⁻ Ly6G ⁻ SiglecF ⁻)
TRAIL	tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand
TRAIL-R2	TRAIL receptor 2
t-SNE	t-distributed stochastic neighbor embedding
VEGF	Vascular endothelial growth factor
viSNE	Visualization of t-SNE results
WT	Wild type

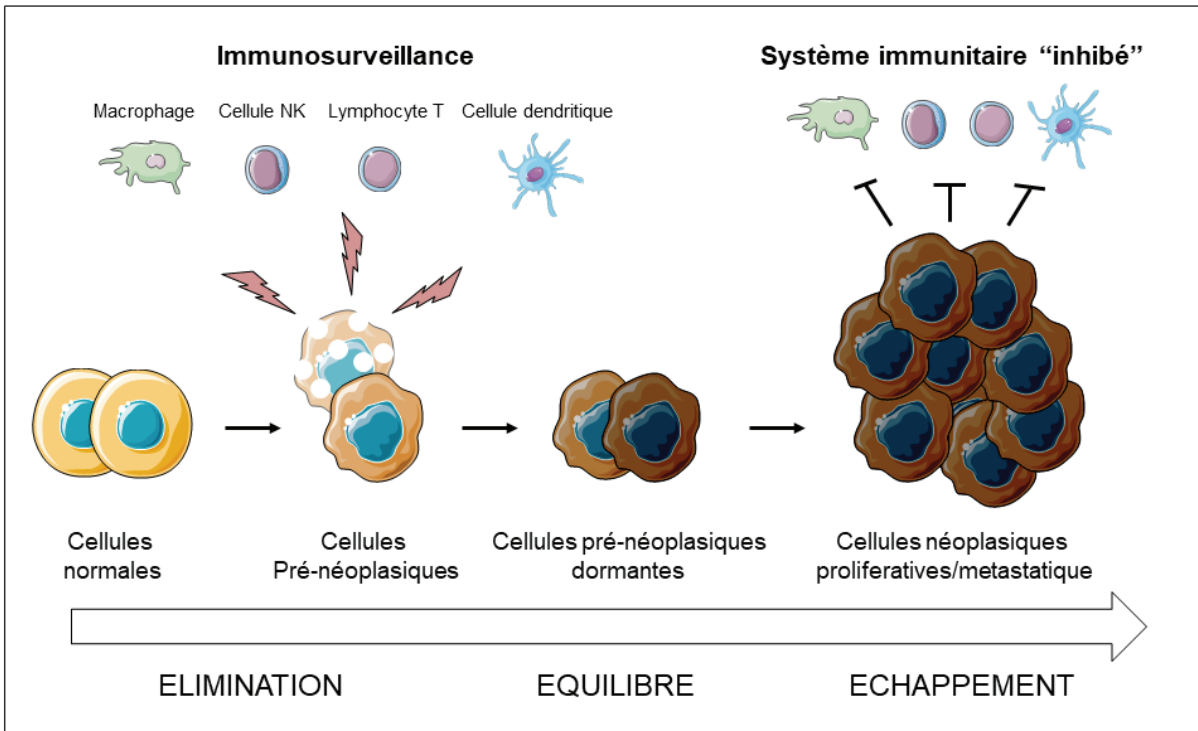
PREFACE

Les **neutrophiles** forment un sous-ensemble de cellules immunitaires de la famille des granulocytes. Il s'agit de la population immunitaire la plus abondante dans le sang périphérique chez l'Homme. Chez un individu adulte sain, le nombre absolu de neutrophiles par microlitre (μl) de sang se situe entre 2500 et 6000. Les neutrophiles font partie des cellules de l'**immunité innée** et jouent un rôle particulièrement important dans la défense de l'hôte contre les **infections bactériennes** ou **fongiques**. À cause de certains traitements ou dans le cas de maladies monogéniques, la concentration en neutrophiles chez les patients peut se retrouver inférieure à 500 neutrophiles/ μl de sang (**neutropénie**) (1, 2). Ces patients présentent alors un risque accru de développer des infections opportunistes (1–5).

Bien que les neutrophiles soient protecteurs contre la plupart des infections bactériennes ou fongiques, ils peuvent à l'inverse favoriser l'initiation et la progression de certaines maladies. C'est notamment le cas pour certaines **maladies auto-immunes**, dans lesquelles l'**activation excessive** ou la **persistance chronique** des neutrophiles conduit à une **inflammation exacerbée** à l'origine de la destruction des tissus avoisinants (6).

Ce rôle protecteur ou pathologique du neutrophile a plus récemment été décrit dans le **cancer**, avec un rôle anti- ou pro-tumoral dépendant du contexte. Cette dualité fonctionnelle anti- ou pro-tumorale des cellules immunitaires associées aux tumeurs s'inscrit dans le concept « d'**immunoediting** » décrit par R. D. Schreiber en 2002 (7) (**Figure 1**). Ce concept comprend 3 phases : au stade précoce du cancer, les cellules pré-néoplasiques en cours de transformation sont rapidement éliminées par les cellules du système immunitaire, il s'agit de la phase d'**ELIMINATION** (appelé aussi phase d'**immunosurveillance**). Cette phase est ensuite suivie de la phase d'**EQUILIBRE** qui se caractérise par la quiescence ou dormance des cellules pré-néoplasiques qui n'ont pas été éliminées par le système immunitaire. Cette phase peut durer plusieurs années chez l'Homme. Enfin à des stades avancés du cancer, lorsque les cellules tumorales ne sont plus efficacement éliminées par le système immunitaire on parle de la phase d'**ECHAPPEMENT**. Le concept d'immunoediting est donc un **processus dynamique** où le système immunitaire peut contraindre (au stade précoce) ou promouvoir (au stade tardif) la progression du cancer.

Figure 1. Concept d'immunoediting.



L'**immunosurveillance** des tumeurs par les neutrophiles associés aux tumeurs TAN (TAN pour « tumor-associated neutrophiles » en anglais) a été mise en évidence pour la première fois en 2007 par l'équipe de Scott W. Lowe dans un modèle murin du cancer du foie (8). Dans cette étude, les auteurs ont pu montrer que l'effet anti-tumoral de la restauration de la sénescence à la suite de la réactivation de l'activité de p53 dépendait en partie des neutrophiles (8). Puis, en 2009, l'équipe de Fridlender a montré dans un modèle de tumeurs transplantées chez la souris, que l'inhibition des voies de signalisation du TGF- β stimulait les propriétés anti-tumorales des TAN (9). En 2015, Blaisdell et son équipe montrent, dans un modèle murin de tumeurs utérines spontanées, un rôle anti-tumoral des neutrophiles aux stades précoces de la tumorigenèse (10). Un peu plus tard, d'autres évidences, chez l'Homme, démontreront que les TAN des tumeurs précoces du poumon possèdent des activités anti-tumorales par la stimulation des lymphocytes T effecteurs (11). De plus, la forte infiltration en neutrophiles dans les tumeurs précoces a été associée à un meilleur pronostic, en particulier dans le cancer colorectal (12). Tous ces éléments suggèrent un rôle majeur, encore mal décrit, des neutrophiles dans l'immunosurveillance des tumeurs précoces chez l'Homme et chez la souris.

De nombreuses évidences ont montré, au cours des dernières décennies, que les neutrophiles pouvaient contribuer à la progression tumorale. En 1995, Pekarek et *al.* ont démontré pour la première fois *in vivo* chez la souris, que la déplétion des cellules exprimant le marqueur de surface membranaire Gr1⁺ (fortement exprimé par les neutrophiles et de

façon moindre sur les monocytes et certaines populations de cellules dendritiques) ralentissait la croissance tumorale, suggérant donc un rôle pro-tumoral des neutrophiles dans le cancer (13). En 2009, par élimination sélective des neutrophiles Ly6G⁺, Fridlender et *al.* ont montré pour la première fois dans un modèle de tumeur transplantée, que les TAN contribuaient à la progression tumorale (9). En 2015, dans des modèles murins spontanés de **métastases** du cancer du sein, on assiste à la description des premiers mécanismes pro-tumoraux des neutrophiles comme la sélection préférentielle des cellules tumorales aux propriétés métastatiques (14) ou l'inhibition de l'activité cytotoxique des lymphocytes (15). Des évidences plus récentes chez l'Homme ont montré que les neutrophiles issus de tumeurs invasives étaient capables de supprimer l'activité cytotoxique des lymphocytes T (16). De plus, chez les patients, la forte infiltration en neutrophiles dans les tumeurs avancées est corrélée à un mauvais pronostic (12). Tous ces résultats sont en faveur d'un rôle des neutrophiles dans l'immuno-échappement à des stades avancés du cancer.

Les fonctions pro-tumorales des neutrophiles sont principalement décrites sur le site de la tumeur primaire ou métastatique. De nouvelles évidences montrent que les neutrophiles pro-tumoraux peuvent exercer leurs fonctions à l'extérieur de la tumeur, en **systemique**. En 2019, Szczerba et *al.* découvrent pour la première fois chez les patientes atteintes du cancer du sein que les cellules tumorales circulantes (CTC) s'associent préférentiellement aux neutrophiles du sang périphérique. Les auteurs ont montré que les neutrophiles associés aux CTC conféraient à ces dernières un avantage de survie mais également de prolifération cellulaire augmentant ainsi leur potentiel métastatique (17). Dans le sang de patients porteurs de tumeurs solides, un nombre absolu élevé de neutrophiles combiné à une faible quantité de lymphocytes (soit un ratio neutrophiles/lymphocytes élevé, « neutrophil-to-lymphocyte ratio » ou **NLR**) est généralement associé à mauvais pronostic des patients pratiquement dans tous les types de cancer (18). Plus récemment, la forte augmentation du **nombre absolu de neutrophiles (ANC** en anglais pour « absolute neutrophil count ») dans le sang périphérique de patients atteints de cancer s'est imposé comme étant un facteur de mauvais pronostic, du moins dans le cancer du poumon (19, 20). Ces évidences récentes suggèrent que les neutrophiles circulants pourraient aussi contribuer à la progression tumorale.

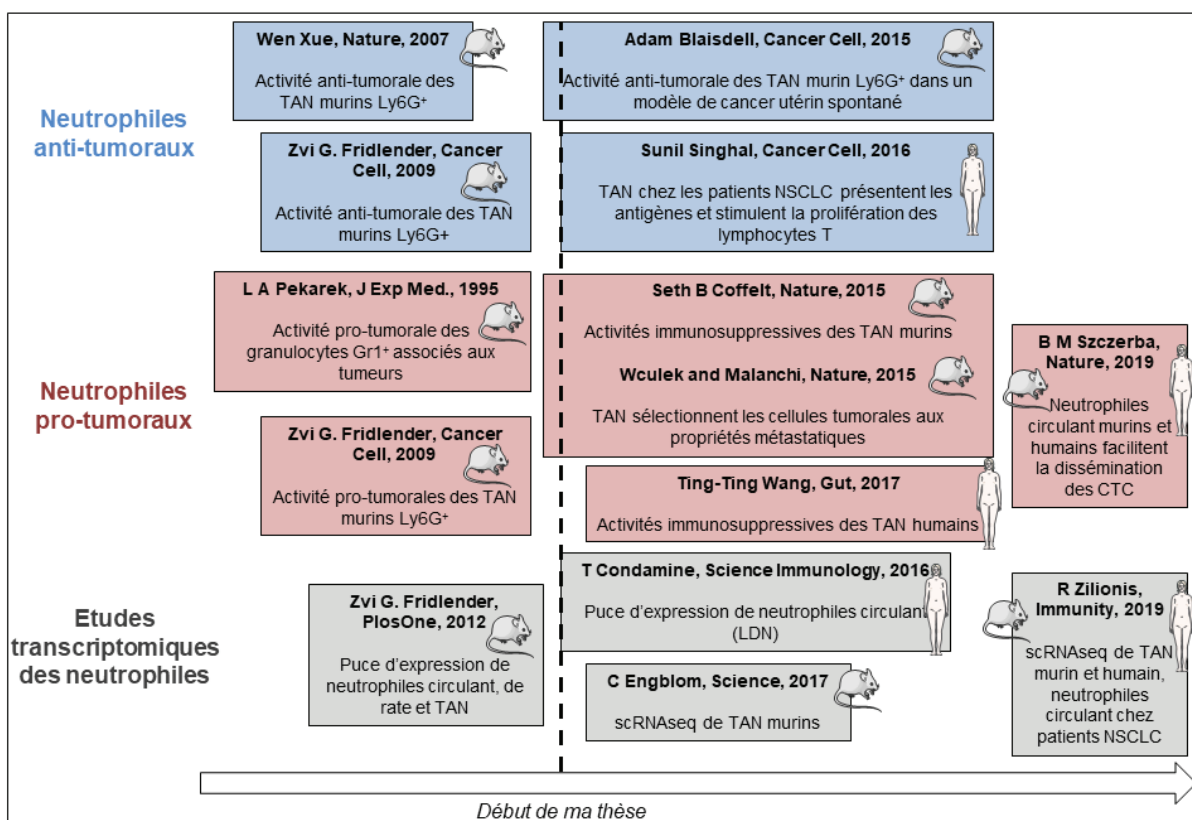
En 2012, on assiste à la première étude transcriptomique (puces d'expression) des neutrophiles dans le contexte du cancer chez la souris (21). En 2016, l'équipe de D. Gabrilovich est la première à caractériser sur le plan transcriptomique (microarray) une sous-population de neutrophiles aux propriétés pro-tumorales (**neutrophiles de faible densité**, appelés « **LDN** » pour « Low Density Neutrophils » en anglais) dans le sang périphérique de patients atteints de cancer de la région tête et cou (HNC) et de cancer du poumon (NSCLC) (22). En 2017, les premières études transcriptomiques des TAN à l'échelle de la cellule

unique (scRNAseq) émergent chez la souris dans un modèle de cancer du poumon (23). Il faut attendre 2019 pour obtenir la première caractérisation en scRNAseq des TAN chez des patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC) (24). Cette étude est également la première à avoir caractérisé en scRNAseq les neutrophiles de sang de patients.

En résumé, sur le plan bibliographique, mon début de thèse en 2016 a coïncidé avec :

- La première démonstration du rôle des TAN dans l'**immunosurveillance des tumeurs précoces** en contexte physiopathologique *in vivo* dans un modèle murin de tumeur spontanée (**Figure 2**).
- La description des **mécanismes anti et pro-tumoraux des TAN** chez l'Homme et la souris (**Figure 2**).
- Le début de la **caractérisation transcriptomique** des neutrophiles du sang et de la tumeur chez l'Homme (**Figure 2**).

Figure 2. Chronologie des découvertes majeures concernant les rôles anti et pro-tumoraux des neutrophiles et leurs caractérisations à l'échelle transcriptomique dans le cancer.



À mon arrivée au laboratoire, des résultats préliminaires obtenus dans le groupe du Dr. Marie-Cécile Michallet (au sein de l'équipe du Dr. Christophe Caux) ont permis de mettre en évidence que les cellules épithéliales mammaires humaines sécrètent des molécules capables d'activer les cellules de l'immunité innée, en particulier les **neutrophiles**, dès les

stades précoces (stress oncogénique) de la tumorigenèse. Mon stage de Master 2 effectué dans le groupe du Dr. Marie-Cécile Michallet a permis de mettre au point un modèle murin de tumeurs mammaires spontanées (modèle MMTV-NeuT en fond BALB/c que nous détaillerons dans la partie résultats) dans le but d'étudier l'**hétérogénéité fonctionnelle** et **phénotypique** des TAN aux stades précoces et tardifs de la tumorigenèse. Toujours dans le but d'étudier l'hétérogénéité des neutrophiles dans le cancer, mais cette fois-ci sur le versant périphérique, nous nous sommes intéressés à la **ré-analyse des premières données transcriptomiques** publiques de neutrophiles isolés à partir du sang périphérique de patients atteints de cancer solides, en particulier dans le cancer du poumon.

En guise d'introduction bibliographique de mon travail de thèse, nous aborderons les 3 chapitres suivants :

1. Développement et hétérogénéité des neutrophiles dans les conditions homéostatiques et pathologiques.
2. Rôles des neutrophiles dans le cancer.
3. Une place pour les neutrophiles dans l'immunothérapie de demain en oncologie.

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 : Développement et hétérogénéité des neutrophiles dans les conditions homéostatiques et pathologiques

Dans ce chapitre nous nous intéresserons à la biologie des neutrophiles tant dans les conditions homéostatiques que pathologiques.

1.1 Rôles physiologiques des neutrophiles dans les infections et processus d'inflammation

1.1.1 Processus de recrutement des neutrophiles au site infectieux

En réponse à une infection, les neutrophiles de la circulation sanguine vont être recrutés au niveau du tissu infecté selon 5 étapes bien distinctes : l'**attache**, le **roulement**, l'**adhésion**, le **rampement** (ou « crawling » en anglais) et la **migration trans-endothéliale** (Figure 3).

1.1.1.1 L'attache

Les agents pathogènes vont activer de manière directe ou indirecte les **cellules endothéliales** des vaisseaux sanguins situés à proximité du tissu infecté. Les cellules endothéliales activées augmentent l'expression des molécules d'adhésion tels que la **sélectine-P** et la **sélectine-E** (25). L'expression constitutive du ligand de ces molécules d'adhésion par les neutrophiles, connu sous le nom de **PSGL1** (26, 27), va entraîner la fixation des neutrophiles à la surface de l'endothélium.

1.1.1.2 Le roulement

Pour favoriser le roulement en douceur des leucocytes, la dissociation de la liaison **sélectine-P/PSGL1** à l'arrière de la cellule doit être équilibrée avec la formation d'une autre liaison à l'avant de la cellule (25).

1.1.1.3 L'adhésion

Les neutrophiles expriment des niveaux élevés d'intégrines **LFA-1** (hétérodimère CD11a/CD18) et **MAC-1** (hétérodimère CD11b/CD18), qui, sous l'effet de l'activation par

l'endothélium, subissent un **changement de conformation** pour se lier à des molécules constitutivement exprimées à la surface des cellules endothéliales, telles que **ICAM-1** et **ICAM-2** (25).

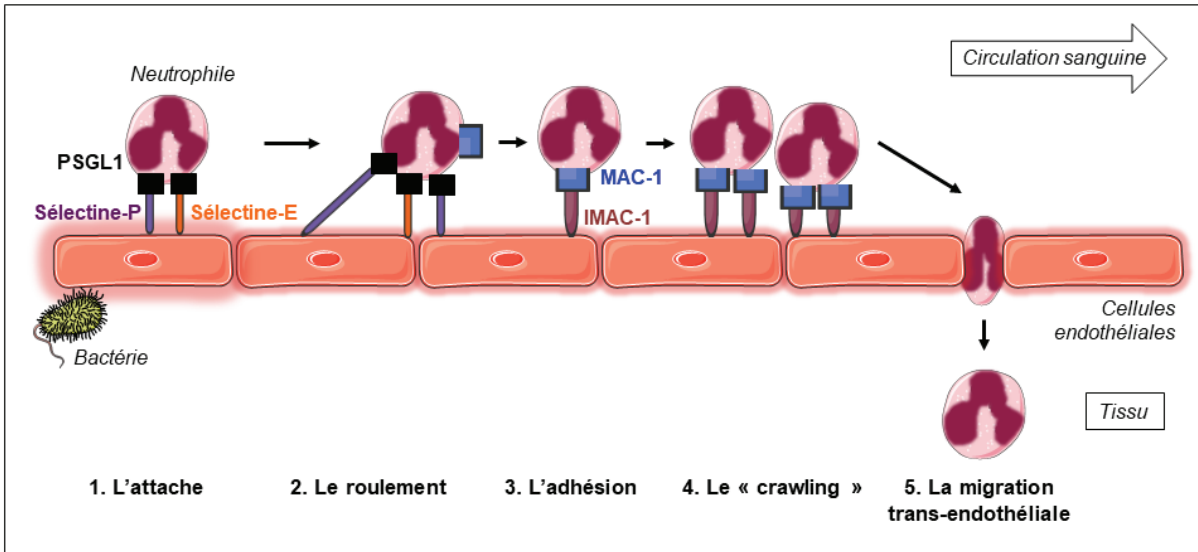
1.1.1.4 Le « crawling »

Le rampement (crawling en anglais) est le processus par lequel leur neutrophile adhérent à l'endothélium se déplace en « rampant » de lui-même sur celui-ci en remaniant de façon organisée son cytosquelette. Ce rampement actif dépend toujours de molécules d'adhésion pour maintenir l'attachement du neutrophile à l'endothélium, notamment grâce à l'interaction entre l'**ICAM-1**, exprimée par les cellules endothéliales, et la **MAC-1**, exprimée par les neutrophiles (28). Il a été montré que plusieurs protéines sont essentielles pour le remaniement du cytosquelette du neutrophile, c'est notamment le cas pour **VAV1** (un facteur d'échange de guanine pour la GTPase RAC de la famille RHO) et la protéine de contrôle de la division cellulaire 42 (**CDC42** ; un régulateur majeur de l'organisation du cytosquelette d'actine pendant la migration des leucocytes) (29).

1.1.1.5 La migration trans-endothéliale

La migration trans-endothéliale (ou **diapédèse**) fait référence au processus que les neutrophiles utilisent pour traverser l'endothélium des vaisseaux sanguins pour se rendre sur le site infecté. Le passage à travers la couche de cellules endothéliales se fait soit **paracellulairement** (entre les cellules endothéliales), soit **transcellulairement** (à travers une cellule endothéliale) (25). *In vitro*, la transmigration paracellulaire se produit préférentiellement aux endroits de l'endothélium où il y a **moins de protéines de jonction** et où l'**alignement des cellules endothéliales est moins bien ordonné** (30, 31).

Figure 3. Processus de recrutement des neutrophiles au site infectieux.



1.1.2 Mécanismes de défenses antibactériens

Une fois arrivés sur le site infectieux, les neutrophiles disposent d'une batterie de mécanismes de défense contre les agents pathogènes. C'est notamment le cas de la phagocytose, de la génération de molécules antibactériennes et de la libération de pièges extracellulaires (appelés NET pour « neutrophil extracellular traps ») (**Figure 4**).

1.1.2.1 La phagocytose

Avant d'être phagocyté par le neutrophile, l'agent pathogène va devoir au préalable être **opsonisé** (32). L'opsonisation est le processus biochimique par lequel deux grandes familles de molécules (les **anticorps** et les **molécules du complément**) vont venir recouvrir la surface du pathogène pour faciliter son interaction avec le neutrophile (32). Cette interaction implique à la surface du neutrophile les **récepteurs Fc** (pour la fixation des anticorps) et les **récepteurs du complément** (pour l'adhésion des molécules du complément) (32). L'activation des récepteurs du neutrophile va conduire à la formation de **pseudopodes** dans le but d'ingérer le pathogène en intracellulaire, formant ainsi un **phagosome** (32). Celui va ensuite être fusionné avec les granules contenant des **molécules antibactériennes** pour la destruction de l'agent infectieux (32).

1.1.2.2 La production de molécules antibactériennes

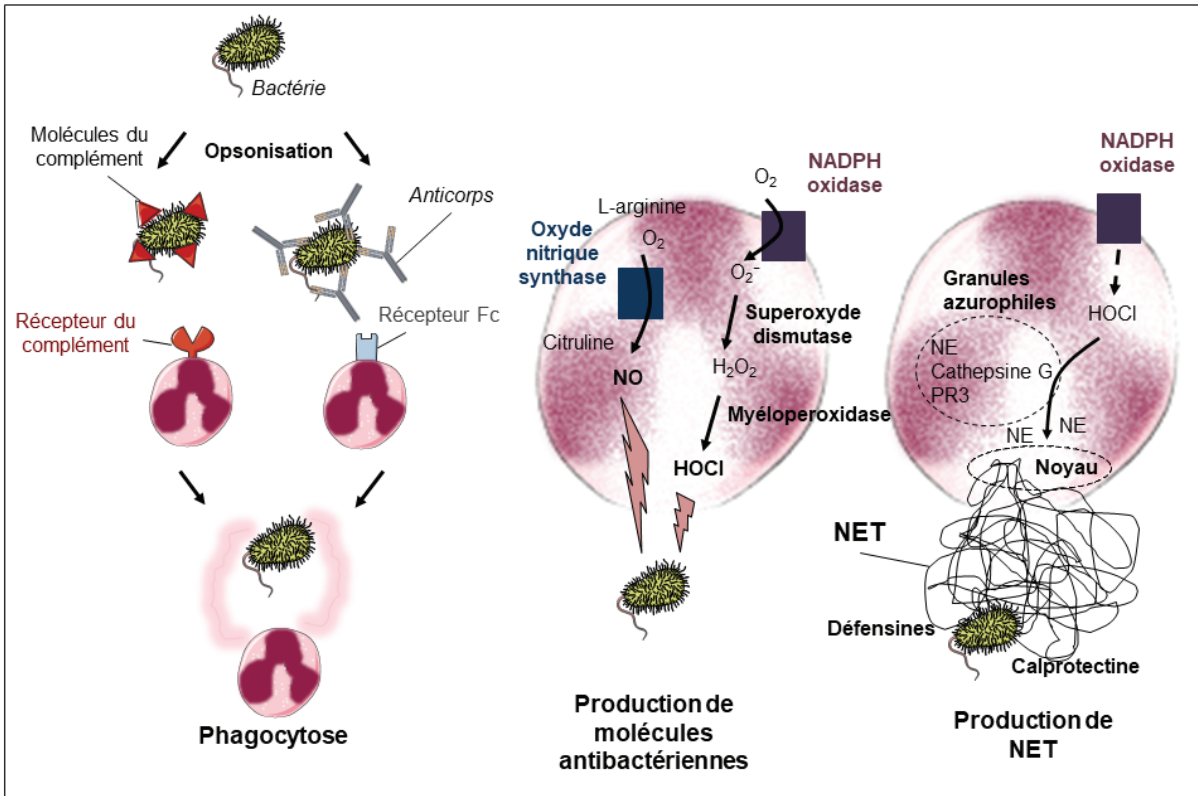
Les neutrophiles contiennent un nombre important de granules contenant des substances antibactériennes. Parmi elles, on trouve les **espèces réactives de l'oxygène** (ROS pour « reactive oxygen species ») qui restent à ce jour les plus décrites dans le neutrophile. Les ROS sont générées à partir de la **NADPH-oxidase** exprimée à la membrane plasmique du neutrophile qui permet de convertir l'O₂ (dioxygène) en anion superoxyde (O₂⁻) (33). Ce dernier va être converti en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) grâce à la **superoxyde dismutase** (33). A partir de l'H₂O₂ et d'anions chlorides (Cl⁻), la **myéloperoxidase** (MPO) va ensuite générer de l'**acide hypochloreux** (HOCl), qui possède un fort pouvoir antibactérien (33).

Bien que moins décrites parmi les neutrophiles, les espèces réactives de nitrogène (RNS pour « reactive nitrogen species ») peuvent également être produites par les neutrophiles dans le but d'éliminer l'agent infectieux (34). La désamination oxydative de la L-arginine en citruline par l'**oxyde nitrique synthase** (NOS) génère du NO (monoxyde d'azote) qui, avec l'anion superoxyde, forme des intermédiaires azotés réactifs ayant une activité antimicrobienne.

1.1.2.3 Les productions de NET

Les NET sont formés à partir d'ADN du noyau des neutrophiles. Alors que la formation de la plupart des NET nécessite la mort cellulaire dans un processus appelé NETose, dans d'autres cas, la formation de NET peut inclure l'expulsion du noyau sans affecter la viabilité du neutrophile (35). Il est intéressant de noter que les gros microbes sont plus efficaces pour déclencher la production de NET, ce qui suggère que les NET peuvent être déployés lorsque l'organisme est trop grand pour être phagocytés (36). Cependant, les mécanismes et les voies de signalisation impliquées dans la production de NET restent encore très peu caractérisés. Il a été montré chez la souris que la production d'**acide hypochloreux** (de façon dépendante de la NADPH-oxidase) permettait la dissociation des granules azurophiles et donc le relargage dans le cytoplasme de leurs contenus, à savoir la MPO, la neutrophiles elastase (NE), la cathepsine G et la protéinase 3 (PR3) (37). La NE migrerait ensuite dans le noyau pour modifier la structure des histones, permettant ainsi la décondensation de la chromatine, le gonflement du noyau et, finalement, la libération des NET (37). Plusieurs types de protéines associés aux NET possèdent des propriétés anti-infectieuses. Les défensines sont capables d'augmenter la perméabilité membranaire des bactéries conduisant à leur mort (38, 39). La **calprotectine** (hétérodimères S100A8/S100A9) possède quant à elle des activités antifongiques (38).

Figure 4. Mécanismes de défense antibactériens.



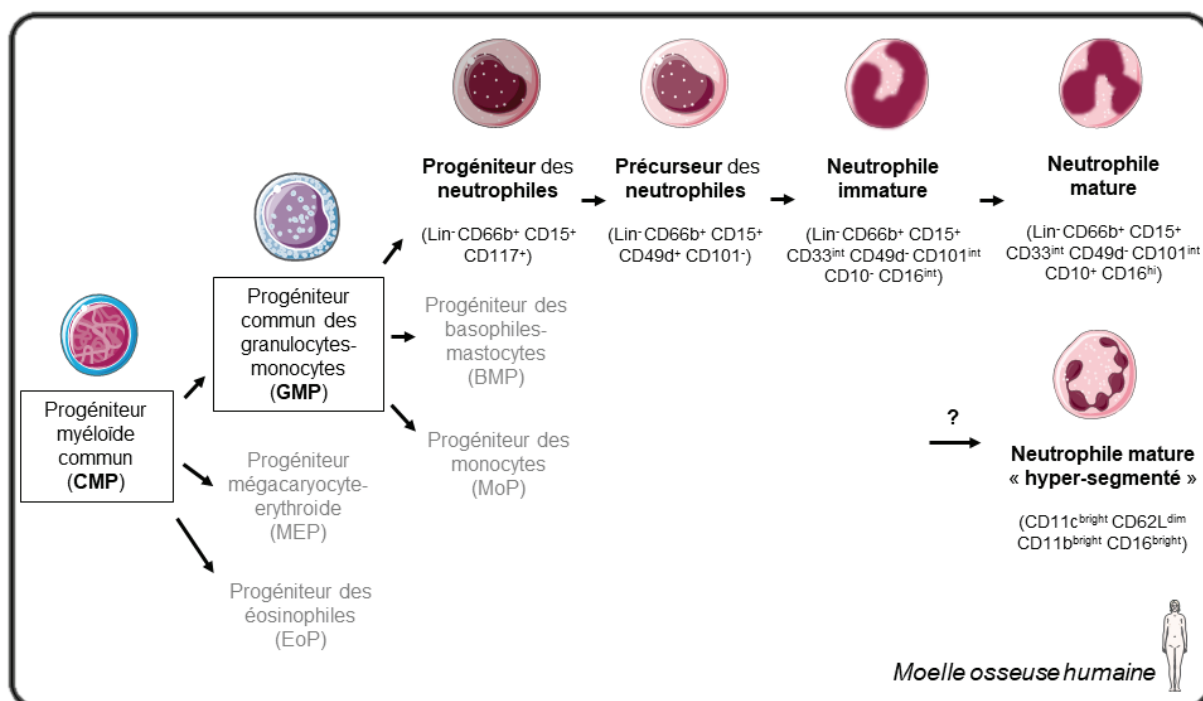
1.2 La granulopoïèse médullaire

Le terme de granulopoïèse médullaire fait référence au processus de production de **granulocytes** dans la **moelle osseuse**. Historiquement, l'identification des granulocytes, aussi appelés polymorphonucléaires (ou **PMN**), s'est d'abord faite sur des critères morphologiques. Les colorants de type hématoxyline ou May-Grünwald, ont permis de révéler la forme caractéristique du noyau des granulocytes, à savoir un noyau « plurilobé ». D'autres colorants comme l'éosine ou Giemsa, ont permis de distinguer les trois sous-types de granulocytes, que sont les **éosinophiles**, les **basophiles** et les **neutrophiles** (40). Alors que les éosinophiles et les basophiles présentent un cytoplasme respectivement rosé ou bleu, les neutrophiles, quant à eux, ont une coloration neutre qui est à l'origine de leur nom de « neutre-ophile ». En plus de l'étude morphologique, l'utilisation de marqueurs de différenciation a permis une caractérisation plus objective et plus fine de l'ensemble des granulocytes mais aussi de leurs progéniteurs et précurseurs (41).

Chez l'Homme, l'origine et le développement des neutrophiles dans la moelle osseuse font encore aujourd'hui l'objet d'un débat intense et plusieurs modèles ont été proposés (40–43). Nous avons retenu le plus récent chez l'Homme (**Figure 5**). Le progéniteur myéloïde commun (CMP en anglais) va pouvoir se différencier en 3 types de cellules progénitrices : le progéniteur mégacaryocyte-érythroïde (MEP), le progéniteur des

éosinophiles (EoP) et le progéniteur commun des granulocytes-monocytes (GMP). Ce dernier va ensuite pouvoir se différencier en 3 types de progéniteurs : le progéniteur des monocytes (MoP), le progéniteur des basophiles-mastocytes (BMP) et le progéniteur des neutrophiles (NeuP). Contrairement aux autres types de cellules myéloïdes, le progéniteur des neutrophiles (NeuP) chez l'Homme n'a été découvert que très récemment. Grâce à une approche de cytométrie de masse (CyTOF), Y. P. Zhu et son équipe ont découvert le véritable précurseur unipotent humain des neutrophiles « **NeuP** » (44) (équivalent au myélocyte). Dans la moelle osseuse humaine, NeuP se différencie en précurseur « **pre-Neu** » qui lui-même se différencie ensuite en **neutrophile immature** $\text{Lin}^- \text{CD66b}^+ \text{CD15}^+ \text{CD33}^{\text{int}} \text{CD49d}^- \text{CD101}^{\text{int}} \text{CD10}^- \text{CD16}^{\text{int}}$ (correspondant aux neutrophiles avec un noyau en « fer à cheval »), puis **neutrophile mature** $\text{Lin}^- \text{CD66b}^+ \text{CD15}^+ \text{CD33}^{\text{int}} \text{CD49d}^- \text{CD101}^{\text{int}} \text{CD10}^+ \text{CD16}^{\text{hi}}$ (neutrophiles avec un noyau segmenté). Dans un contexte d'inflammation aiguë, une nouvelle sous-population de neutrophiles a été découverte ($\text{CD11c}^{\text{bright}} \text{CD62L}^{\text{dim}} \text{CD11b}^{\text{bright}} \text{CD16}^{\text{bright}}$) avec un noyau « **hyper-segmenté** » (avec au moins 5 lobes) (45). Une étude récente a montré que ces neutrophiles « hyper-segmentés » $\text{CD62L}^{\text{dim}}$ ne seraient pas issus des neutrophiles matures segmentés, mais dériveraient d'un même progéniteur qui reste à être identifié (46). Cela suggère donc que plusieurs voies de différenciation des neutrophiles existent dans la moelle osseuse à partir d'un progéniteur commun (47).

Figure 5. La granulopoïèse médullaire chez l'homme.



1.3 Régulation de la granulopoïèse médullaire

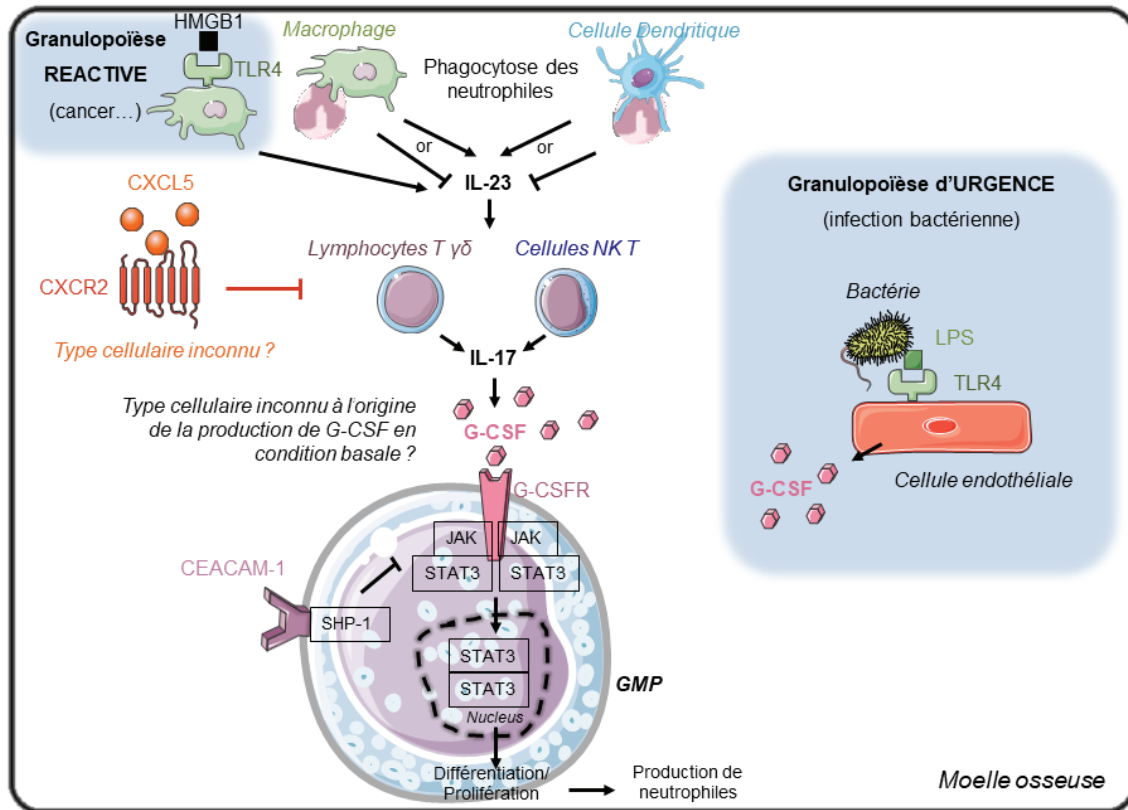
Le facteur de croissance spécifique des granulocytes (**G-CSF** pour « granulocyte colony-stimulating factor ») joue un rôle important dans la différenciation, la prolifération et la survie des neutrophiles (48). L'apport de G-CSF exogène (recombinant) est couramment utilisé en clinique pour stimuler la production de neutrophiles dans des situations de neutropénies fébriles induites par les chimiothérapies (49). A l'état basal, le G-CSF agit directement sur la cellule progénitrice bipotente GMP induisant sa différenciation en cellule progénitrice de neutrophile, alors que le facteur de croissance spécifique des monocytes (M-CSF pour « monocyte colony-stimulating factor ») conduit à la différenciation du GMP en cellule progénitrice de monocyte (50). En se fixant sur son récepteur homodimérique (G-CSFR), le G-CSF induit un signal de transduction par les kinases Janus (**JAK**) et par la protéine **STAT3** (pour « Signal transducer and activator of transcription 3 ») conduisant en aval à l'activation de nombreux facteurs de transcriptions pour assurer la différenciation des GMP en neutrophiles (51, 52) (**Figure 6**). Différents facteurs de transcription semblent être impliqués à des stades bien distincts du développement des neutrophiles (52).

A l'état basal, l'origine du G-CSF reste à ce jour peu connue. En effet, le ou les type(s) cellulaire(s) présent(s) dans la moelle osseuse produisant le G-CSF n'ont pas été clairement identifié(s). Il est cependant de plus en plus évident que l'**IL-17** est le principal régulateur de la production de G-CSF. L'IL-17 est principalement produit par les lymphocytes T $\gamma\delta$ et les cellules NK T dans la moelle osseuse (53). Ces cellules productrices d'IL-17 peuvent être stimulées par l'**IL-23** produit par les macrophages et les cellules dendritiques une fois les neutrophiles en apoptose présents dans les tissus phagocytés (53) (**Figure 6**). Une autre étude a montré qu'au contraire, la phagocytose des neutrophiles apoptotiques par les cellules présentatrices d'antigènes réprimait la cascade de cytokines **IL-23/IL-17** contrôlant la granulopoïèse (54) (**Figure 6**). Un autre mécanisme de régulation de la granulopoïèse a été proposé. J. Mei et *al.* ont montré que la signalisation du récepteur CXCR2 stimulé par un de ses ligands, le CXCL5, pouvait conduire à une diminution de la production d'IL-17 principalement par les lymphocytes (en particulier par les lymphocytes T $\gamma\delta$ des poumons et de la rate), et donc à une chute de G-CSF, rétablissant ainsi une production homéostatique de neutrophiles (55) (**Figure 6**). La glycoprotéine **CEACAM-1** (pour « Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 ») exprimée à la membrane de la cellule, semblerait également contribuer à la modulation de la granulopoïèse (56). Il a en effet été rapporté que la stimulation du récepteur CEACAM-1 *via* son domaine inhibiteur ITIM (« pour immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif »), induisait le recrutement la **phosphatase inhibitrice SHP-1**. La SHP-1, une fois activée, va ensuite pouvoir réprimer la voie de signalisation G-CSFR-STAT3 dans les cellules progénitrices des neutrophiles. Cela va avoir pour conséquence une diminution de la

prolifération de ces cellules et donc *in fine* de la production de neutrophiles. Les souris déficientes en CEACAM-1 présentent une neutrophilie importante (56).

Lors d'infections bactériennes par *Escherichia Coli* ou d'autres pathogènes exprimant des ligands du récepteur de l'immunité innée TLR4 (pour « toll-like recepteur 4 » en anglais), la mobilisation des neutrophiles dans le sang doit être rapide et abondante. On parle alors de **granulopoïèse d'urgence**, dont les mécanismes de régulation semblent être bien différents par rapport à la production de neutrophiles à l'état basal. Dans ce cas, le contrôle de la sécrétion du G-CSF n'est plus dépendant de l'axe IL-23/IL-17 mais de la stimulation directe du récepteur TLR4 exprimé par les **cellules endothéliales** dans la moelle osseuse (57) (**Figure 6**). Dans les cancers solides, la tumeur est bien connue pour sa stimulation de la granulopoïèse à distance. Dans ce cas, la stimulation de la granulopoïèse en l'absence d'agent infectieux est appelée **granulopoïèse réactive** (58). Les similitudes et les différences entre la granulopoïèse d'urgence d'origine infectieuse et la granulopoïèse réactive induite par le cancer sont à ce jour encore très obscures. Certaines études menées chez l'Homme et chez la souris ont montré que les cellules cancéreuses produisaient elles-mêmes le facteur pro-granulopoïétique G-CSF ayant de grande chance de passer dans la circulation sanguine pour stimuler la granulopoïèse dans la moelle osseuse (59, 60). Cependant, chez les patients porteurs de tumeurs, très peu de données associent des concentrations élevées en neutrophiles dans le sang périphérique (neutrophilie) à des concentrations plasmatiques importantes en G-CSF, en tout cas supérieures à celles des donneurs sains (61–63). Cela suggère que d'autres facteurs pro-granulopoïétiques peuvent être produits par la tumeur. Il a été montré que l'alarmine HMGB1, en se fixant à son récepteur TLR4, est capable de stimuler la production d'IL-23 par les macrophages conduisant à la production d'IL-17 (64), pouvant donc stimuler la granulopoïèse (**Figure 6**). Chez l'Homme, il a été rapporté que les carcinomes épidermoïdes de l'œsophage peuvent sécréter des exosomes contenant de l'HMGB1 (65). Il reste cependant à savoir si cette alarmine ou d'autres ligands de TLR4 endogènes peuvent être responsables de la granulopoïèse réactive observée chez les patients atteints de cancer.

Figure 6. Régulation de la granulopoïèse médullaire en contextes physiologiques et pathologiques.



1.4 La granulopoïèse extra-médullaire

La moelle osseuse n'est pas le seul lieu où la granulopoïèse peut se dérouler. A la suite d'un stress hématopoïétique comme par exemple, l'anémie, les infections bactériennes et les myéloablations, la granulopoïèse médullaire n'est plus suffisante et nécessite d'être soutenue par une granulopoïèse extra-médullaire (GEM) (66). Chez l'Homme et la souris, à l'état basal, un pool de cellules souches hématopoïétiques (HSC) circule dans le sang périphérique (67–72) qui peut se voir augmenté au cours d'une infection bactérienne pour ensuite être mobilisé dans la future niche hématopoïétique extra-médullaire qui, le plus souvent, se trouve dans la **rate** et/ou le **foie** (73). Cette granulopoïèse extra-médullaire peut être assimilée soit à (i) une réponse physiologique suite à une infection bactérienne par exemple, pour obtenir un nombre suffisant de neutrophiles pour combattre les pathogènes (ii) une réponse pathologique si le processus de différenciation des cellules souches et/ou progénitrices en neutrophiles a été altéré. C'est notamment le cas dans le cancer où la rate est un lieu important pour la différenciation des cellules progénitrices en neutrophiles pro-tumoraux (74–76), du moins chez la souris. Cela reste à démontrer chez l'Homme. Bien que la rate soit l'organe le plus décrit pour sa capacité à faire de la granulopoïèse extra-médullaire, quelques évidences chez la souris montrent que le **poumon** (77, 78) et le **foie** (79) pourraient en être capables également.

1.5 Sous-populations de neutrophiles

Au cours des 20 dernières années, la caractérisation des neutrophiles a permis d'apprécier l'hétérogénéité phénotypique des neutrophiles, essentiellement sur la base de densités différentielles des neutrophiles et d'expression de marqueurs de surface (12). Cette hétérogénéité phénotypique a récemment pu être renforcée grâce à l'analyse du transcriptome des neutrophiles à l'échelle de la cellule unique (24, 80). Dans cette partie, nous présentons un état de l'art des différentes sous-populations de neutrophiles identifiées à ce jour dans les contextes **infectieux** et **auto-immuns**. Puis nous tenterons à partir des éléments de la littérature, d'expliquer leurs **origines** et leurs **fonctions** dans les conditions **physiologiques** et **pathologiques**.

1.5.1 Les neutrophiles de faible densité (LDN)

Du fait de leur petite taille et de leur masse importante (principalement due à une grande quantité de **granules intracellulaires**), les neutrophiles sont les leucocytes qui possèdent la plus grande densité (81). Alors que la densité des cellules mononucléées du sang périphérique (abrégié PBMC, incluant les monocytes, les lymphocytes T et B, les cellules NK et les cellules dendritiques) se situe entre 1.067 et 1.077 g/ml, celle des neutrophiles est légèrement plus élevée et se situe aux alentours de **1.080 g/ml** (81). Cette caractéristique en a fait le principe de base de la première méthode de séparation des neutrophiles et des PBMC (81) grâce à une solution de Ficoll, ajustée à une densité de 1.077 g/ml. Après centrifugation, les neutrophiles se retrouvent classiquement au fond du tube avec les globules rouges, alors que les PBMCs sont situés au-dessus des neutrophiles dans « l'anneau de Ficoll ». Alors que la plupart des neutrophiles possèdent une haute densité, une petite proportion de neutrophiles a été observée chez l'Homme et la souris dans la fraction PBMC de basse densité qui a ainsi donné leur nom de **neutrophiles de basse densité** (abrégié « **LDN** » pour « **low-density neutrophils** » en anglais) (**Tableau 1**). Par opposition aux LDN, les neutrophiles conventionnels retrouvés dans la fraction de haute densité sont communément appelés **neutrophiles de haute densité** (abrégié « **HDN** » pour « **high-density neutrophils** » en anglais). Cette dénomination de « HDN » ne semble cependant pas convenir à l'ensemble de la communauté scientifique puisqu'il s'agit de la densité normale des neutrophiles conventionnels. Pour la suite du manuscrit, nous conviendrons d'appeler ces neutrophiles conventionnels de densité normale « **NDN** » pour « **normal-density neutrophils** » en anglais.

La présence de LDN dans le sang périphérique chez l'Homme a d'abord été décrite dans les pathologies inflammatoires systémiques comme la maladie auto-immune du lupus érythémateux disséminé (SLE en anglais pour « systemic lupus erythematosus ») (82) mais aussi dans le sepsis (83), puis plus récemment dans le cancer (12). Encore aujourd'hui la contribution des LDN dans l'aggravation des pathologies que nous avons listées précédemment reste peu définie. Des études *in vitro* effectuées chez l'Homme ont néanmoins permis de montrer que les LDN pouvaient avoir un **phénotype pro-inflammatoire** dans les maladies auto-immunes et un **phénotype anti-inflammatoire** dans les maladies infectieuses. Dans les maladies auto-immunes, les LDN isolés à partir du sang périphérique des patients ont une capacité supérieure de production de **cytokines pro-inflammatoires** ainsi que le relargage accru de pièges d'ADN extracellulaires (aussi appelés **NET** pour « neutrophil extracellular traps) par comparaison avec les NDN (82). La persistance du phénotype pro-inflammatoire des LDN favoriserait la destruction tissulaire et pourrait contribuer à l'aggravation des maladies auto-immunes. Quant au phénotype anti-inflammatoire des neutrophiles, celui-ci se traduit notamment par une capacité supérieure par rapport au NDN à **inhiber la prolifération des lymphocytes T** *via* le relargage d'Arginase 1 ou de ROS (84, 85). Les fonctions immunosuppressives des neutrophiles sur les lymphocytes T pourront favoriser le développement des infections nosocomiales (84) mais aussi du cancer (12). Ces LDN ne sont pas restreints aux contextes pathologiques puisqu'ils ont été également observés dans le sang de donneurs sains (86–88). Cependant le pourcentage de LDN est généralement plus élevé en contexte pathologique (12, 82, 83) qu'en condition basale (donneurs sains). Ceci suggère que les LDN constituent une sous-population de neutrophiles préexistante en condition basale qui assure le maintien de l'homéostasie. Les LDN immunosuppressifs seraient par exemple nécessaires pour le maintien physiologique de la tolérance immunologique maternelle du fœtus. Ils sont retrouvés à la fois dans le sang périphérique (82, 88, 89) de la mère mais aussi dans le placenta (90) et le lait maternel (91), ainsi que dans le sang de cordon (92).

Mais comment expliquer cette différence de densité au sein de cette même population cellulaire que sont les neutrophiles ? Une étude a suggéré que la densité des neutrophiles est étroitement liée au **degré de maturité** de ceux-ci. La centrifugation de neutrophiles isolés de moelle osseuse (contenant les formes immatures et matures de ceux-ci) selon un gradient de densité discontinue de Percoll a permis de mettre en évidence 3 phases de densités différentes (93). Ces 3 phases correspondent à 3 niveaux de maturité différents des neutrophiles. La phase avec la densité la plus faible correspond aux neutrophiles immatures (CD16^{low} CD11b^{int}, noyau en bande). La phase avec la densité intermédiaire correspond à un niveau de maturité intermédiaire (CD16^{int} CD11b^{int}, noyau en forme de fer à cheval). Enfin, la phase la plus dense correspond aux neutrophiles matures (CD16^{high} CD11b^{high}, noyau segmenté). Au cours de la maturation, les neutrophiles

accumulent différents types de granules. Ainsi, en fin de maturation, les neutrophiles se retrouvent avec beaucoup plus de granules que les neutrophiles immatures. Cette différence du nombre de granules (en fonction du stade de maturité du neutrophile) explique-t-elle vraiment la densité différentielle entre LDN et NDN ? En d'autres termes, les LDN sont-ils strictement immatures ? Des évidences récentes ont montré qu'il n'y avait pas de différence du nombre de granules par cellule entre les LDN et NDN (94). De plus, il semble que les LDN sont principalement constitués d'une majorité de neutrophiles matures et d'une minorité de neutrophiles immatures (94–96). Ainsi, le lien entre densité et degré de maturité des neutrophiles ne semble pas être systématique.

Un bon nombre d'études rapportent un lien entre l'**état d'activation** des neutrophiles et leur plus faible densité. Ainsi, il a été montré que la stimulation des NDN par le peptide chimiotactique fMLF (pour « N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine ») (97) ou le TGF- β (94) a pour résultat leur conversion en LDN. On ne sait toujours pas si cette densité plus faible induite par l'activation des neutrophiles est uniquement expliquée par le phénomène de dégranulation. La stimulation des neutrophiles par le fMLF est pourtant connue pour faire dégranuler les neutrophiles (98, 99). Il conviendrait par conséquent dans de futures études de comparer la densité des neutrophiles stimulés au fMLF avec et sans inhibiteurs de la dégranulation.

1.5.2 Les neutrophiles « âgés » CXCR4⁺ CD62L^{low}

Les neutrophiles CXCR4⁺ CD62L^{low} correspondent à une sous-population de neutrophiles « âgés » observée dans le sang périphérique à la fois chez l'Homme et chez la souris (100, 101) (**Tableau 1**). Le terme de « âgés » s'explique par le fait qu'il s'agit du stade ultime de développement des neutrophiles précédant leur retour dans la moelle osseuse pour y être éliminés (102). Plusieurs évidences montrent que le vieillissement des neutrophiles semble être favorisé par l'**activation** des neutrophiles au cours de l'inflammation. A l'échelle transcriptomique chez la souris, les neutrophiles âgés partagent plusieurs processus biologiques communs avec les neutrophiles activés *in vivo* à la suite d'une injection systémique de TNF- α (103). Une étude menée chez la souris a montré que le **microbiote intestinal** jouait un rôle essentiel dans le vieillissement des neutrophiles à l'état basal et en conditions pathologiques (modèle de drépanocytose et de choc septique induit par endotoxines) (103). Ce vieillissement induit par le microbiote semble dépendre des récepteurs de l'immunité innée **TLR** ainsi que de la protéine adaptatrice transductrice du signal immunitaire innée **Myd88**, tous deux exprimés par les neutrophiles. D'autres évidences suggèrent que les neutrophiles de sang humain acquièrent spontanément (sans stimulation) *in vitro* l'expression de CXCR4 après 4h00 d'incubation, expression qui

augmente linéairement jusqu'à 20h00 (104). L'expression de CXCR4 dans ce modèle était-elle vraiment associée à un « vieillissement » des neutrophiles *in vitro* ?

Les neutrophiles âgés CXCR4⁺ CD62L^{Low} ont une capacité supérieure à produire des **ROS** (105–107), des **NET** (103, 106) et à faire de la **phagocytose** (107). De plus, les neutrophiles « âgés » auraient une meilleure capacité à être **recrutés** aux sites inflammatoires, ce qui remet en question au passage la définition actuelle de « neutrophiles âgés » puisqu'ils ne retournent pas immédiatement dans la moelle osseuse. Dans les phases précoces d'une inflammation aiguë induite par des endotoxines chez la souris, les neutrophiles « âgés » s'accumulent dans le foie, les poumons et les reins où ils exercent leur fonction antibactérienne (107). Les neutrophiles « âgés » exprimant CXCR4 auraient également une plus grande capacité à migrer dans les ganglions lymphatiques. En effet, l'inhibition spécifique de CXCR4 par une petite molécule antagoniste (le plerixafor) a empêché l'accumulation des neutrophiles dans les ganglions lymphatiques au cours du processus d'immunisation chez la souris (108). On ne peut cependant pas exclure que l'accumulation des neutrophiles dans les tissus de façon dépendante de CXCR4 puisse être expliquée par une augmentation des capacités de **survie** des neutrophiles « âgés » par rapport aux neutrophiles plus jeunes, même si cela reste à démontrer.

Enfin, lors de la phase de résolution de l'inflammation, l'acquisition de CXCR4 par les neutrophiles est essentielle pour permettre leur retour dans la moelle osseuse pour être ensuite éliminés par les macrophages (109, 110). Cependant, dans les phases précoces de la réponse inflammatoire, les neutrophiles « âgés » exprimant CXCR4 s'accumulent préférentiellement dans les tissus inflammés et réduisent au contraire leur tropisme pour la moelle osseuse (107). Ceci suggère que CXCR4 n'est pas suffisant pour induire le retour des neutrophiles dans la moelle osseuse et que d'autres mécanismes, qui restent à découvrir, sont nécessaires pour orienter la migration des neutrophiles « âgés » vers le tissu inflammé (pour l'élimination des pathogènes) ou la moelle osseuse (pour l'élimination des neutrophiles).

Lors d'inflammations systémiques chez la souris, le nombre de neutrophiles « âgés » dans le sang périphérique augmente considérablement (103). Chez l'Homme, de futures études permettront de savoir si cette population de neutrophiles « âgés » augmente au cours d'une inflammation systémique, comme le sepsis. D'autres marqueurs des neutrophiles « âgés » ont récemment vu le jour. Il semble en effet que l'expression de CD11b, CD49d, ICAM-1, CD11c, CD24 et CD45 est augmentée sur les neutrophiles « âgés » CXCR4⁺ CD62L^{Low} par rapport aux neutrophiles CXCR4⁻ CD62L⁺, alors que l'expression de CXCR2, Ly6C et Ly6G est diminuée, en tout cas chez la souris (103). Ces marqueurs permettront de mieux distinguer cette sous-population de neutrophiles âgés par rapport aux autres

neutrophiles, pour mieux connaître leur rôle dans les contextes physiologiques et pathologiques. Enfin il semble que les notions de « vieillissement » et « d'activation » des neutrophiles soient étroitement liées. Il conviendra par conséquent dans de futures études de déterminer si ces deux notions sont bien distinctes et d'y associer des marqueurs hautement discriminants.

1.5.3 Les neutrophiles CD177⁺

CD177 est une glycoprotéine associée à un glycosylphosphatidylinositol (GPI). Ce récepteur est exprimé principalement par les neutrophiles au niveau de la membrane plasmique, à la fois chez l'Homme et chez la souris (111) (**Tableau 1**). Elle est connue pour former des interactions entre les neutrophiles et les cellules endothéliales en se liant à la molécule d'adhésion **PECAM-1** (112) ainsi qu'aux intégrines **CD11b** et **CD18** de l'hétérodimère MAC-1 (111, 113) afin d'assurer, entre autres, la migration trans-endothéliale des neutrophiles chez l'Homme. Les neutrophiles CD177⁺ sont présents dans le sang périphérique à l'état basal (entre 30 et 70% des neutrophiles) et leur fréquence est augmentée dans certaines pathologies inflammatoire (entre 70 et 95% des neutrophiles) comme l'asthme (114), le sepsis (115, 116) ou la maladie inflammatoire chronique de l'intestin (IBD en anglais pour « inflammatory bowel disease ») (117). Dans cette dernière pathologie, les neutrophiles CD177⁺ sont également présents dans la *lamina propria* des muqueuses du colon inflammé des patients IBD (117). La fréquence de neutrophiles CD177⁺ est même augmentée dans la *lamina propria* des patients IBD par rapport à celles des donneurs sains (117). Par rapport aux neutrophiles CD177⁻, les neutrophiles CD177⁺ de patients IBD produisent des niveaux inférieurs de cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ , IL-6, IL-17A), mais des niveaux supérieurs d'IL-22 et de facteur de TGF- β , et ont montré des activités bactéricides accrues, telles que la sécrétion de ROS et de peptides antimicrobiens, ou la production de NET (117). L'origine de l'expression de CD177 sur les neutrophiles reste encore à ce jour énigmatique. De plus, il n'est encore pas clairement établi que la protéine CD177 exprimée par les neutrophiles est capable de réguler leurs fonctions. Bien que CD177 soit une glycoprotéine de surface qui ne possède pas de domaine intracellulaire permettant d'induire une cascade de signalisation, CD177 va s'associer au récepteur du complément MAC-1 à la surface des neutrophiles pour déclencher la production de ROS et le relargage de β -glucuronidase (111, 118).

1.5.4 Les neutrophiles « hyper-segmentés » CD11c^{bright} CD62L^{dim} CD11b^{bright} CD16^{bright}

La sous-population de neutrophiles **matures** « **hyper-segmentés** » a été mise en évidence pour la première fois dans le sang de volontaires sains après injection de LPS (2

ng/kg) par voie systémique (45, 46) (**Tableau 1**). Cette sous-population de neutrophiles montre une forte **activité suppressive** sur la **prolifération des lymphocytes T** (45). Dans ce modèle d'étude, l'activité immunosuppressive des neutrophiles est dépendante de la production de **ROS** par les neutrophiles ainsi que de leur expression de **MAC-1** (45). Toujours chez l'Homme, les neutrophiles « hyper-segmentés » se sont avérés être moins efficaces dans l'inhibition de la croissance bactérienne par rapport aux neutrophiles matures conventionnels « segmentés » (119). Les neutrophiles « hyper-segmentés » semblent en effet présenter une altération de leur capacité à détruire les agents pathogènes en intracellulaire, très probablement due à un déficit de l'acidification du phagolysosome (119). Le rôle de cette sous-population de neutrophiles dans les pathologies inflammatoires systémiques reste à être déterminé dans de futures études. Quant à l'origine de cette sous-population, des travaux récents ont permis de mettre en évidence qu'il s'agit d'une population de neutrophiles ayant subi un processus de différenciation bien distinct de celui des neutrophiles conventionnels « segmentés » (46). Les auteurs ont démontré cela chez l'Homme grâce à 3 grandes observations : (i) Grâce à une technique de marquage *in vivo* de l'ADN des cellules en prolifération suite à l'administration du 6,6-²H₂-glucose, les auteurs ont montré que le temps de maturation des progéniteurs de neutrophiles proliférant en neutrophiles « segmentés » est le même par rapport aux neutrophiles « hyper-segmentés ». (ii) L'analyse du protéome dans sa globalité montre cependant une différence bien distincte entre les neutrophiles « hyper-segmentés » et « segmentés ». (iii) La stimulation *in vitro* des neutrophiles « segmentés » par une faible dose de LPS (2 ng/kg) n'induit pas leur différenciation en neutrophiles « hyper-segmentés », ce qui suggère donc que les neutrophiles « hyper-segmentés » ne tiennent pas leurs origines des neutrophiles matures activés, mais d'un programme de différenciation bien distinct dans la niche hématopoïétique.

1.5.5 Neutrophiles exprimant les gènes de réponse à l'interféron au niveau transcriptomique






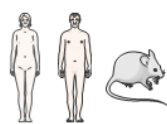
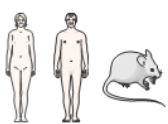
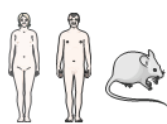
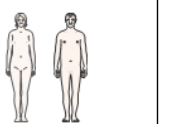
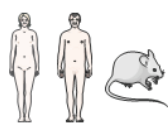
La définition des sous-populations de neutrophiles que nous venons de présenter reposait principalement sur la base de marqueurs protéiques membranaires. Cependant, avec l'avènement du **séquençage du transcriptome à l'échelle de la cellule unique**, de nouvelles sous-populations de neutrophiles ont récemment émergés. C'est notamment le cas pour une sous-population de neutrophiles qui se distingue principalement par l'expression de **gènes de réponse à l'interféron (ISG** en anglais pour « interferon-stimulated genes ») (**Tableau 1**). Cette sous-population a d'abord été mise en évidence dans le sang de patients atteints de cancer du poumon (24), puis un peu plus tard dans le sang de patients SLE (120). Cette signature ISG a également été identifiée dans les neutrophiles de

patients infectés par la malaria (121). De manière intéressante, dans le SLE, cette sous-population est retrouvée dans la fraction PBMC de **faible densité**, posant la question de leur appartenance aux LDN (120).

Cette sous-population de neutrophiles exprimant les ISG ne semble pas être restreinte aux contextes pathologiques puisqu'elle a récemment été identifiée dans le sang de donneurs sains (80). L'équivalent murin a lui aussi été mis en évidence par séquençage à l'échelle de la cellule unique (scRNAseq) de neutrophiles circulants (80). Il a été montré que les souris infectées par *Escherichia Coli* avaient une fréquence plus élevée de neutrophiles ISG par rapport aux souris saines contrôles (80). Par conséquent, cette sous-population de neutrophiles exprimant des ISG semble être préexistante à l'état basal et peut se voir augmentée au cours d'une pathologie inflammatoire. Cependant, à ce jour, à notre connaissance, aucun marqueur de surface ne permet de définir cette population. Leur identification dans de futures études permettra leur isolation ainsi qu'une meilleure caractérisation.

Qu'en est-il de leur origine ? Aucune étude n'a à ce jour posé la question. Cependant, des évidences montrent que la stimulation des neutrophiles par l'IFN- α ou l'IFN- γ semble suffisante pour induire l'expression des ISG (122). La stimulation des récepteurs cytosoliques de l'immunité innée **de type RIG-like**, comme **RIG-I** et **MDA5**, peut, elle aussi, conduire à l'expression des ISG (123). Quelques questions restent en suspens pour tenter de déterminer l'origine de cette nouvelle sous-population. Quelle est la source d'IFN ou d'inducteurs d'interféron stimulant l'expression d'ISG dans les neutrophiles, en condition basale et/ou physiopathologique ? Existe-t-il d'autres moyens d'induire l'expression d'ISG dans les neutrophiles ?

Tableau 1. Les sous-populations de neutrophiles en contextes physiopathologiques.

<p>Sous-population de neutrophile</p>  <p>Les neutrophiles de faible densité (LDN)</p>	 <p>Les neutrophiles « âgés » CXCR4⁺ CD62L^{low}</p>	 <p>Les neutrophiles CD177⁺</p>	 <p>Les neutrophiles « hyper-segmentés » CD11c^{bright} CD62L^{dim} CD11b^{bright} CD16^{bright}</p>	 <p>Neutrophiles exprimant les gènes de réponse à l'interféron au niveau transcriptomique</p>
<p>Description chez l'homme, la souris</p> 				
<p>Localisation</p> <p>Blood</p>	<p>Blood Tissue</p>	<p>Blood Tissue</p>	<p>Blood</p>	<p>Blood</p>
<p>Fonctions</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cytokines pro-inflammatoires • Production de NET • Inhibition de la prolifération des lymphocytes T 	<ul style="list-style-type: none"> • Sécrétion de ROS • Production de NET • Phagocytose 	<ul style="list-style-type: none"> • Sécrétion d'IL-22 et de TGF-β • Sécrétion de ROS • Sécrétion de peptides antimicrobiens • Production de NET 	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition de la prolifération des lymphocytes T 	<ul style="list-style-type: none"> • Fonctions inconnues ?
<p>Pathologies</p> <p>Syndromes auto-immuns, Choc septique, Cancer</p>	<p>Drépanocytose, Choc septique</p>	<p>Maladie inflammatoire chronique de l'intestin</p>	<p>Infections bactériennes</p>	<p>Infections bactériennes</p>

1.6 Les récepteurs activateurs et inhibiteurs des neutrophiles

1.6.1 Les récepteurs activateurs

Les récepteurs activateurs sont les récepteurs qui possèdent un domaine activateur **ITAM** induisant en aval une cascade de signalisation provoquant l'activation des fonctions effectrices des neutrophiles. On distingue plusieurs types de récepteurs activateurs à la surface des neutrophiles (**Figure 7**).

1.6.1.1 Les récepteurs couplés aux protéines-G

Les neutrophiles expriment un grand nombre de récepteurs couplés aux protéines G (**GPCR**) dont la fonction principale est d'induire la **mobilité des neutrophiles** en réponse à un produit bactérien et/ou un signal inflammatoire (chimiotactisme par exemple). Plusieurs sous-familles de récepteurs appartiennent au GPCR. Les **récepteurs aux peptides formylés**, qui reconnaissent le fMLF peuvent déclencher directement la sécrétion de ROS en activant la **NADPH oxydase** (33). Ces récepteurs pourraient également induire la phagocytose des bactéries, même si cela reste à confirmer (124). Quant aux **récepteurs aux chimiokines**, ceux-ci une fois activés sembleraient être importants pour la stimulation

des propriétés antibactériennes des neutrophiles. Il a été en effet rapporté que le récepteur à l'IL-8, le CXCR2, une fois activé, peut induire le **relargage d'ADN extracellulaire (NET)** pour « capturer » les bactéries et les détruire (125, 126). En plus de pouvoir se fixer sur le CXCR2, l'IL-8 peut également se fixer sur son autre récepteur CXCR1. L'activation de CXCR1 seul (et non de CXCR2) par l'IL-8 serait suffisante pour stimuler la production de **ROS** par la **NADPH oxidase** (127).

1.6.1.2 Les récepteurs Fc

En se liant à leurs antigènes par leurs parties spécifiques, les **anticorps** sécrétés par les plasmocytes jouent un rôle physiologique essentiel contre les infections bactériennes (128), virales (129) ou fongiques (130). Une fois l'anticorps fixé au pathogène, celui-ci va ensuite se fixer à la surface d'une cellule effectrice de l'immunité innée, au moyen de récepteurs de la partie constante (partie « Fc ») des anticorps, appelés « récepteurs Fc ». Lorsque l'anticorps se lie à son récepteur Fc, celui déclenche un signal activateur ou inhibiteur dans la cellule effectrice. On distingue plusieurs classes de récepteurs Fc en fonction du type d'**isotype** (IgG, IgA et IgE) de l'anticorps. On dénombre également plusieurs sous-types de récepteurs au sein des récepteurs Fc aux IgG, appelé « FcγR » (FcγRIIIA, FcγRIIIB, FcγRIIA, FcγRIIB et FcγRI).

1.6.1.2.1 FcγRIIIB (CD16B)

Le FcγRIIIB est une protéine ancrée au glycoposphatidylinositol (GPI). Le récepteur FcγRIIIB possède une **faible affinité** pour les anticorps IgG qui s'y lient. Bien qu'il ne possède pas de domaine intracellulaire, plusieurs études ont mis en évidence que le FcγRIIIB pouvait induire des signaux en aval, conduisant à la **mobilisation du Ca²⁺** (131), à l'**adhésion cellulaire** (132, 133) et à la **dégranulation** (134), mais pas le relargage de ROS (134). Une étude a suggéré que l'activation des neutrophiles suite à la stimulation du FcγRIIIB par un anticorps monoclonal dirigé contre ce récepteur (clone 3G8), nécessitait une coopération avec le récepteur FcγRIIA (CD32A) (135). La fonction principale du FcγRIIIB est d'éliminer par endocytose les **complexes immunologiques** solubles (agrégats anticorps-antigènes) par ligature au récepteur Fc (136). FcγRIIIB a la particularité d'exister sous forme soluble (**sFcγRIIIB**). Le rôle du sFcγRIIIB n'est encore pas bien défini, cependant, le mécanisme conduisant à sa production est plus clair. En effet, le neutrophile activé ou rentrant en apoptose sécrète la protéase **ADAM-17** qui va cliver le FcγRIIIB pour ainsi générer la forme soluble sFcγRIIIB.

1.6.1.2.2 FcγRIIIA (CD16A)

Le récepteur FcγRIIIA à **faible affinité** pour les IgG est surtout décrit en ce qu'il est fortement exprimé par les monocytes et les cellules NK. Bien que largement moins exprimé par rapport au FcγRIIIB, il a été tout récemment découvert que le FcγRIIIA était exprimé par les neutrophiles. A la différence du FcγRIIIB, le FcγRIIIA s'associe à la **chaîne γ** du **récepteur Fc** contenant des motifs d'activation des immunorécepteurs à base de tyrosine (**ITAM**), qui pourra par conséquent induire des signaux activateurs en aval du récepteur une fois celui-ci stimulé (137–139). L'activation du FcγRIIIA peut, par exemple, aboutir à la sécrétion de **cytokines pro-inflammatoires** ou à la **dégranulation** (138). Il jouerait également un rôle important dans l'induction de la **trogocytose** des cellules leucémiques (lignée CLL) par l'intermédiaire de l'anticorps anti-CD20 (Rituximab) (137).

1.6.1.2.3 FcγRIIA (CD32A)

Le récepteur FcγRIIA à **faible affinité** pour les IgG contient dans sa partie intracytoplasmique des domaines **ITAM** faisant de lui un récepteur activateur (139). La fixation de complexe immuns aux récepteurs FcγRIIA conduisant à son activation aboutit à la production de **NET** indépendamment de la NADPH oxydase (136). Cette production de NET dépendante de l'activation du récepteur FcγRIIA a également été observée in vivo chez la souris (136). Bien que plusieurs récepteurs FcγR soient capables d'initier la cytotoxicité ou phagocytose cellulaire dépendante d'anticorps (**ADCC** ou **ADCP** respectivement), il a récemment été rapporté que le FcγRIIA est le FcγR le plus efficace pour la **trogocytose** (sous-type d'ADCC) de cellules cancéreuses (140, 141). Le FcγRIIA comprend plusieurs variants polymorphiques qui sont associés à des fonctionnalités différentes. Les neutrophiles des individus avec le variant FcγRIIa-**131H** induit une réponse cytotoxique (par ADCC) contre les cellules cancéreuses significativement plus forte par rapport au variant FcγRIIa-**131R**. Les variants FcγRIIa-131H ou 131R ont également été associés à de nombreuses maladies auto-immunes (142–144). Il a récemment été découvert que le FcγRIIA est important dans la phase de recrutement des neutrophiles par leur interaction avec les complexes immuns IgG déposés à la surface des vaisseaux (145).

1.6.1.2.4 FcγRI (CD64)

Le FcγRI est le récepteur qui possède la plus **forte affinité** pour les IgG (139). Son expression peut être fortement augmentée en présence de cytokines inflammatoires comme l'**IFN-γ** (146) et le **G-CSF** (147). Le FcγRI est associé à la **chaîne γ** du **récepteur Fc** contenant les domaines activateurs **ITAM**, ce qui fait du FcγRI un **récepteur activateur**. La

fixation des IgG sur le Fc γ RI des neutrophiles, induit la **phagocytose** de bactéries opsonisées par les IgG, stimule les fonctions **antifongiques** des neutrophiles et induit la production de **ROS**. Le Fc γ RI peut également déclencher l'**ADCC** par le neutrophile.

1.6.1.2.5 Fc α RI (CD89)

Les neutrophiles expriment très fortement à l'état basal le récepteur Fc α RI qui fixe les immunoglobulines de type A (anticorps **IgA**) avec une **faible affinité** (148). Cependant cette faible affinité peut être augmentée par une pré-incubation des neutrophiles avec du GM-CSF ou du G-CSF (149). Quant à l'expression du Fc α RI, celle-ci peut être augmentée suite à une stimulation au fMLF (150). Le Fc α RI est associé à la **chaîne γ** du **récepteur Fc**, qui contient des domaines activateurs **ITAM** pouvant induire la production de **ROS** (151), le relargage de **NET** (151, 152), **LTB4** (153) et l'induction de l'**ADCC** (93). Il a également été démontré que le Fc α RI pouvait se comporter comme un **récepteur inhibiteur**. Le **ciblage monovalent** de Fc α RI, par des **IgA monomériques**, déclenche un puissant signal inhibiteur ITAM (**ITAMi**) par la chaîne γ du récepteur Fc (154, 155). Il en résulte une cascade de signalisation de faible intensité favorisant le recrutement de la tyrosine phosphatase **SHP-1**, qui induit l'inhibition de plusieurs types de signaux d'activation (154, 155). En revanche, la fixation de ligands multimériques sur le Fc α RI active une voie de signalisation qui conduit au recrutement de la **tyrosine kinase Syk** et à l'activation cellulaire (154, 155). Le Fc α RI agit donc comme un régulateur, qui assure l'induction des fonctions anti et pro-inflammatoires des IgA en fonction du type d'interaction (monomérique ou multimérique).

1.6.1.3 La famille des récepteurs à l'IL-1 et à l'IL-18

Pour les récepteurs de l'IL-1R, il existe deux sous-types de récepteurs : l'**IL-1RI**, qui sert de récepteur pour les isoformes de l'IL-1 (IL-1 α , IL-1 β et l'antagoniste de l'IL-1R (IL-1Ra)), et l'**IL-1RII**, qui est un récepteur tronqué dépourvu de domaine de signalisation intracellulaire et qui fonctionne principalement comme un récepteur leurre (« decoy » en anglais) chez l'Homme (156) comme chez la souris (157). Le rôle de la signalisation de l'IL-1RI sur les neutrophiles reste encore à ce jour très peu défini. Les quelques évidences de la littérature suggèrent que cette voie de signalisation serait importante notamment pour la **survie** des neutrophiles humains (156) et l'induction de la **phagocytose des bactéries** ainsi que la sécrétion de **protéines antibactériennes** (158).

Quant aux effets de l'activation de l'IL-18R sur les neutrophiles, ceux-ci sont beaucoup plus décrits que ceux de l'IL-1RI. La stimulation des neutrophiles par l'IL-18 déclenche notamment la libération de **chimiokines** et de **cytokines**, augmentant la

production de ROS (159) et prolongeant la survie des neutrophiles (159, 160). De manière générale, l'activation des récepteurs de l'IL-1 augmente les fonctions pro-inflammatoires des neutrophiles.

1.6.1.4 Le récepteur au TNF

En fonction du contexte, l'activation des récepteurs au TNF- α exprimés à la surface du neutrophile peut induire sa **mort** (161, 162), ou bien au contraire favoriser sa **survie** (163). Cette dualité fonctionnelle du TNF- α semble fortement dépendre de sa **concentration**. A une forte concentration (≥ 10 ng/mL), le TNF- α va stimuler son récepteur **TNFR-1**, qui, en s'associant avec l'autre sous-type de récepteur **TNFR-2** (162), va activer la kinase MAP p38, conduisant à l'activation de la phosphoinositide 3-kinase IA (PI3K-IA) qui va ensuite augmenter la production de ROS en activant la NADPH oxidase (164). La forte concentration en ROS intracellulaire va activer la caspase 3 qui va perturber la protéine anti-apoptotique **MCL-1** (165) induisant ainsi l'apoptose (164, 166). Cependant, à une faible concentration (≤ 1 ng/mL), le TNF- α va stimuler la transcription du gène codant pour la protéine anti-apoptotique **BFL-1** ce qui va ainsi conférer au neutrophile une résistance à l'apoptose et donc une meilleure viabilité (166).

1.6.1.5 Les récepteurs aux TGF- β

La stimulation du récepteur au TGF- β exprimé à la surface des neutrophiles donne lieu à différents effets. Il a d'abord été rapporté que le TGF- β était un puissant **chimioattracteur** des neutrophiles (167–171). Le TGF- β serait également capable de stimuler la sécrétion de **ROS**, ainsi que le relargage de granules contenant notamment de la **lactoferrine** (172). Cependant, cet effet n'est observé que sur des neutrophiles adhérents au fibrinogène (172). Lorsque les neutrophiles ne sont pas adhérents, le TGF- β aura plutôt tendance à avoir l'effet inverse, c'est-à-dire à l'inhibition de la dégranulation induite par le LPS (173). Enfin, une étude a démontré que le TGF- β , à une faible concentration (2 to 20 ng/ml) était capable d'augmenter la **survie** des neutrophiles (171).

1.6.1.6 Les récepteurs « Toll-like » (TLR)

Dans la famille des récepteurs TLR, on distingue plusieurs sous-familles de récepteurs. Les neutrophiles expriment tous les TLR (TLR-1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9) sauf le TLR-3 (174). Plusieurs études ont montré que la stimulation de certains des TLR augmentait la **survie** des neutrophiles. La stimulation du **TLR-9** par les **motifs CpG de l'ADN bactérien**

retarde l'apoptose des neutrophiles en activant les voies de signalisation ERK et de la PI3K/Akt, conduisant à la phosphorylation de la protéine pro-apoptotique BAD et par conséquent, son inactivation (175), inhibant ainsi l'induction de l'apoptose (176). L'inhibition de l'apoptose par la stimulation du TLR-9 requiert au préalable une stimulation au GM-CSF, qui est notamment importante pour l'augmentation de l'expression du TLR-9 (174).

La stimulation des TLR peut également conduire à une augmentation des **fonctions antibactériennes** des neutrophiles. L'activation des **TLR-1** et **TLR-2** à la membrane plasmique mobilise le pool intracellulaire de récepteurs **TLR-5** à la surface du neutrophile. L'activation des TLR-5 par la flagelline améliore les capacités de phagocytose et de production de ROS des neutrophiles (177). L'IL-8 ainsi que son récepteur CXCR1 (mais pas son autre récepteur CXCR2), semblent être nécessaires pour l'induction des fonctions antibactériennes des neutrophiles déclenchées suite à la stimulation TLR-5, puisque leur inhibition (IL-8 et CXCR1) abroge ces effets (177).

1.6.1.7 Les lectines de type-C

La **dectine-1** (CLEC7A) est un récepteur exprimé à la surface des neutrophiles qui joue un rôle important dans l'initiation de la **réponse antifongique** (178). La stimulation de la dectine-1 par la levure *Candida Albicans* induit la phagocytose de cette dernière par les neutrophiles mais également stimule la production de ROS par les neutrophiles (178). La dectine-1 déclenche des **signaux activateurs** en aval grâce à son domaine activateur **hemITAM** (179). A la différence du domaine activateur ITAM qui comporte 2 sites de phosphorylation des tyrosines (YxxL), hemITAM, lui, en comporte un seul. Par conséquent, pour les récepteurs ITAM, la kinase Syk se lie à deux YxxL dans un seul récepteur, tandis que pour les récepteurs hemITAM, Syk se lie à deux récepteurs phosphorylés (179). La dectine-1 va donc devoir se dimériser pour recruter la kinase Syk et initier la cascade de signalisation, qui va notamment aboutir à l'activation de **MAC-1**, nécessaire pour la reconnaissance des composants fongiques et la réponse cytotoxique des neutrophiles (118, 179). L'activation de MAC-1 par la dectine-1 requiert les protéines **Vav1** et **Vav3** ainsi que la **RhoGTPases** (118).

Le récepteur **Mincle** (CLEC4E) exprimé à la surface des neutrophiles favoriserait quant à lui l'inflammation pulmonaire, en tout cas dans un modèle murin préclinique de la Tuberculose (180). Le tréhalose 6,6'-dimycolate, composant de la bactérie de la Tuberculose, active Mincle qui, en réponse, augmente la polymérisation de l'actine-F et l'expression en surface de CD11b/CD18 pour promouvoir le **recrutement** des neutrophiles dans le tissu pulmonaire (180). Plus récemment, l'implication de Mincle dans la **migration**

des neutrophiles a été confirmée dans un modèle murin de péritonite induite par *Escherichia Coli* (181). Les neutrophiles déficients en Mincle ont une moins bonne migration suite à la stimulation par *Escherichia Coli*. Mincle stimulerait la migration des neutrophiles en augmentant notamment la polymérisation de l'actine-F, nécessaire pour le remaniement du cytosquelette du neutrophile et sa motilité (181). Mincle serait également important pour la formation de **NET** *in vitro* en réponse à la bactérie *Klebsiella Pneumoniae* (182). L'initiation de la cascade de signalisation du **récepteur activateur** Mincle se fait par ses domaines activateurs **ITAM** (183).

1.6.1.8 TREM

Le **récepteur activateur TREM-1** (pour « triggering receptor expressed on myeloid cells ») reste le plus décrit à ce jour (184). Il est exprimé à l'état basal à la surface des neutrophiles du sang périphérique (185). Son expression peut être augmentée sous stimulation au LPS (185). L'engagement de TREM-1 par ligation (« cross-linking ») déclenche la sécrétion de l'**IL-8**, de **CCL2** et du **TNF- α** et induit la **dégranulation** des neutrophiles (185). Au niveau intracellulaire, la TREM-1 induit la mobilisation du Ca²⁺ et la phosphorylation de la tyrosine de la kinase 1 extracellulaire liée au signal (ERK1), de l'ERK2 et de la phospholipase C- γ (185). Pour faciliter l'activation, la TREM-1 s'associe à la molécule d'adaptation transmembranaire **DAP12**, contenant un domaine activateur « **ITAM** » (185). De nouvelles évidences montrent également un rôle important de TREM-1 dans le processus de migration de neutrophiles (186), de production de ROS (186).

A ce jour, l'identification des ligands TREM reste limitée. Quelques études ont permis de mettre en évidence quelques ligands potentiels de TREM-1 (187). TREM-1 semblerait pouvoir interagir avec l'alarmine **HMGB1** (188), le récepteur 1 de reconnaissance des peptidoglycane (Peptidoglycan recognition receptor 1 (**PGLYRP1**) (189), les protéines de choc thermique de 70 kDA (**HSP70**) (190), mais aussi avec certains ligands exprimés par les **plaquettes**, même si ceux-ci n'ont pas été clairement identifiés (191).

1.6.1.9 OSCAR

Le récepteur associé aux ostéoclasts (OSCAR) est exprimé par les cellules myéloïdes, en particulier par les neutrophiles (192). En s'associant avec la **chaîne γ** des **récepteurs Fc** contenant des domaines d'activation **ITAM**, OSCAR déclenche des signaux activateurs en aval qui aboutissent à la sécrétion de ROS, de la lactoferrine, de la MPO et de la MMP-9, ainsi que de l'IL-8. De la même manière que TREM-1, les ligands d'OSCAR ne sont pas très bien définis. A ce jour, le collagène serait le seul ligand d'OSCAR (193, 194).

1.6.1.10 CEACAM3

La molécule d'adhésion cellulaire 3 associée à l'antigène carcino-embryonnaire (**CEACAM-3** ou **CD66d**) est exclusivement exprimée par des neutrophiles humains. CEACAM-3 fonctionne comme un **récepteur activateur** grâce aux domaines activateurs « **ITAM** » qui le composent (195, 196). L'engagement de CEACAM3 par liaison avec des **composés microbiens**, déclenche une cascade de signalisation dépendante de Syk-, PKC δ - et Tak1 qui entraîne l'activation d'une réponse transcriptionnelle dépendante de NF- κ B, avec pour conséquence l'activation de la **phagocytose**, une production élevée de **ROS**, et une sécrétion augmentée de **cytokines pro-inflammatoires** (195–197).

1.6.1.11 Récepteurs du complément

On distingue à ce jour 6 types de récepteurs du complément (CR) exprimés à la surface des cellules immunitaires, le CR1 (CD35), CR2 (CD21), CR3 (MAC-1), CR4 (ITGAX), C3aR et le C5aR (CD88) (198). A ce jour, **CR3**, **C3aR** et **C5aR** jouent des rôles importants dans la biologie des neutrophiles. En fonction du contexte, CR3 va **retarder ou induire l'apoptose** des neutrophiles (199). Lorsque CR3 est activé, celui-ci va déclencher une cascade de signalisation qui va stimuler Akt, inhibant l'apoptose. Lorsque CR3 est activé mais en présence de molécules pro-apoptotiques (TNF- α par exemple), cela va conduire à l'inhibition d'Akt et donc l'induction de l'apoptose. CR3 étant une **intégrine** (hétérodimère CD11b/CD18), celle-ci va avoir une grande variété de ligands. Par conséquent, l'interaction du CR3 des neutrophiles avec un tissu ou un élément exprimant son ligand, va leur permettre de retarder leur apoptose, tant qu'il n'y a pas de signaux pro-apoptotiques. L'adhérence des neutrophiles via CR3 au fibrinogène repousse significativement leur apoptose spontanée (199). CR3 joue également un rôle important dans l'induction des fonctions cytotoxiques des neutrophiles notamment par la production de ROS (118). Le **C3aR** serait quant à lui important dans la mobilisation des neutrophiles de la moelle osseuse vers le sang périphérique (200, 201). D'autre part, C3aR semblerait être nécessaire dans la production de NET de manière spontanée ou induite par le LPS (202). Enfin, **C5aR** serait, lui, important pour l'**adhésion** des neutrophiles à l'endothélium dans un modèle murin d'arthrite induite par la déposition de complexes immuns (203). De plus, C5aR serait aussi important pour la production de **ROS** par les neutrophiles suite à une activation induite par les anticorps cytoplasmiques anti-neutrophiles (ANCA) dans un modèle de glomérulonéphrite chez l'Homme *in vitro* (204).

1.6.1.12 SIGLEC-14

SIGLEC-14 fait partie de la grande famille des lectines de type immunoglobuline liant les acides sialiques (SIGLEC) (205). Alors que la grande majorité des SIGLEC sont des récepteurs inhibiteurs expliqués par leurs domaines inhibiteurs « ITIM », quelques SIGLEC, comme le SIGLEC-14 ont des activités activatrices grâce à leurs domaines activateurs « **ITAM** » (205). Un variant polymorphique du gène SIGLEC-14 chez l'Homme a été associé à un risque réduit de complication de la bronchopneumopathie chronique obstructive (COPD en anglais), suggérant que SIGLEC-14 contribuerait à l'aggravation de cette maladie (206). Il a en effet été montré que la variant polymorphique de SIGLEC-14 (SIGLEC-14^{-/-}) était associé à une inhibition des fonctionnalités pro-inflammatoires des neutrophiles par rapport à ceux des individus ayant la forme commune (SIGLEC-14^{+/+}) (207). En effet, à la suite d'une stimulation au LPS, les neutrophiles SIGLEC-14^{-/-} présentent une diminution significative de la production de ROS et de NET par rapport aux neutrophiles SIGLEC-14^{+/+} (207). Ces résultats suggèrent donc que SIGLEC-14 agit comme un récepteur activateur sur les neutrophiles, au moins sous stimulation au LPS.

1.6.2 Les récepteurs inhibiteurs

Les récepteurs inhibiteurs sont les récepteurs qui possèdent un domaine inhibiteur **ITIM** induisant en aval une cascade de signalisation résultant en l'inhibition des fonctions effectrices des neutrophiles. On a décrit plusieurs types de récepteurs inhibiteurs exprimés à la surface des neutrophiles (**Figure 7**).

1.6.2.1 FcγRIIB (CD32B)

Le récepteur FcγRIIB à **faible affinité** pour les IgG est le seul **récepteur Fc inhibiteur** connu à ce jour (139). Le FcγRIIB possède en effet dans son domaine intracytoplasmique un immuno-récepteur aux motifs inhibiteurs basé sur les tyrosines (**ITIM**), qui confère au FcγRIIB des fonctionnalités inhibitrices lorsqu'il est co-engagé avec d'autres récepteurs activateurs (208). L'expression de FcγRIIB est très faible sur les neutrophiles humains en condition basale (209, 210), mais peut se voir augmenter après une nuit de culture en présence de G-CSF et d'IFN-γ (210).

1.6.2.2 CEACAM-1

L'activation de la protéine de surface CEACAM-1 va induire le recrutement des phosphatases inhibitrices **SHP-1** et **2** aux domaines **ITIM** phosphorylé de CEACAM-1 (211). Le recrutement puis l'activation de la phosphatase SHP-1 va ensuite conduire à l'inhibition de la production de la forme active de la cytokine pro-inflammatoire **IL-1 β** induite par la stimulation du TLR-4 par le LPS (211). CEACAM-1 agit donc comme un régulateur négatif des fonctions pro-inflammatoires des neutrophiles. Ce mécanisme est en particulier utilisé par certaines bactéries (comme *Neisseria*) afin d'inhiber l'inflammation et donc éviter leur élimination par le système immunitaire (212).

1.6.2.3 SIRP α

Une étude menée chez la souris a montré *in vitro* et *in vivo* (modèle de péritonite induite par le Zymosan) que les domaines inhibiteurs **ITIM** du récepteur SIRP α inhibaient la migration trans-endothéliale des neutrophiles (213). De récentes évidences ont montré que le récepteur inhibiteur SIRP α diminuait les capacités d'**ADCC** des neutrophiles contre les cellules tumorales (140, 214, 215). Le blocage de leur interaction avec leur ligand CD47 par l'utilisation d'un anticorps anti-SIRP α ou anti-CD47 améliore la lyse des cellules tumorales par les neutrophiles (140, 214, 215).

1.6.2.4 SIGLEC-5 et SIGLEC-9

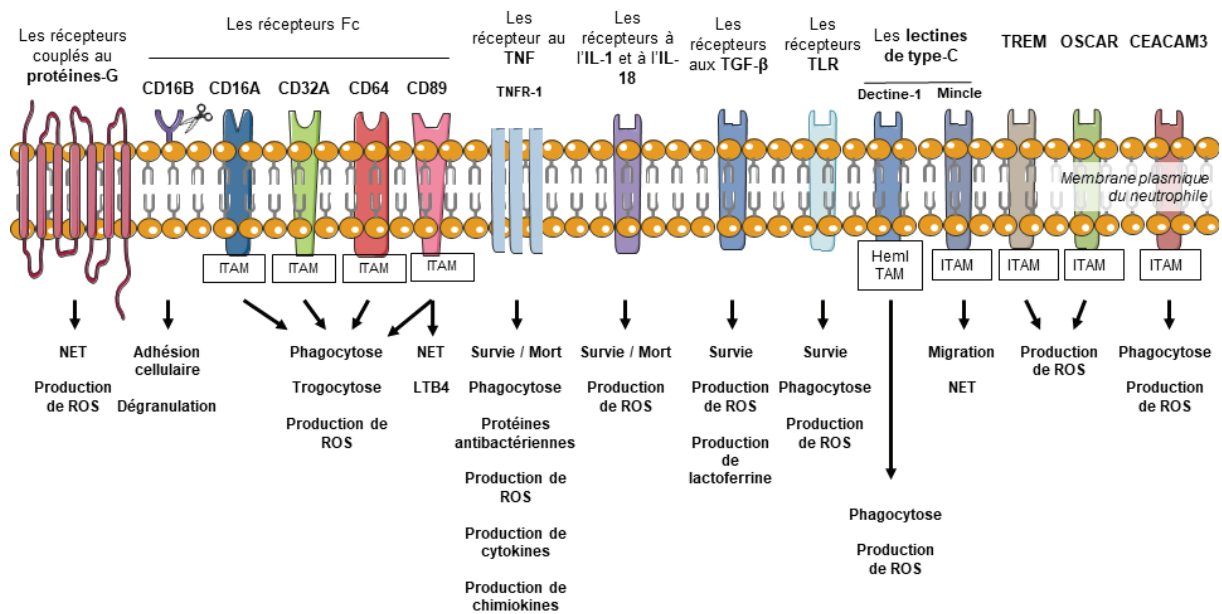
Les récepteurs SIGLEC sont une famille de récepteurs de surface membranaire qui se lie aux **acides sialiques** (principalement exprimés à la surface des agents infectieux) (205). La stimulation du SIGLEC par l'acide sialique conduit à la phosphorylation des domaines **ITIM** pour ensuite y recruter les phosphatases **SHP-1** et **2** afin de déclencher les signaux inhibiteurs (205). On distingue plusieurs types de récepteurs SIGLEC répartis sur l'ensemble des leucocytes. A ce jour, on note l'existence de seulement 2 récepteurs inhibiteurs SIGLEC exprimés à la surface des neutrophiles : le **SIGLEC-5** et le **SIGLEC-9**. L'activation du SIGLEC-5 ou SIGLEC-9 conduit à l'inhibition de la production de **ROS** et de **NET** à la suite d'infections bactériennes (216, 217). Outre leur expression sur certains pathogènes, les acides sialiques peuvent être également exprimés par les érythrocytes (globules rouges). La glycophorine-A est un exemple de glycoprotéine exprimée à la surface des érythrocytes qui contient des résidus d'acides sialiques, qu'on appelle **sialoglycoprotéines**. Ces sialoglycoprotéines des érythrocytes interagissent avec les SIGLEC-9 des neutrophiles pour inhiber leur chimiotaxie, leur production de ROS et de NET déclenchée par différents activateurs (218). Dans la même étude, l'engagement de SIGLEC-9 retarde même l'apoptose spontanée des neutrophiles. L'inhibition de l'activation des neutrophiles par leur interaction avec les érythrocytes, permettrait aux neutrophiles de rester

« quiescents » dans la circulation sanguine et ainsi éviter de causer des dommages tissulaires inappropriés.

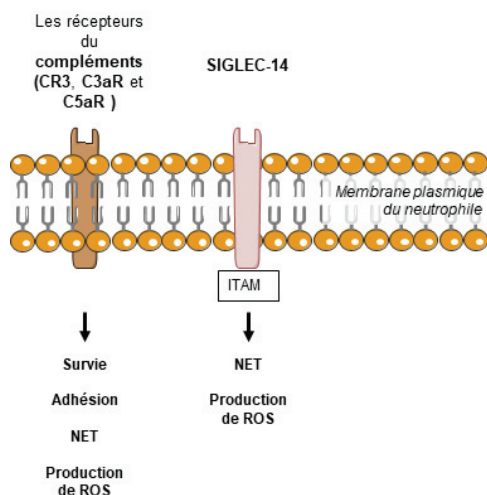
Comme nous l'avons vu précédemment pour CEACAM-1, les bactéries *Streptococcus* de groupe A et B sont également capables de contourner le système immunitaire anti-infectieux grâce à la stimulation des récepteurs inhibiteurs SIGLEC. Cette stratégie leur permettrait de survivre pour infecter leurs hôtes durablement.

Figure 7. Les récepteurs activateurs et inhibiteurs des neutrophiles.

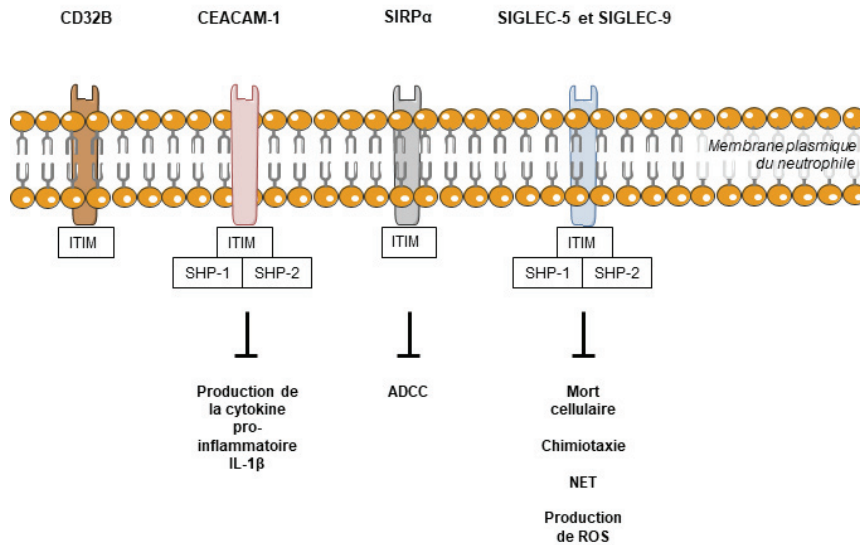
Les récepteurs activateurs



Les récepteurs activateurs (suite)



Les récepteurs inhibiteurs



1.7 Les agrégats neutrophiles-plaquettes (ANP)

Au-delà de leur rôle essentiel dans la coagulation sanguine, les plaquettes, l'élément le plus abondant du sang humain, peuvent s'associer aux neutrophiles formant ainsi des agrégats neutrophiles-plaquettes (**ANP**), ou **NPA** en anglais pour « neutrophil-platelet aggregates ». Cette partie, reprenant les connaissances fondamentales sur les NPA sera particulièrement importante pour la bonne compréhension de notre article qui sera présenté et discuté dans la partie résultats (Article intitulé : « Circulating neutrophils bound to platelets possess a distinct gene signature that is associated with patient's prognosis in selected tumor types »). De plus en plus d'évidences démontrent que l'agrégation plaquettaire sur les neutrophiles leur confère des fonctionnalités bien particulières en contexte physiologique et pathologique. Nous prendrons soin de faire un état des lieux des différents rôles des ANP, avant de présenter (i) les **méthodes** permettant de visualiser et quantifier les ANP, (ii) les **facteurs déclencheurs** de la formation des ANP (iii) et les **couples récepteurs/ligands** impliqués dans l'interaction entre le neutrophile et la plaquette.

1.7.1 Impact de l'agrégation plaquettaire sur les fonctions des neutrophiles

1.7.1.1 Augmentation des capacités d'extravasation des neutrophiles

Plusieurs évidences *in vivo* chez la souris ont montré l'importance des plaquettes dans l'extravasation des neutrophiles au site inflammatoire (**Figure 8**). Dans un modèle murin de **lésions pulmonaires aiguës** induites par le LPS, la déplétion spécifique des plaquettes par l'injection de sérum de lapin contenant des **anticorps anti-plaquettes** a réduit considérablement le recrutement des neutrophiles dans le tissu pulmonaire inflammé

(219, 220). Le couple récepteur/ligand sélectine-P/PSGL-1 est souvent nécessaire pour l'interaction entre le neutrophile et la plaquette. Le blocage de PSGL-1 par un anticorps bloquant **anti-PSGL-1** inhibe le recrutement des neutrophiles au site inflammatoire (221, 222).

La microscopie intravitale *in vivo* chez la souris a permis de décrire le mécanisme par lequel les plaquettes induisent le recrutement des neutrophiles dans les tissus (221). Dans le sang périphérique, les neutrophiles circulants migrent jusqu'au site inflammatoire où ils s'arrêtent par adhésion à l'endothélium des vaisseaux sanguins à proximité du site inflammatoire. Les cellules endothéliales transmettent alors des signaux activateurs aux neutrophiles augmentant ainsi leur affinité de liaison pour les plaquettes présentes en grande quantité dans la circulation sanguine. Les plaquettes, une fois « attachées » aux neutrophiles, leur transmettent les derniers signaux nécessaires pour entamer la migration trans-endothéliale dans le tissu inflammé. Une étude récente montre qu'il s'agit d'un **échange réciproque de molécules secrétées** entre le neutrophile et la plaquette qui permet d'induire la migration trans-endothéliale du neutrophile (223). Dans un modèle d'infection bactérienne pulmonaire (pneumonie induite par *Escherichia Coli*), la première interaction entre le neutrophile et la plaquette permet à cette dernière *via* ses **glycoprotéines Iba (GPIba)** d'induire la sécrétion d'**acide arachidonique** par les neutrophiles (223). En retour, l'acide arachidonique va pénétrer dans la plaquette pour être métabolisé par la **cyclooxygénase 1 (COX-1)** et synthétiser le **thromboxane A₂ (TxA₂)**. Le TxA₂ dérivé des plaquettes va ensuite induire l'expression d'**ICAM-1** à la surface des cellules endothéliales pour faciliter et guider le rampeur ou « crawling » (en anglais) des neutrophiles le long de l'endothélium puis leur migration trans-endothéliale jusqu'au site infectieux. Une interaction physique et un dialogue biochimique sont donc nécessaires pour que la plaquette puisse faciliter l'extravasation des neutrophiles au site inflammatoire.

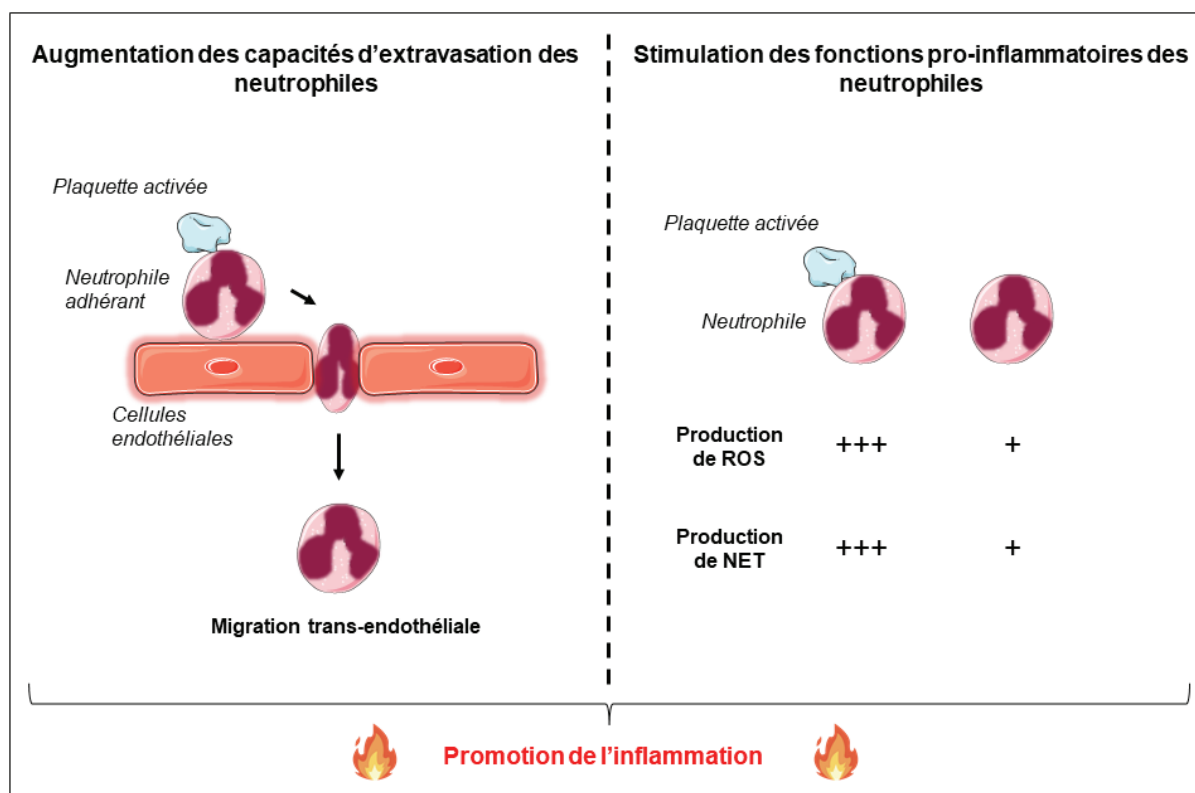
1.7.1.2 Stimulation des fonctions pro-inflammatoires des neutrophiles

Les plaquettes sont également capables de stimuler les fonctions pro-inflammatoires des neutrophiles (**Figure 8**). Dans un modèle murin de **sepsis** induit par *Escherichia Coli*, il a été observé que les neutrophiles intravasculaires des sinusoides du foie produisaient de grandes quantités de **NET** (220). Les auteurs ont montré que cette production de NET était dépendante de l'agrégation plaquettaire sur les neutrophiles puisque la déficience génétique de l'intégrine LFA-1 (pour « lymphocyte function-associated antigen 1 »), impliquée dans l'interaction entre la plaquette et le neutrophile a permis de réduire de façon significative la production de NET. De plus, l'activation des plaquettes semble être nécessaire pour la

production de NET par les ANP (224, 225), même si les activateurs plaquettaires en contexte physiopathologique ne sont encore pas très bien identifiés à ce jour.

En plus de leur rôle dans l'induction de la production de NET par les neutrophiles, les plaquettes sont également importantes pour stimuler la production de ROS. Les patients atteints de la **drépanocytose** (maladie héréditaire touchant l'hémoglobine des globules rouges) présentent des niveaux élevés de ANP dans le sang périphérique (225). La production de ROS mesurée par le niveau d'oxydation de la **dihydrorhodamine 123 (DHR)** est significativement plus élevée dans les ANP que dans les neutrophiles seuls (226). Les ANP ne sont pas restreints aux conditions pathologiques, car ils sont aussi présents dans le sang périphérique d'individus sains (222, 226–230). Chez les donneurs sains, la production de ROS est également significativement plus élevée dans les ANP que dans les neutrophiles seuls. Cela suggère qu'indépendamment des effets liés à la maladie, les ANP produisent de façon intrinsèque plus de ROS par rapport aux neutrophiles seuls (227).

Figure 8. Rôles des ANP en contextes physiopathologiques.



1.7.2 Méthodes pour visualiser les ANP

Dans cette partie, nous présenterons les différentes technologies permettant de visualiser et quantifier les ANP chez l'Homme et chez la souris.

1.7.2.1 Cytométrie en flux « classique » et cytométrie en image (ImageStream®X)

Historiquement les ANP ont d'abord été identifiés dans le **sang** périphérique humain (227) grâce à la **cyrtométrie en flux**, sur la base de la forte expression d'un des marqueurs de neutrophile (chez l'Homme : **CD15** et **CD66b** ; chez la souris : **Ly6G**) et de plaquette (chez l'Homme et chez la souris : **CD41** et **CD61**) (227, 231, 232). Cette méthode permet ainsi de quantifier la proportion des ANP à partir d'une suspension cellulaire. Cependant, il a récemment été montré que la **dilution de l'échantillon** et la **vitesse de passage** (vitesse de la fluïdique) de celui-ci influençaient la proportion de ANP (233). Les auteurs ont montré qu'à vitesse de passage égale, plus l'échantillon était concentré plus la proportion de ANP dans l'échantillon était élevée. De la même manière, à concentration égale, plus la vitesse de passage était grande, plus la proportion de ANP dans l'échantillon était élevée. Cette surestimation du pourcentage de ANP dans des échantillons fortement concentrés et/ou analysés avec une grande vitesse de passage s'explique principalement par la génération d'un grand nombre de **faux positifs** (détection simultanée d'une plaquette et d'un neutrophile sans être en interaction, aussi appelés « **événements coïncidents** »), détectés par **cyrtométrie en image (ImageStream®X)** (234). Cette technologie combine la cyrtométrie en flux avec l'imagerie et permet de visualiser la morphologie, l'intensité et la répartition du marquage pour chacune des cellules acquis par le cytomètre. Grâce à l'ImageStream®X, il a été possible de montrer que certains agrégats plaquettes-monocyte (événement doubles positifs pour un des marqueurs de plaquette et de monocyte) étaient **coïncidents** (faux positifs) (234), c'est-à-dire que la plaquette était suffisamment à distance du monocyte pour ne pas être considérée comme agrégée à celui-ci. Cependant, le coût d'utilisation de cette technologie reste élevé et le temps d'analyse est relativement long. L'utilisation d'un cytomètre classique peut néanmoins être une alternative en prenant en considération les limites détaillées juste avant pour réduire au maximum le risque de faux négatifs. C'est à dire (i) éliminer au maximum les plaquettes libres par centrifugation basse, (ii) diluer au maximum les échantillons avec leurs passages au FACS et (iii) réduire au maximum la vitesse de passage des échantillons.

1.7.2.2 Immunohistochimie *in situ*

L'étude des ANP n'est pas restreinte au sang et a également été rapportée dans les tissus grâce à *l'immunohistochimie in situ* (231, 232). De la même manière que la cyrtométrie en flux, la visualisation des ANP dans les tissus se fait en combinant des marqueurs spécifiques des neutrophiles (Neutrophil élastase, Myeloperoxydase) et des

plaquettes (CD41, CD42b) (232). Les ANP sont identifiés par la colocalisation des marqueurs neutrophiles et plaquettaires.

1.7.2.3 Microscopie intravitale

La microscopie intravitale est une technique d'imagerie qui permet de visualiser par détection de signaux fluorescents, un événement biologique à très haute résolution (à l'échelle de la cellule) et en temps réel. Cette technique a déjà fait ses preuves pour la visualisation des ANP *in vivo* chez la souris (221, 222, 235). Le marquage *in vivo* des neutrophiles et des plaquettes se fait par injection en intraveineuse d'anticorps fluorescents spécifiques des neutrophiles (anti-Ly6G) et des plaquettes (anti-CD41) (221, 222). L'utilisation de souris génétiquement modifiées dans le but d'avoir des cellules myéloïdes fluorescentes, combinée avec l'injection d'anticorps spécifiques des plaquettes (anti-CD41) a également permis l'observation d'agrégats cellules myéloïdes-plaquettes *in vivo* (222). Ce sont notamment les souris « LysM-GFP » qui sont utilisées pour visualiser les cellules myéloïdes *in vivo*. Dans ce modèle murin, le gène codant pour la protéine à fluorescence verte (« green fluorescent protein », ou GFP) est inséré dans le gène de la lysozyme 2 dont l'expression est restreinte aux cellules myéloïdes (236). Ces agrégats sont identifiés sur la base de la colocalisation de la fluorescence associée aux neutrophiles (ou de la cellule myéloïde) et celle associée aux plaquettes.

1.7.2.4 Système microfluidique

Le système microfluidique vise à recréer *in vitro* les conditions physiologiques de la circulation sanguine et de permettre l'observation par microscopie des interactions plaquettes-neutrophiles en temps réel (237). Les neutrophiles et les plaquettes sont isolés séparément puis marqués par le **Hoechst** (marque l'ADN des noyaux des neutrophiles) et la **Calcéine** (marquage de la membrane plasmique des plaquettes) respectivement. Les cellules marquées sont ensuite perfusées à travers une chambre recouverte de protéines ou de cellules immobilisées. La pression sanguine peut être ajustée au moyen de pompes. Les ANP peuvent ainsi être visualisés en temps réel *in vitro*.

1.7.3 Origines de la formation des ANP

La formation des ANP nécessite l'interaction entre deux types cellulaires bien distincts, le neutrophile et la plaquette. En contexte physiopathologique, la formation des ANP nécessite l'activation des neutrophiles et des plaquettes. Dans de nombreux cas, les

neutrophiles sont pré-activés en amont par les cellules endothéliales avant se s'agréger aux plaquettes (**Figure 9**). Cependant, il se peut, dans d'autres contextes, que la formation des ANP soit indépendante de la pré-activation par les cellules endothéliales (**Figure 9**). C'est ce que nous allons voir dans cette partie.

1.7.3.1 Formation des ANP dépendante de l'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales

Nous avons vu précédemment que l'agrégation plaquettaire sur les neutrophiles a un impact fonctionnel sur leur biologie. Cette interaction entre la plaquette et le neutrophile s'opère généralement au niveau de **l'endothélium des vaisseaux sanguins** situé à proximité du tissu inflammé, tout du moins dans un modèle de **lésions pulmonaires aiguës** (221) et d'**infarctus aigu du myocarde** (222) *in vivo* chez la souris. Grâce à la microscopie intravitale, il a été possible de décrire précisément les étapes de formation des ANP *in vivo*. Tout d'abord, les neutrophiles du sang s'attachent aux cellules endothéliales des vaisseaux sanguins pour les activer. En retour, les cellules endothéliales activent les neutrophiles adhérent. **L'activation des neutrophiles par l'endothélium** va induire leur polarisation, c'est à dire la relocalisation du ligand de la sélectine-P (PSGL-1) du côté opposé à l'endothélium, du côté de la circulation sanguine. Cette polarisation des neutrophiles a pour conséquence une augmentation de l'affinité d'interaction des neutrophiles avec les plaquettes activées exprimant la sélectine-P (CD62-P) de la circulation sanguine, créant ainsi les ANP à la surface des vaisseaux sanguins.

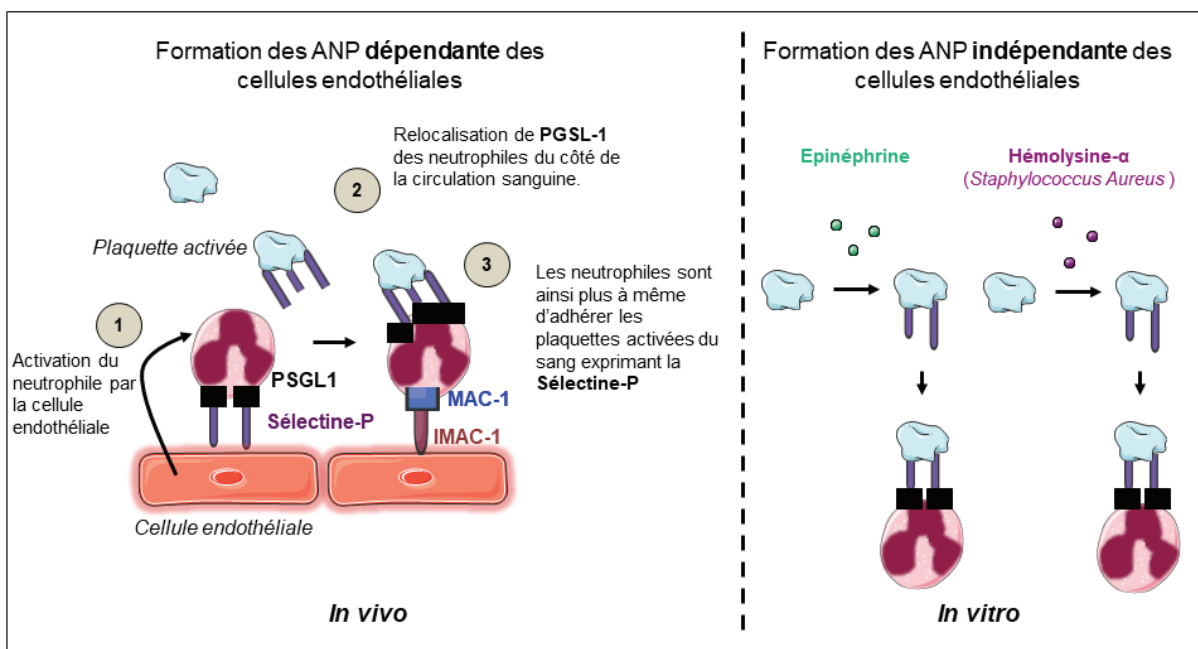
Dans un modèle de **sepsis** utilisant un système microfluidique *in vitro*, **l'adhérence des neutrophiles** à l'endothélium est une étape essentielle pour leur interaction par la suite avec les plaquettes (224). Cependant, dans ce modèle, **l'activation des plaquettes** par un agoniste du **TLR-4** (comme le LPS) est aussi nécessaire pour leur adhésion aux neutrophiles.

1.7.3.2 Formation des ANP indépendante de l'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales

Dans certains contextes, la formation des ANP peut être indépendante de l'adhésion avec les cellules endothéliales. On rapporte que l'activation de sang total de donneurs sains par **l'épinéphrine** est suffisante pour induire la formation des ANP *in vitro* (222, 238). Cependant, il n'est toujours pas clair si l'épinéphrine induit la formation des ANP par activation du neutrophile, de la plaquette ou des deux. Il est cependant connu que l'épinéphrine induit l'agrégation plaquettaire (239, 240). L'induction de l'agrégation plaquettaire par l'épinéphrine est-elle suffisante pour induire la formation de ANP ?

Des évidences plus récentes ont montré que l'**hémolysine- α (exotoxine)** dérivée de ***Staphylococcus Aureus*** était capable de stimuler la formation de ANP dans du sang total humain *in vitro* (241). Alors que la pré-activation des neutrophiles (par l'exotoxine) avant d'être remis en coculture avec les plaquettes, ne conduit pas à la formation de ANP, la pré-activation des plaquettes avant coculture conduit à une nette augmentation de la formation des ANP. Ces résultats suggèrent donc que l'hémolysine- α dérivée de *Staphylococcus Aureus* induit la formation des ANP par l'activation de la plaquette plutôt que du neutrophile. Dans ce modèle d'étude, l'interaction entre la plaquette et le neutrophile a été rapportée comme étant strictement dépendante de la **sélectine-P** exprimé par la plaquette activée.

Figure 9. Origines de la formation des ANP.



1.7.4 Récepteurs/ligands impliqués dans l'interaction entre le neutrophile et la plaquette ainsi que leurs inhibiteurs

Dans cette partie, nous ferons non seulement un point sur les molécules d'adhésion (couples récepteurs/ligands) importantes pour la formation des ANP, mais également sur les inhibiteurs pharmacologiques qui permettent d'inhiber l'interaction entre le neutrophile et la plaquette (**Figure 10**).

1.7.4.1 Le couple sélectine-P/PSGL-1 ou CD15 ou CD24

La sélectine-P, marqueur d'activation plaquettaire, est stockée dans les granules des plaquettes à l'état basal et exposée à la surface lors de la stimulation par des agonistes tels que l'ADP (242, 243). La sélectine-P des plaquettes a pour ligand le PSGL-1 qui est constitutivement exprimé par les neutrophiles (244). La grande majorité des ANP requiert le couple sélectine-P et PSGL-1 pour l'adhésion des neutrophiles aux plaquettes (221). En effet, les souris génétiquement déficientes en PSGL-1 présentent une incapacité pour les neutrophiles à se lier aux plaquettes *in vivo*, effet également observé suite à l'injection d'anticorps **anti-PSGL-1** (221), **anti-CD62-P** (245) *in vivo* chez la souris. Chez l'Homme, les anticorps anti-PSGL-1 (246) et anti-CD62-P (233) sont également capables d'interrompre l'interaction entre les neutrophiles et les plaquettes. Plus récemment, un **analogue structural de PSGL-1** a montré son efficacité à se lier avec une forte affinité à la sélectine-P humaine (247) et donc à empêcher la formation d'ANP *in vitro* et *in vivo*. La fixation de la sélectine-P nécessite la sialylation de ses différents ligands comme le PSGL-1 (244). **CD15** (connu aussi sous le nom de Sialyl-Lewis X, le marqueur standard des neutrophiles chez l'Homme), un **tétrasaccharide sialylé** fortement exprimé par les neutrophiles, serait lui aussi impliqué dans l'adhésion avec les plaquettes via la sélectine-P (248). Bloquer l'interaction entre CD15 et la sélectine-P pourrait donc constituer une nouvelle stratégie permettant d'inhiber la formation des ANP. **CD24**, une glycoprotéine sialylée, est, elle aussi, importante dans l'adhésion avec les plaquettes via la sélectine-P (249). Cependant, peu d'études se sont intéressées à l'expression de CD24 sur les neutrophiles. Une étude menée chez la souris a montré que CD24 était plus fortement exprimé sur les **neutrophiles âgés** CXCR4⁺ CD62-L^{low} par rapport aux neutrophiles jeunes/conventionnels CXCR4⁻ CD62-L^{hi} (103). Une autre étude cette fois-ci chez l'Homme a montré que l'expression de CD24 pouvait être induite après stimulation par des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IFN- γ , et le GM-CSF. Il est possible que d'autres molécules sialylées pourraient également se lier à la sélectine-P.

1.7.4.2 Le couple Glycoprotéine Iba (GPIba)/MAC-1

MAC-1 (l'hétérodimère **CD11b/CD18**) est une intégrine exprimée constitutivement par les neutrophiles. MAC-1 interagit avec de nombreux ligands tels que ICAM-1 (CD54), le fibrinogène, les molécules du complément, mais aussi avec la glycoprotéine Iba (**GPIba**) (250). Le principal site de liaison de MAC-1, pour la plupart des ligands, est situé dans le domaine inséré (I) dans la sous-unité CD11b. Des études *in vitro* ont montré que la région N-terminale (Phe201-Gly268) de GPIba se lie au domaine « I » de l'intégrine MAC-1, induisant ainsi une liaison stable entre les plaquettes et les neutrophiles (251). Les neutrophiles de souris WT, mais pas ceux de souris déficientes pour MAC-1, se lient à la GPIba purifié et aux plaquettes adhérentes (251). De plus, les neutrophiles de souris génétiquement

déficientes pour GPIIb α ont également perdu la capacité à se fixer aux plaquettes (252) démontrant que **MAC-1** et **GPIIb α** sont impliqués dans l'adhésion des plaquettes aux neutrophiles. Un anticorps (appelé « **anti-M2** ») capable de bloquer spécifiquement la liaison de MAC-1 à GPIIb α a été développé (253). Son efficacité *in vivo* a été démontrée dans plusieurs modèles précliniques (253–255). Cependant, il n'est pas clairement établi que l'anticorps « anti-M2 » prévienne la formation des ANP. Dans un système de micro fluidique *in vitro*, dans lequel était perfusé du sang de patients atteints de drépanocytose, l'ajout d'un **petit peptide cyclique antagoniste** (appelé « **CCP-224** ») spécifique de la **GPIIb α humaine**, abolit drastiquement l'interaction plaquettes-neutrophiles (230). Récemment, une étude a montré que la glucosamine (identifiée par un « screen » de petites molécules) était également capable d'inhiber spécifiquement l'interaction **GPIIb α / MAC-1** chez l'Homme (255). De futures études permettront de savoir si la glucosamine peut empêcher la formation des ANP.

1.7.4.3 Le couple intégrines α IIb β 3/MAC-1

L'**intégrine α IIb β 3** (aussi connu sous le nom de **CD41**) est une des molécules les plus exprimées à la surface des plaquettes. CD41 est aussi impliqué dans l'adhésion avec les neutrophiles *via* leur expression de **MAC-1**, puisque son inhibition réduit l'interaction entre les neutrophiles et les plaquettes (256). La dépendance du couple CD41/MAC-1 dans l'adhésion des neutrophiles aux plaquettes est contrastée par une autre étude qui montre qu'au contraire l'inhibition de CD41 n'altère pas l'interaction entre neutrophiles et plaquettes (257). L'anticorps antagoniste de CD41 (connu sous le nom de « **Abciximab** ») est déjà utilisé en clinique dans certaines pathologies, comme les maladies cardiaques, dans le but de diminuer l'agrégation plaquettaire (258). Cependant, de nombreux effets secondaires ont été rapportés, notamment des risques élevés d'hémorragie (258). Le **Tirofiban**, petite molécule antagoniste de CD41 qui inhibe son interaction avec le fibrinogène (259), est également utilisé en clinique. Cependant, bien que le Tirofiban cible principalement les plaquettes, le risque hémorragique semble être moins élevé qu'avec l'Abciximab (260).

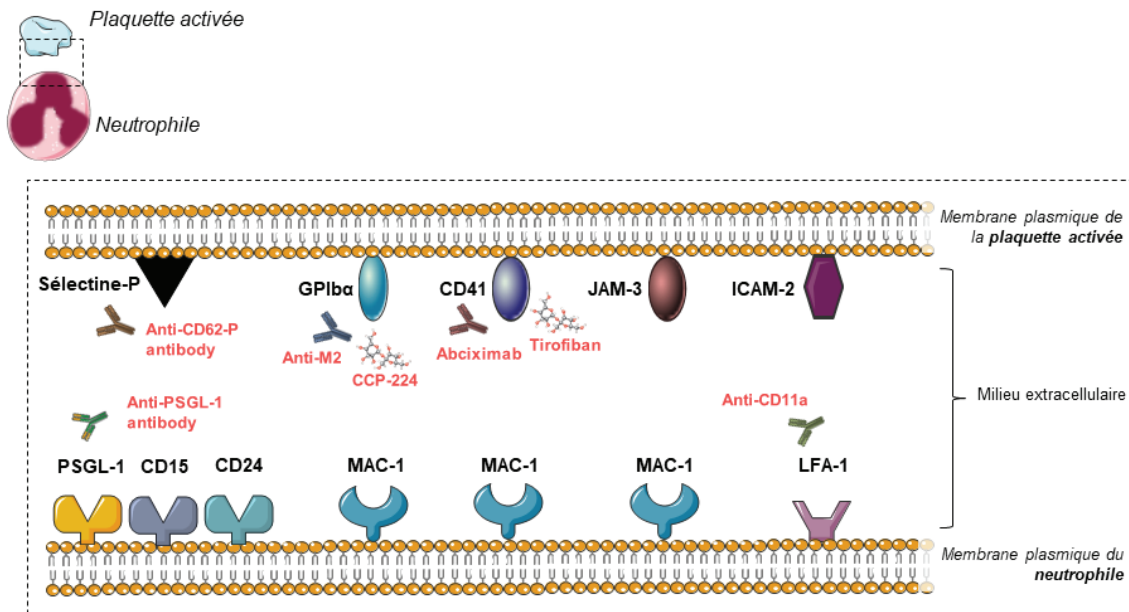
1.7.4.4 Le couple molécules d'adhésion jonctionnelle-3 (JAM-3)/MAC-1

JAM-3, exprimé par les plaquettes chez l'Homme a également été rapporté pour être important dans l'interaction avec le neutrophile *via* **MAC-1**. L'utilisation d'anticorps anti-JAM-3 *in vitro* prévient la formation de ANP à la suite d'une stimulation au phorbol myristate acetate (PMA) (261).

1.7.4.5 Le couple intégrine α L β 2 (aussi connu sous le nom de LFA-1)/ICAM-2

A la fois chez l'Homme et chez la souris L'intégrine α L β 2 (connue sous le nom de LFA-1, l'hétérodimère CD11a/CD18) exprimée par les neutrophiles serait également essentielle pour la liaison avec les plaquettes via la protéine ICAM-2 (220). Dans un modèle murin génétiquement déficient en LFA-1, la formation d'agrégats neutrophiles-plaquettes est fortement altérée pendant le sepsis (220). Chez l'Homme, le blocage de LFA-1 par l'anticorps antagoniste de l'antigène CD11a, constituant de l'intégrine LFA-1, réduit significativement la formation des ANP *in vitro* après stimulation au LPS (220). Cependant, LFA-1 étant exprimé par plusieurs types cellulaires, son blocage aurait de fortes chances d'induire de nombreux effets non-désirés autres que celui d'interrompre l'interaction entre le neutrophile et la plaquette.

Figure 10. Récepteurs/ligands impliqués dans l'interaction entre le neutrophile et la plaquette ainsi que leurs inhibiteurs.



CHAPITRE 2 : Rôle des neutrophiles dans le cancer

2.1 Évaluation de l'impact pronostique des neutrophiles

Historiquement, l'impact pronostique des neutrophiles dans le cancer a d'abord été mis en évidence dans le **sang** de patients. Cela s'explique notamment par la grande facilité à pouvoir collecter les données de numération sanguine faites en routine. Un bon nombre d'études rétrospectives sous forme de méta-analyses ont pu mettre en évidence le mauvais pronostique d'un rapport élevé de la concentration en neutrophiles sur la concentration en lymphocyte dans le sang (le rapport neutrophiles/lymphocytes, également appelé **NLR** pour « neutrophil-to-lymphocyte ratio ») dans des contextes de tumeurs localisées ou métastatiques (18, 262–264). Outre l'augmentation de la concentration des neutrophiles dans le sang des patients, ceux-ci se retrouvent également infiltrés dans les tumeurs. Ces neutrophiles associés aux tumeurs sont appelés plus communément **TAN** (pour « tumor-associated neutrophils »), et sont le plus souvent associés à un mauvais pronostique chez les patients dans de nombreux cancers. Néanmoins dans d'autres types de tumeurs, des évidences montrent à l'inverse un meilleur pronostique des TAN chez les patients. Dans cette partie, nous aborderons dans un premier temps, l'impact pronostique des neutrophiles dans le sang avant d'aborder l'impact pronostique des neutrophiles dans la tumeur.

2.1.1 Neutrophiles, MDSC, G-MDSC ou PMN-MDSC : un consensus ?

Parce que la caractérisation des neutrophiles dans le cancer est relativement récente, plusieurs dénominations associées aux neutrophiles ont vu le jour, et certaines restent floues et sont parfois utilisées de façon abusive. Il est par conséquent nécessaire de préciser la définition de chacune d'entre elles.

Historiquement, l'acronyme MDSC pour « myeloid-derived suppressor cells » a été le premier utilisé pour faire référence aux cellules myéloïdes suppressives infiltrant les tumeurs, essentiellement chez la souris (265). Le terme « suppressif » vient du fait que ces cellules myéloïdes, identifiées sur la base de l'expression du marqueur Gr1 (pour GPI-linked myeloid differentiation marker), sont capables de supprimer la prolifération des lymphocytes T, en tout cas *in vitro* (265). Cependant, cette notion de MDSC reste à ce jour encore très floue. Le marqueur Gr1 est exprimé à la fois par les granulocytes (en particulier par les neutrophiles dans la grande majorité des cas) et à la fois par les monocytes associés aux tumeurs. L'ajout de marqueurs discriminant les neutrophiles ($CD11b^+ Ly6G^{high} Ly6C^{low}$) des monocytes ($CD11b^+ Ly6G^{low} Ly6C^{high}$) a donc permis de distinguer deux sous-populations de MDSC, les

G-MDSC (pour « granulocyte-MDSC ») des M-MDSC (pour « monocyte-MDSC ») (266). Or, l'activité suppressive des G-MDSC ou des M-MDSC est généralement testée sur l'ensemble des granulocytes (principalement les neutrophiles) ou monocytes associés aux tumeurs ne permettant donc pas de distinguer un neutrophile d'un G-MDSC et un monocyte d'un M-MDSC (265, 266). Chez l'Homme, l'équivalent des G-MDSC murins est appelé « PMN-MDSC » ($CD15^+ CD66b^+ CD11b^+ CD14^-$ faisant référence aux granulocytes majoritairement de type neutrophiles) alors que l'équivalent des M-MDSC reste M-MDSC ($CD15^- CD66^- CD11b^+ CD14^+ HLA-DR^{low/-}$ faisant références aux monocytes) (266). Dans la plupart des cas chez l'Homme, neutrophiles ou monocytes sont appelé respectivement PMN-MDSC ou M-MDSC dès lors qu'ils sont présents dans la tumeur, sans même valider leurs propriétés de suppression de la prolifération des lymphocytes T (266). Dans le sang de patients atteints de cancer solides, il a été découvert une sous-population de neutrophiles possédant des propriétés de suppression de la prolifération des lymphocytes T supérieures aux neutrophiles « conventionnels ». Ces neutrophiles fortement immunosuppresseurs correspondent au LDN, par opposition au neutrophiles « conventionnels » (appelés NDN). En 2016 l'équipe du Pr. Gabrilovich a découvert une sous-population de LDN exprimant le récepteur scavenger LOX-1 (gène OLR1) aux activités particulièrement suppressives par rapport aux LDN n'exprimant pas LOX-1 (22). Plus récemment, il a été montré que les neutrophiles exprimant LOX-1 sont présents au sein de tumeurs humaines (cancer du poumon, cancer tête et cou) où ils sont capables de supprimer la prolifération lymphocytes T ainsi que leur production de molécules cytotoxiques comme le Granzyme B (267). Par conséquent, les neutrophiles LOX-1 sembleraient faire référence aux véritables PMN-MDSC immunosuppresseurs associés aux tumeurs humaines.

Alors que certaines équipes considèrent le terme MDSC comme une famille de cellules myéloïdes suppressives regroupant les granulocytes/neutrophiles et les monocytes, d'autres associent plutôt le terme de MDSC à des neutrophiles **immatures** se distinguant notamment par l'expression du marqueur c-KIT (15, 268). Cependant, ces neutrophiles immatures présents dans le sang et les tumeurs restent uniquement documentés chez la souris (15, 268). Chez l'Homme, quelques évidences montrent qu'un faible pourcentage de neutrophiles immatures $Lin^- CD66b^+ CD117^+$ circulent dans le sang périphérique de patients atteints de cancer. Cependant, leur présence dans les tumeurs humaines reste à évaluer.

2.1.2 Impact pronostique des neutrophiles dans le sang périphérique

La numération des neutrophiles circulants est systématiquement surveillée par les oncologues pendant la prise en charge du patient porteur de tumeur/cancer, en raison de la neutropénie fébrile induite principalement par la chimiothérapie, rendant les patients plus

vulnérables aux infections et augmentant donc le risque de mortalité (269, 270). Au cours de la dernière décennie, la littérature sur le NLR n'a cessé de croître. Par exemple, il est maintenant reconnu que l'élévation du NLR est fortement associée à une faible médiane de survie sans progression (mPFS pour « median progression-free survival ») et de survie globale (mOS pour « median overall survival »), quel que soit le type de tumeur, le stade de la maladie ou le traitement (18). Il est intéressant de noter que chez les patients métastatiques, le NLR a une mauvaise valeur pronostique avant la chimiothérapie et après les lignes de traitement ultérieures dans le cadre d'une gestion plus avancée de la maladie (263). Les valeurs seuils optimales du NLR utilisées pour déterminer le risque accru de mortalité varient considérablement (entre 1,9 et 9,21) selon les études (264). De plus, la durée du suivi des patients influence le NLR, comme l'illustre le fait que les plus grandes différences observées entre les groupes de patients au niveau du pronostic se produisent dans les 12 premiers mois de suivi (263). En plus de sa valeur pronostique avant tout traitement, la diminution précoce du NLR après un seul cycle de chimiothérapie semble être également associée à bon pronostic dans de nombreux cancers : (i) cancer colorectal (271, 272) ; (ii) mésothéliome ; (iii) cancer du sein triple négatif (15) ; (iv) patients atteints de cancers du poumon, de la prostate, du cancer tête et cou ou du sein et traités par docétaxel (273) ; (v) adénocarcinome pancréatique avancé ; et (vi) lymphomes T périphériques (274).

À l'inverse, d'autres études rétrospectives n'ont pas confirmé la valeur pronostique du NLR, comme dans le cancer colorectal (275), ou dans les carcinomes des voies biliaires avancés, dans lesquels de faibles valeurs de NLR pendant la chimiothérapie n'étaient pas associées à une amélioration significative de la survie (seules les valeurs de base élevées de NLR, qui ont diminué sous chimiothérapie, prédisaient une amélioration significative de la survie globale médiane (ou mOS pour « median overall survival ») (276). Enfin, chez des patients atteints d'un cancer de la prostate traités par docétaxel, les valeurs de NLR avant traitement n'étaient pas prédictives de l'issue clinique (277).

La variation des valeurs du NLR sous thérapies ciblées semble être un biomarqueur de la réponse intéressant chez les patients atteints d'un carcinome rénal métastatique (276). Dans une analyse rétrospective sur 1199 patients traités par des thérapies ciblées (bevacizumab, axitinib, sorafénib, sunitinib, temsirolimus), les auteurs ont pu souligner la valeur prédictive de la variation du NLR entre le début de la thérapie et 6 semaines après (± 2 semaines). Ils ont utilisé une cohorte de validation de 4 350 patients provenant d'un essai clinique prospectif. Par rapport à l'absence de variation, une diminution du NLR supérieure à 25 % était associée à une amélioration significative du taux de réponse, mPFS et mOS, tandis qu'une augmentation était prédictive d'un mauvais pronostic.

L'émergence des immunothérapies anti-CTLA4 et anti-PD(L)1 offre de nouveaux espoirs dans le traitement du cancer. Toutefois, en raison d'un taux de réponse global inférieur à 40 % (278, 279), de toxicités associées de type auto-immune et des coûts élevés de ces approches thérapeutiques, l'identification des patients répondeurs est devenue nécessaire. Le NLR a récemment été identifié comme un marqueur de pronostic chez des patients traités sous immunothérapies (280–282). Des valeurs élevées du NLR avant traitement ont été associées à un meilleur pronostic des patients atteints de carcinomes pulmonaires non à petites cellules (NSCLC) métastatiques traité par anti-PD-1 (279, 283, 284).

L'inflammation systémique associée au cancer, souvent caractérisée par un NLR élevé est associée à un mauvais pronostic, et se produit en général à des stades tardifs de la tumorigenèse (285, 286). Des données suggèrent que le NLR peut augmenter dès les stades précoces (stade I et stade II), avant traitement, et être associé à un mauvais pronostic dans divers types de cancer, comme le cancer du colon (287), le cancer de la langue (288), le cancer du sein (289) ou le cancer du foie (290).

La mauvaise valeur pronostique d'un ratio NLR élevé peut être expliquée par une augmentation de la concentration en neutrophiles (neutrophilie) mais également par une diminution de la concentration en lymphocytes (lymphopénie). De récentes études montrent que la neutrophilie à elle seule est associée à une mauvaise survie de patients atteints du cancer du poumon (NSCLC) (19, 20). Bien que les valeurs seuils soient différentes entre ces deux études, il s'agit ici des premières études cliniques montrant le mauvais impact pronostique de la neutrophilie en systémique, indépendamment de la lymphopénie, chez des patients atteints de cancers solides.

2.1.3 Impacts pronostiques des neutrophiles dans les tumeurs précoces et tardives

Avant de déterminer l'impact pronostique des neutrophiles infiltrés dans les tumeurs (ou **TAN** en anglais pour « tumor-associated neutrophils »), il faut au préalable identifier et quantifier ces TAN. La coloration à l'**hématoxyline et à l'éosine (H&E)** reste une approche couramment utilisée en clinique pour quantifier l'infiltration de TAN, basée sur la morphologie unique du noyau segmenté (plurilobé) des neutrophiles matures. Cependant, cette approche peut sous-estimer la présence de neutrophiles immatures, car la morphologie de leur noyau en « bande » (ou en « fer à cheval ») est plus difficile à identifier. L'infiltration en TAN peut également être quantifiée par immunofluorescence ou immunohistochimie, en utilisant des anticorps contre des marqueurs très fortement exprimés par les neutrophiles, tels que **CD66b** et **CD15**. Cependant, les neutrophiles et les **éosinophiles** partagent de nombreux

marqueurs par leurs proximités ontologiques. Très peu d'études ont pris en compte ce biais-là. On rapporte que CD66b, lui, est exprimé au même niveau entre les éosinophiles et les neutrophiles dans le sang périphérique de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (291). Pour le CD15, bien qu'il soit exprimé à la fois à la surface des éosinophiles et des neutrophiles, les données montrent qu'il est 10 à 100 fois plus exprimé sur les neutrophiles (292). Le CD15 serait donc plus fiable pour distinguer les neutrophiles des éosinophiles, bien que l'identification d'autres marqueurs hautement discriminants entre ces deux types de cellules soit nécessaire. L'ajout du marqueur siglec-8, spécifique des éosinophiles (293) pourrait, lui, être utile en combinaison avec CD15.

Suivant les types de cancer, la densité élevée en TAN a été associée à un mauvais (294–298) ou un bon pronostic (299–301). Cette différence semble être principalement liée au stade tumoral (**Tableau 2**). Chez les patients atteints de cancer colorectal (CRC), les TAN sont associés à un bon pronostic dans les tumeurs colorectales de stade précoce, en particulier les tumeurs de stade I-II combinées (302), ou de stade II seules (303). Cette observation a récemment été confirmée sur des données transcriptomiques de bulk tumoral dans une cohorte du TCGA, où les auteurs ont montré que les tumeurs qui présentaient une plus forte expression de la signature neutrophiles avaient une meilleure survie globale (304). Une autre étude a néanmoins montré que les TAN étaient associés à un mauvais pronostic aux stades précoces du CRC (295). La mauvaise valeur pronostique des TAN aux stades précoces de la tumorigenèse a également été observée dans le mélanome (305) et le carcinome épidermoïde du col de l'utérus (306). Dans les tumeurs de stade avancé, en particulier dans le CRC et le carcinome épidermoïde de la tête et du cou, l'impact pronostic des TAN est généralement défavorable (295, 296). À notre connaissance, aucune étude n'a fait état d'un bon pronostic des TAN dans les tumeurs de stade tardif.

Tableau 2. Impacts pronostiques des TAN dans les tumeurs précoces et tardives.

Prognostic impact of tumor-associated neutrophils at early and late-stage of tumorigenesis						
Tumor stage	Cancer Type	<i>In situ</i> localization of neutrophils	Neutrophil markers	Prognostic impact	OS / DFS / CSS	References
Stage I-II	CRC	Tumor front	CD66b	Improved	CSS	Wikberg ML et al. 2017 ⁽¹¹⁷⁾
	SKCM	Intratumoral	CD66b	Worsened	OS / DFS / CSS	Jensen TO et al. 2012 ⁽¹¹⁹⁾
	Cervical SCC	Peritumoral	CD66b	Worsened	DFS	Carus A et al. 2013 ⁽¹²⁰⁾
Stage II	CRC	Intratumoral	H&E (morphology) and Arginase	Improved	OS	Berry RS et al. 2017 ⁽¹¹⁸⁾
		Intratumoral	CD66b	Worsened	OS	Rao H-L et al. 2012 ⁽⁶³⁾
Stage III	CRC	Intratumoral	CD66b	Worsened	OS	Rao H-L et al. 2012 ⁽⁶³⁾
Stage III-IV	HNSCC	Intratumoral	CD66b	Worsened	OS	Trellakis S et al. 2010 ⁽⁶⁴⁾

2.1.4 Outils permettant de quantifier l'abondance en TAN à partir de données transcriptomiques de masses tumorales

Plusieurs bases de données publiques comme TCGA permettent un accès gratuit à des données **RNAseq** de plusieurs centaines de tumeurs pour pratiquement tous les types de cancers (307). Nous reviendrons dans cette partie sur les différentes méthodes permettant de quantifier la densité de TAN à partir de données transcriptomiques de masses tumorales. Grâce aux données cliniques des patients (temps de survie globale/survie sans rechute) associées à chaque tumeur, il est désormais possible d'évaluer l'impact pronostique des tumeurs avec un infiltrat dense en neutrophiles.

2.1.4.1 MCP counter

Quantifier l'infiltrat global en TAN signifie quantifier la totalité des TAN présent dans la tumeur. Pour réaliser cela, il est nécessaire déterminer une signature génique discriminante des neutrophiles par rapport aux autres populations immunitaires, comme les lymphocytes T, les lymphocytes B, les cellules NK, les monocytes/macrophages. Les gènes les plus différenciellement exprimés (**DEG** en anglais pour « differentially-expressed genes ») par les neutrophiles par rapport aux autres populations immunitaires constituent donc les gènes spécifiques de la signature neutrophiles (308, 309). On distingue aujourd'hui 2 signatures spécifiques des neutrophiles couramment utilisées : une signature à 15 gènes (310) et une autre à 31 gènes (304, 309). Certains outils, comme « **MCP counter** » sont adaptés pour travailler avec des signatures **hautement spécifiques** des neutrophiles par rapport aux autres cellules immunitaires, mais il faut aussi que les gènes de la signature soient **fortement exprimés** par les neutrophiles (310) (**Tableau 3**). De plus il faut que les gènes ne soient pas, ou peu exprimés par les autres types cellulaires composant le microenvironnement tumoral (cellules tumorales, fibroblastes, cellules endothéliales, etc..) (**Tableau 3**). MCP counter va calculer la **moyenne d'expression** de l'ensemble des gènes qui composent la signature spécifique des neutrophiles (**Tableau 3**). Le score de quantification de la signature calculée par MCP counter est exprimé en **log₂ de la moyenne géométrique**.

Une autre signature spécifique des neutrophiles a récemment vu le jour. Contrairement aux 2 autres signatures qui ont été générées à partir du transcriptome de cellules immunitaires issues du sang, cette nouvelle signature a, elle, été créée à partir de **données transcriptomiques de bulk tumoral** (311). Brièvement, les auteurs ont mis en évidence des groupes de gènes qui corrélaient très bien entre eux dans les données transcriptomiques de bulk tumoral, et ce dans plusieurs types différents de tumeurs solides. Ils ont pu associer à certains de ces groupes de gènes une **identité** (le nom d'un type

cellulaire) basée à la fois sur la connaissance mais aussi par une approche d'enrichissement en GO (« Gene Ontology ») term, permettant d'identifier les processus biologiques les plus représentés à partir d'une liste de gènes. Ainsi, les auteurs ont pu identifier un groupe de gènes associés à des neutrophiles. Cette première liste de gènes a été validée dans d'autres jeux de données indépendants afin de ne retenir que les gènes les plus corrélés entre eux dans l'ensemble des cohortes de validation. Pour estimer l'abondance de cette nouvelle signature de neutrophiles, les auteurs ont simplement calculé la **moyenne d'expression** de l'ensemble des gènes qui la composent. Il n'est pas encore clairement établi que cette nouvelle signature soit plus performante que les 2 précédentes. Les auteurs suggèrent que cette nouvelle signature représenterait plutôt le transcriptome des neutrophiles en contexte tumoral et par conséquent serait plus juste pour quantifier les TAN.

Ces méthodes de quantification basées sur l'expression moyenne des gènes n'ont pas encore été utilisées pour évaluer l'abondance de l'infiltrat d'une **sous-population** de neutrophiles. Avant d'utiliser MCP counter pour quantifier l'infiltration d'une sous-population immunitaire d'intérêt, il faudra s'assurer que les gènes soient **spécifiques** (par rapport aux autres cellules immunitaires et cellules qui composent le microenvironnement tumoral) et **fortement exprimés**. Si ce n'est pas le cas, d'autres méthodes de quantification (décrites juste après) semblent être moins sensibles à ces limites.

2.1.4.2 ssGSEA

Il se peut dans certains cas que les gènes discriminants d'une sous-population de neutrophiles soient moins spécifiques et moins fortement exprimés par rapport aux autres types cellulaires du microenvironnement tumoral. Dans ce cas, les méthodes d'enrichissement de signature peuvent être plus adaptées. Le **ssGSEA** (pour « single sample Gene Set Enrichment Analysis » en anglais) est une méthode de quantification d'une signature donnée en mesurant son enrichissement dans chaque échantillon (**Tableau 3**). L'enrichissement se mesure par la position (classement ou rang) des gènes d'une signature par rapport aux autres gènes, basée sur leur valeur d'expression. Les signatures peuvent comporter des gènes surexprimés et sous-exprimés par rapport à une population de référence. Plus les gènes surexprimés et sous-exprimés sont regroupés ensemble, plus le score sera élevé. C. Engblom et *al.* ont récemment identifié une sous-population de neutrophiles chez la souris exprimant le marqueur siglecF (neutrophiles SiglecF⁺) (23). Pour déterminer la présence et quantifier cette nouvelle sous-population dans des données transcriptomiques de bulk tumoral chez l'Homme, les auteurs ont sélectionné les 302 gènes (comportant des gènes surexprimés et d'autres sous-exprimés) orthologues humains caractéristiques des neutrophiles murins SiglecF⁺ par rapport aux autres neutrophiles

(siglecF⁻). Par une analyse ssGSEA, les auteurs ont ainsi pu classer les tumeurs en deux groupes : fortement et faiblement enrichies pour la signature neutrophile siglecF⁺. Le ssGSEA est également bien adapté à la quantification des populations immunitaires principales, y compris les neutrophiles dans leur totalité (312). D'autres méthodes d'enrichissement sur la base du ssGSEA ont récemment été optimisées comme **xCell**. Néanmoins, xCell fonctionne avec des signatures immunitaires (incluant celle des neutrophiles) déjà prédéfinies par les auteurs, écartant ainsi la possibilité de pouvoir quantifier l'enrichissement d'une signature spécifique d'une sous-population de neutrophiles.

2.1.4.3 CIBERSORT

Une autre méthode a également fait ses preuves, la **déconvolution**. Plusieurs outils de déconvolution ont vu le jour avec chacun sa spécificité (313). A ce jour, les plus connus sont CIBERSORT et quanTISeq (313). CIBERSORT reste néanmoins le plus utilisé (314). CIBERSORT détermine la **proportion** de l'ensemble des populations immunitaires qui infiltrent les tumeurs à partir de **données transcriptomiques de bulk tumoral (Tableau 3)**. Pour pouvoir fonctionner, CIBERSORT a besoin d'une **matrice d'expression de l'ensemble des populations immunitaires**. Ces signatures sont regroupées en une seule matrice appelée « **matrice de signatures** » (**Tableau 3**). Cette matrice (appelée « **LM22** ») reprend les **547 gènes** (en ligne) qui discriminent **22 populations immunitaires** entre elles (en colonne). Les gènes confondants avec les cellules non-immunitaires (comme les fibroblastes ou les cellules tumorales par exemple) ont été exclus de la matrice. Pour se faire, les auteurs ont utilisés 2 bases de données publiques : celle du Broad Institute pour les lignées de cellules tumorales (Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE)) et le profiler d'expression de gènes notamment pour les cellules primaires (fibroblastes, cellules endothéliales) (<http://xavierlab2.mgh.harvard.edu/EnrichmentProfiler/primary/Tissues.html>). N'ont été retenus que les gènes dont l'expression était au-dessus d'une valeur seuil pour toutes les cellules non-immunitaires disponibles. A l'inverse de l'approche MCP-Counter, les gènes ne doivent **pas nécessairement être exclusifs** pour chaque population immunitaire. Certains gènes de la matrice sont en effet communs à plusieurs types cellulaires différents. A partir de cette matrice d'expression, l'outil CIBERSORT permet de déterminer le pourcentage de chaque population immunitaire (sur un total de 100% représentant l'intégralité des cellules immunitaires) pour chaque tumeur. Néanmoins, CIBERSORT ne semble pas être optimale pour quantifier l'abondance de certaines populations immunitaires comme les lymphocytes T $\gamma\delta$. A partir de données transcriptomiques de lymphocytes T $\gamma\delta$ purifiés, M. Tosolini et al. ont montré que CIBERSORT ne détectait que 30% de lymphocytes T $\gamma\delta$ alors qu'il aurait dû en théorie détecter 100% lymphocytes T $\gamma\delta$ (315). De plus, ils ont détecté pratiquement le même pourcentage de lymphocytes T (environ 30%) et de cellules NK (environ 20%), qui,

pour rappel, sont des cellules qui sont ontologiquement très proches des lymphocytes T $\gamma\delta$. Les auteurs ont ainsi pu mettre en évidence un problème de **multicolinéarité** (incapacité à distinguer des entités relativement similaires), qui se produit lorsque les transcriptomes de cellules ontologiquement proches sont très peu différents. Les auteurs ont suggéré que ce phénomène pouvait être amplifié lorsque le nombre de populations immunitaires présentes dans la « matrice de signature » est trop important. Les 22 populations immunitaires de la LM22 semblent déjà être suffisantes pour favoriser ce phénomène de multicolinéarité (315). M. Tosolini et *al.* ont cherché à diminuer ce phénomène en réduisant le nombre de populations immunitaires de 22 à **7** par regroupement des populations ontologiquement proches. Une nouvelle matrice de signatures (appelée « **LM7** ») a dû être générée comprenant 375 gènes et permettant de distinguer 7 types cellulaires immunitaires (incluant les neutrophiles). Avec la matrice LM7, CIBERSORT était alors capable de déterminer une plus grande proportion de lymphocytes T $\gamma\delta$. M. Tosolini et *al.* ont également tenté de savoir si LM7 pouvait améliorer la précision de quantification de CIBERSORT pour d'autres types de cellules immunitaires comme les neutrophiles (315). A partir de données transcriptomiques de neutrophiles purifiés, les auteurs n'ont pas observé de différence majeure entre LM7 et LM22. Néanmoins avec LM22, l'estimation de la proportion des neutrophiles sur des données transcriptomiques de neutrophiles purifiés est déjà relativement haute (autour de 90%) (315). Cela sous-entend qu'aucune autre population immunitaire ne semble être confondante avec les neutrophiles. Malgré le phénomène de multicolinéarité auquel CIBERSORT peut être confronté, on ne sait pas aujourd'hui si CIBERSORT peut distinguer des sous-populations de neutrophiles entre elles. Pour tester cela dans de futures études, il faudra être en capacité de créer une nouvelle matrice de signatures comprenant plusieurs sous-populations distinctes de neutrophiles précédemment identifiés sur des données de scRNAseq. Une nouvelle version de CIBERSORT, appelé « **CIBERSORTx** » a récemment fait son apparition (316). Cette nouvelle version permet de générer facilement sa propre matrice de signatures à partir de sous-populations identifiées sur des données de scRNAseq.

Ce n'est que très récemment, qu'une étude a montré l'importance de prendre également en considération la **quantité d'ARN** des cellules immunitaires dans la création de la matrice des signatures utilisée par des outils de déconvolution comme CIBERSORT. Les auteurs ont pu montrer que la quantité d'ARN par cellule était extrêmement variable entre les différentes sous-populations de cellules immunitaires (317). Les neutrophiles sont les cellules immunitaires qui ont la plus faible quantité d'ARN par cellule, presque 10 fois inférieure à celle des monocytes (317). Cela veut dire qu'à quantité de transcripts égale, on a en réalité 10 fois plus de neutrophiles que de monocytes. Cette observation remet ainsi fortement en question les matrices de signatures utilisées par CIBERSORT. Les auteurs sont allés plus loin en montrant qu'avec une **matrice de signatures normalisée par la**

quantité d'ARN par cellule (matrice appelée « **ABIS** ») pour chaque type cellulaire, la précision d'estimation de la proportion des différentes populations immunitaires est largement supérieure à celle obtenue avec la matrice de signatures LM22, tant sur des données de puces d'expression que de RNAseq (317). La matrice ABIS permet donc de passer des proportions relatives aux **proportions absolues**. Nous entendons par « absolues » (à la différence de relatives) l'estimation d'une proportion plus proche de la réalité avec la nouvelle méthode par rapport à l'ancienne. Cependant, il n'est pas clairement établi que cette nouvelle matrice ABIS donne de meilleurs résultats que la matrice LM22 concernant la quantification des neutrophiles par déconvolution.

Jusqu'à présent, nous avons vu que CIBERSORT était capable d'évaluer les proportions **relatives** et plus récemment **absolues** de chacune des populations immunitaires dans un échantillon donné. Cependant, ces proportions ne reflètent pas l'abondance d'infiltrat dans un tissu. En d'autres termes, un faible pourcentage de neutrophiles dans un tissu ne veut pas nécessairement dire que les neutrophiles sont peu infiltrés dans le tissu, si la quantité de leucocytes totaux (CD45⁺) est grande. L'inverse est également vrai. Par conséquent, la quantification absolue d'une population immunitaire nécessite de connaître la **quantité** totale de leucocytes dans le tissu. Les méthodes de quantification de leucocytes totaux dans les données transcriptomiques de bulk tumoral sont assez récentes. Deux méthodes de quantification de l'infiltrat immunitaire globale ont vu le jour. La première méthode est basée sur la mesure d'un score d'enrichissement d'une **signature des leucocytes totaux**. Cette signature n'est ni plus ni moins que l'ensemble des gènes les plus exprimés dans chacune des populations immunitaires qui compose la matrice de signature (LM22 ou LM7). Similaire au ssGSEA, cette méthode d'enrichissement tient compte de la position des gènes de la signature des leucocytes totaux. Une position élevée (par ordre d'expression) de chacun de ces gènes signifie un fort enrichissement de la signature et donc une grande infiltration en leucocytes totaux. La deuxième méthode est basée sur le calcul d'un score dit « score absolu », qui est une option en cours de développement sur CIBERSORT (<https://cibersort.stanford.edu/>). Celui-ci se calcule en divisant l'expression médiane de l'ensemble des gènes de la matrice de signature (LM22 ou LM7) par l'expression médiane de la totalité des gènes de l'échantillon (318).

Tableau 3. Méthodes de quantification des neutrophiles à partir de données transcriptomiques de bulk tumoral.

	MCP counter	ssGSEA, xCell	CIBERSORT
Caractéristiques de la signature génique	Gènes spécifiques et fortement exprimés	Un grand nombre de gènes dans la signature (au moins 30 gènes dans la signature)	« Matrice de signatures » de gènes spécifiques par rapport aux cellules non-hématopoïétiques mais pas spécifique entre les populations immunitaires Matrice LM22 ou Matrice LM7 Matrice ABIS (matrice normalisée par la quantité d'ARN par type cellulaire)
Méthode de quantification	Moyenne d'expression sur l'ensemble des gènes de la signature	Enrichissement (quantifie la « position » des gènes sur et sous-exprimés de la signature)	↓ Déconvolution ↓
Type de quantification de la signature	Score d'abondance	Score d'abondance	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>Proportion relative</p> <p>↙</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>Proportion absolue</p> <p>↘</p> </div> </div> <p style="text-align: center;">Score d'abondance</p> <p style="text-align: center;">=</p> <p style="text-align: center;">Proportion des neutrophiles x Quantité des leucocytes totaux</p> <p style="text-align: center;"><small>(calcul détaillé dans le paragraphe CIBERSORT 2.1.4.3)</small></p>

2.2 Hétérogénéité des neutrophiles dans le cancer

Dans le contexte du cancer, un nombre croissant d'études soutient l'idée que les neutrophiles sont hétérogènes à la fois sur le plan phénotypique et fonctionnel. Cette diversité des neutrophiles a été décrite à la fois dans le sang et la tumeur de patients cancéreux, mais aussi dans des modèles précliniques murins.

2.2.1 Dans le sang périphérique

Dans le sang périphérique de patients atteints de cancer solides, deux sous-populations de neutrophiles ont été identifiées et caractérisées.

2.2.1.1 Les neutrophiles de faible densité (LDN)

Nous avons précédemment décrit les LDN (voir Chapitre 1) comme étant une sous-population de neutrophiles impliquée dans plusieurs pathologies inflammatoires systémiques comme les maladies auto-immunes (82) et le sepsis (83). Les LDN sont également décrits dans le cancer pour avoir des fonctions pro-tumorales comme la suppression de la

prolifération/activation des lymphocytes T *in vitro*. La fréquence des LDN dans le sang de patients porteurs de tumeurs est connue pour être augmentée de façon significative par rapport aux donneurs sains (22, 95–97, 319). De récentes études ont montré pour la première fois que les patients présentant des taux très élevés de LDN au diagnostic avaient une moins bonne survie globale (95, 96). Parce qu'il n'y a pas d'autres moyens que de faire un gradient de densité de type Ficoll pour identifier les LDN, la recherche de biomarqueurs spécifiques des LDN fait l'objet d'intenses investigations pour ainsi permettre leur identification en sang total. Le **récepteur scavenger LOX-1** a récemment été identifié comme marqueur d'un sous-ensemble de LDN chez des patients atteints de cancer du poumon (NSCLC pour « non-small cell lung cancer ») et tête et cou (HNC pour « head and neck cancer ») (22), alors qu'il n'est pas du tout exprimé par les NDN (**Tableau 4**). LOX-1 semble cependant ne pas être responsable des effets immunosuppresseurs des LDN puisque le blocage de OLR1 par des anticorps bloquants ne restaure ni la prolifération ni l'activation des lymphocytes T (22). De nouvelles évidences chez des patients NSCLC (22, 94, 96) et HNC (22, 95) montrent que les LDN comprennent des neutrophiles matures et immatures. Les **LDN matures CD16⁺ CD11b⁺** seraient plus immunosuppresseurs que les **LDN immatures CD16⁻ CD11b^{+/-}** (95).

2.2.1.2 Les neutrophiles immatures

Chez la souris, les neutrophiles sont identifiés comme les cellules exprimant fortement le marqueur Ly6G (Ly6G^{hi}) et de façon intermédiaire le marqueur Ly6C (Ly6C^{int}) partagé avec les monocytes. Bien que les neutrophiles matures restent la sous-population de neutrophiles la plus représentée (entre 60 et 100% des neutrophiles) (44, 95) dans le sang d'individus porteurs de tumeurs, les neutrophiles immatures augmentent au cours de la progression tumorale (15, 268). On décrit une population de neutrophiles immatures exprimant le marqueur de cellule souche **cKit** (CD117) qui augmente au cours de la progression tumorale dans le modèle murin de cancer du sein métastatique KEP (déficiência génétique conditionnelle du gène p53 et CDH1 dans les cellules exprimant la kératine-14, résumé par l'abréviation suivante : K14-Cre ; Cdh1^{F/F} ; Trp53^{F/F}) (15, 268) (**Tableau 4**). Chez l'Homme, les patients diagnostiqués pour un mélanome présentent une fréquence plus élevée de progéniteurs de neutrophiles **Lin⁻ CD66b⁺ CD15⁺ CD117⁺** (« hNeP ») a été observée dans le sang périphérique (44) par rapport à des donneurs sains (**Tableau 4**). Les hNeP ne sont pas les seuls types de neutrophiles immatures présents dans le sang des patients. D'autres types de neutrophiles immatures **CD10⁻** ont également été identifiés chez des patients porteurs de tumeurs (85) (**Tableau 4**). La présence d'une plus grande proportion de neutrophiles immatures semble attester d'une granulopoïèse plus active. Cette granulopoïèse réactive induite par la croissance tumorale favoriserait le relargage prématuré

de neutrophiles n'ayant pas terminé leur différenciation dans la moelle osseuse, comme il l'a été démontré chez la souris (268). Cependant aujourd'hui, il n'est toujours pas clairement établi que ces neutrophiles immatures contribuent directement à la progression tumorale.

2.2.2 Dans la tumeur

Grâce à la découverte de marqueurs de surface distinguant différentes sous-populations de neutrophiles dans le sang, il est désormais possible d'identifier la présence de ces sous-populations dans la tumeur.

2.2.2.1 Les neutrophiles LOX-1


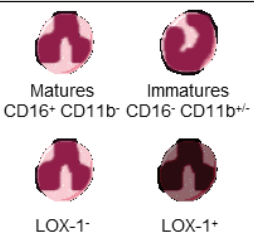
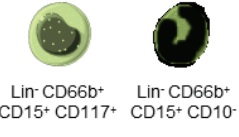

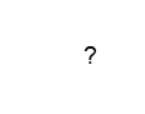







LOX-1 a précédemment été montré pour être exprimé par une sous-population de LDN immunosuppresseurs isolée à partir du sang de patients HNC et NSCLC (22). Une récente étude a montré pour la première fois qu'une fraction des TAN était positive pour le marqueur LOX-1, notamment dans les tumeurs de patients HNC et NSCLC (**Tableau 4**). Les auteurs ont pu montrer que les neutrophiles LOX-1⁺ étaient à proximité des lymphocytes T intra-tumoraux par une technique d'immunofluorescence multidimensionnelle (267). Par comparaison avec des lymphocytes T à distance des TAN LOX-1⁺, ceux qui en étaient proches avaient une réduction significative de l'expression de molécules effectrices impliquées dans leur fonction anti-tumorale, comme Granzyme B. Une diminution du marqueur de prolifération Ki67 des lymphocytes T à proximité des TAN LOX-1⁺ a également été observée, suggérant donc que les neutrophiles LOX-1⁺ dans le microenvironnement tumoral conserveraient leur fonction inhibitrice sur la prolifération cellulaire T. Les auteurs ont montré que la forte abondance de TAN LOX-1⁺ en contact avec les lymphocytes T intra-tumoraux était associée à une moins bonne survie des patients atteints d'un carcinome épidermoïde du poumon (LUSC pour « lung squamous cell carcinoma »).

2.2.2.2 Neutrophiles immatures/matures

Chez la souris, même si la majorité des TAN sont des neutrophiles matures (15, 320), la fraction de neutrophiles immatures est non-négligeable et varie selon les modèles de tumeurs. Dans un modèle de tumeur mammaire spontanée métastatique KEP, la proportion de **TAN immatures (Ly6G^{high} Ly6C^{int} cKit⁺)** se situe autour de 40% (**Tableau 4**). Dans un modèle de tumeur du pancréas transplantée (dérivée des souris KPC), la fraction de **TAN immatures (Ly6G^{high} Ly6C^{int} CD101⁻)** est plutôt de l'ordre de 15% (**Tableau 4**). Chez l'Homme, une récente étude a montré que la quasi-totalité des TAN sont **matures (CD66b⁺)**

CD10⁺ CD11b⁺ CD16⁺) dans les tumeurs HNC (267) et NSCLC (11) (**Tableau 4**). Cette différence de proportion de TAN immatures entre l'Homme et la souris est à prendre en considération, notamment dans la mise en place de nouveaux modèles murins précliniques visant à reproduire les mêmes caractéristiques d'infiltrat immunitaire observées dans les tumeurs humaines.

Tableau 4. Les sous-populations de neutrophiles dans le sang et la tumeur chez les patients et les souris porteuses de tumeurs.

	Sang		Tumeur		
	LDN	Neutrophiles immatures	LOX-1	Neutrophiles immatures	Neutrophiles matures
 Marqueurs de surface membranaire	 Matures CD16 ⁺ CD11b ⁺ CD16 ⁻ CD11b ⁺⁺ LOX-1 ⁻ LOX-1 ⁺	 Lin ⁻ CD66b ⁺ CD15 ⁺ CD117 ⁺ Lin ⁻ CD66b ⁺ CD15 ⁺ CD10 ⁻	 LOX-1 ⁺	 ?	 CD66b ⁺ CD10 ⁺ CD11b ⁺ CD16 ⁺
	 Ly6G ^{high} Ly6C ^{int} LDN	 Ly6G ^{high} Ly6C ^{int} cKit ⁺	 ?	 Ly6G ^{high} Ly6C ^{int} cKit ⁺ Ly6G ^{high} Ly6C ^{int} CD101 ⁻	 Ly6G ^{high} Ly6C ^{int} CD101 ⁺
Type de cancer	<u>Homme</u> : Cancer du poumon et tête et cou. <u>Souris</u> : Tumeurs transplantées.	<u>Homme</u> : Mélanome, cancer du colon, vésicule biliaire, tête et cou et foie. <u>Souris</u> : Tumeurs transplantées.	<u>Homme</u> : Cancer du poumon et tête et cou	<u>Souris</u> : Tumeurs transplantées.	<u>Homme</u> : Cancer du poumon et tête et cou
Fonctions	Immuno-suppression	?	Immuno-suppression	?	?

2.3 Mécanismes pro-tumoraux des neutrophiles dans les tumeurs avancées

Les rôles pro-tumoraux des TAN ont surtout été mis en évidence dans des modèles murins de cancer du sein métastatique. En effet, plusieurs études ont montré que l'élimination sélective des neutrophiles au moyen d'anticorps anti-Ly6G réduisait de façon significative le nombre de métastases pulmonaires (15, 321, 322). Quatre grands mécanismes pro-tumoraux des neutrophiles sont décrits : (i) la promotion de la prolifération des cellules tumorales, (ii) l'inhibition des effecteurs de l'immunité anti-tumorale, (iii) la promotion du processus de dissémination des cellules métastatiques et (iv) la promotion de l'angiogenèse.

2.3.1 Promotion de la prolifération des cellules tumorales

Plusieurs études chez l'Homme et chez la souris, ont montré que les TAN avaient la capacité de favoriser la progression tumorale en favorisant la prolifération des cellules tumorales (**Figure 11**). Dans un modèle murin de tumeur spontanée de la prostate (induite par une déficience pour le gène suppresseur de tumeur PTEN spécifiquement dans les cellules prostatiques), les cellules myéloïdes Gr1⁺ sécrètent un antagoniste (IL-1RA) du récepteur de l'interleukine-1 (IL-1R) (323). Cet antagoniste semble entrer en compétition avec les agonistes de l'IL-1R (comme l'interleukine 1 ou IL-1) qui, eux, induisent la sénescence cellulaire pour ralentir la prolifération cellulaire et donc la croissance tumorale (323). Par conséquent, les antagonistes de l'IL-1R semblent s'opposer à la sénescence cellulaire anti-tumorale, favorisant donc la prolifération cellulaire et donc la croissance de la tumeur, en tout cas dans un modèle murin du cancer de la prostate. Il a également été signalé que les leucotriènes dérivés de neutrophiles favorisent de façon sélective la survie et la prolifération d'une sous-population de cellules tumorales qui conserve un potentiel métastatique élevé (14).

De plus en plus de évidences montrent que la production par les neutrophiles **des protéines associées** aux **NET** favorise la prolifération des cellules tumorales. On rapporte que la Neutrophil Elastase (**NE**), une protéase sécrétée lors de la NETose des neutrophiles, accède au compartiment endosomal des cellules tumorales dans un modèle d'adénocarcinome pulmonaire chez l'Homme et la souris. Elle dégrade le substrat du récepteur à l'insuline IRS-1, ce qui augmente l'interaction entre la PI3K et le PDGFR (Platelet-derived growth factor receptor) et favorise ainsi la prolifération cellulaire (324). La sécrétion de l'alarmine **HMGB1** lors de la NETose active les voies de signalisation TLR9 dans les cellules cancéreuses pour favoriser leur prolifération (325).

2.3.2 Inhibition des effecteurs de l'immunité anti-tumorale

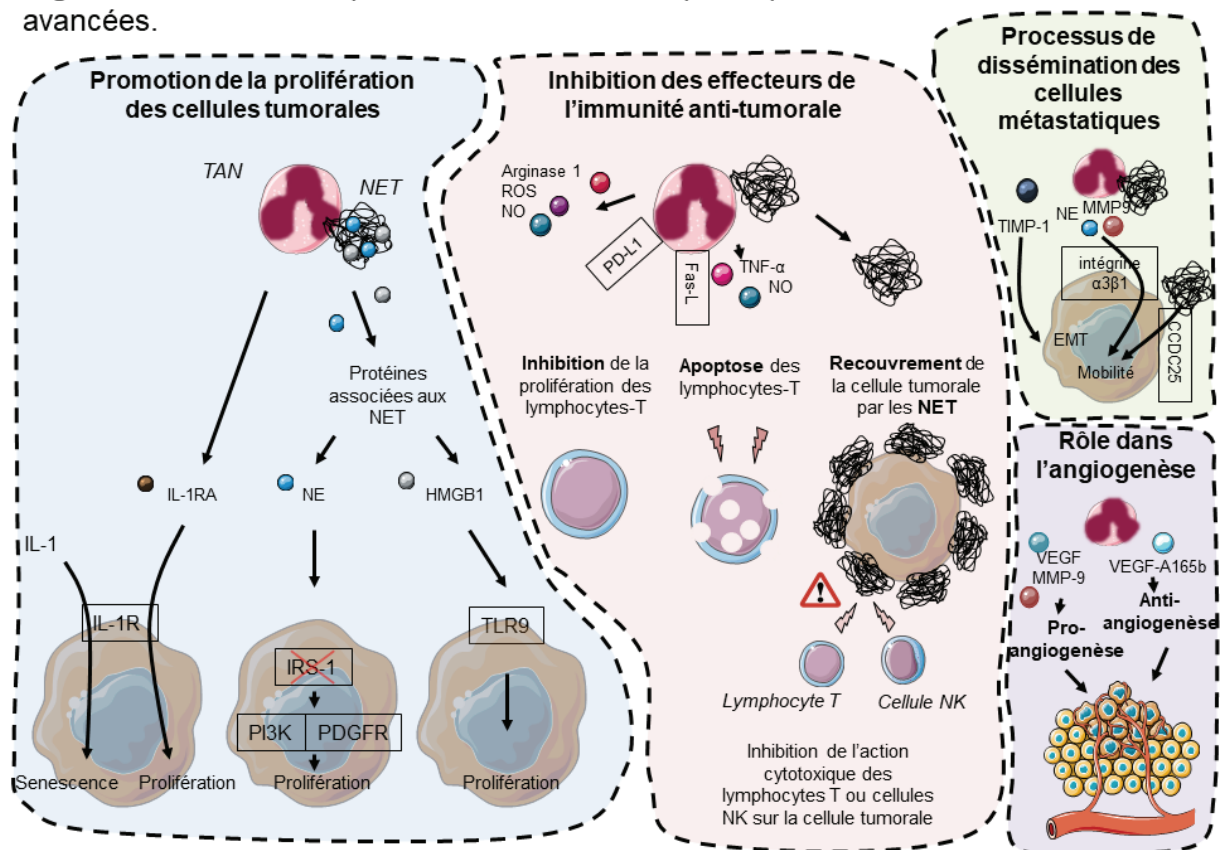
Les TAN peuvent également favoriser la progression tumorale en inhibant l'action/l'activité anti-tumorale des effecteurs de l'immunité (**Figure 11**). Chez la souris, suivant le type de modèle, on décrit différents facteurs solubles dérivés des TAN comme les **ROS** (9) ou l'oxyde nitrique (**NO**) produit par l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) (15), qui **inhibent la prolifération** des lymphocytes T CD8 cytotoxiques ainsi que leur production d'IFN γ . L'arginase 1, enzyme soluble dérivée des cellules myéloïdes infiltrant les tumeurs, a également été proposée comme médiateur de l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T (326). Plus récemment, chez l'Homme, l'expression de **PD-L1** à la surface des neutrophiles semble également être impliquée dans l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T (11). D'autres facteurs semblent également induire l'**apoptose** des lymphocytes T, comme les facteurs solubles **TNF- α** et **NO** sécrétés par les TAN (327) (327).

Dans un modèle préclinique de mélanome résistant aux immunothérapies (328), l'acquisition de l'expression du ligand de Fas (**Fas-L**) à la surface des TAN est suffisante pour induire l'apoptose des lymphocytes T dans les tumeurs (328).

L'effet immunosuppresseur des TAN passe principalement par leur action inhibitrice sur les lymphocytes T cytotoxiques. De nouvelles évidences chez la souris montrent que les TAN pro-tumoraux peuvent également inhiber la cytotoxicité des cellules NK (321, 329). Les TAN peuvent en effet induire directement l'apoptose de cellules NK *via* la voie de signalisation Fas (329).

De nouvelles évidences montrent que les TAN peuvent inhiber le système immunitaire anti-tumoral indirectement en empêchant la reconnaissance des cellules tumorales par les lymphocytes T et cellules NK cytotoxiques. La stimulation des TAN par des agonistes des récepteurs CXCR1 et CXCR2 est suffisante pour induire la production de NET, qui vont ensuite recouvrir la surface des cellules tumorales empêchant ainsi leur reconnaissance et destruction par les lymphocytes T CD8 et cellules NK cytotoxiques (126).

Figure 11. Mécanismes pro-tumoraux des neutrophiles présents dans les tumeurs avancées.



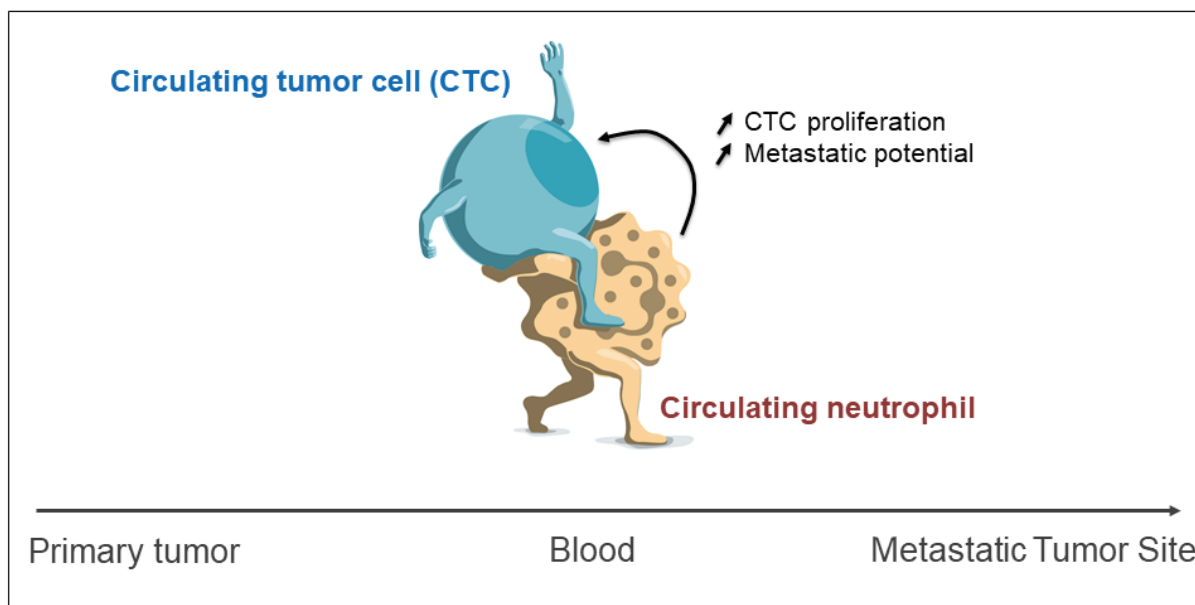
2.3.3 Processus de dissémination des cellules métastatiques

Pour se disséminer, la cellule pré-métastatique doit se « détacher » de la tumeur primaire. Ce processus est facilité par la transition épithélio-mésenchymateuse (**EMT** en anglais) combinée à la dégradation de la matrice extracellulaire (330). Des évidences récentes montrent que les neutrophiles sont capables d'induire l'EMT des cellules pré-métastatiques en stabilisant l'expression du facteur de transcription « **Snail** » (331) ou *via* la sécrétion de l'inhibiteur tissulaire de la métalloprotéinase matricielle (TIMP-1) (1) (**Figure 11**).

Dans un modèle de métastase pulmonaire chez la souris, il a récemment été rapporté que l'ADN dérivé des NET pourrait servir de molécules régulant finement les activités protéolytiques de la NE et MMP9. Cela a pour conséquence un remodelage de la laminine-111 (protéine de matrice) conduisant à l'activation en aval de la voie de signalisation de l'**intégrine $\alpha3\beta1$** dans les cellules cancéreuses disséminées et dormantes pour enfin les convertir en cellules agressives et métastatiques (322). Une étude très récente a montré que la protéine transmembranaire **CCDC25** exprimée par les cellules tumorales pouvait agir comme un récepteur de l'ADN des NET. L'interaction CCDC25/ADN active la voie de signalisation de la β -parvine liée aux kinases associées aux intégrines (« **ILK- β -parvine** ») (333), ce qui améliore la mobilité des cellules tumorales et par conséquent augmente leur capacité de dissémination.

B. M. Szczerba et *al.* ont récemment montré que les neutrophiles du sang périphérique pouvaient s'associer aux cellules tumorales circulantes (**CTC**) (17) (**Figure 12**). Le neutrophile va non seulement guider la migration de la CTC au site métastatique, mais va également augmenter sa prolifération cellulaire. Cette interaction entre la CTC et le neutrophile va donc contribuer à augmenter l'efficacité de formation de métastases (17). Dans le sang de patientes atteintes de cancer du sein, un niveau élevé « d'agrégats CTC-neutrophiles » est associé à un risque plus élevé de développer des métastases (17). Enfin, la formation de NET (produit par les neutrophiles) dans les vaisseaux sanguins semble favoriser la séquestration des CTC pour leur extravasation au site métastatique (334).

Figure 12. Les neutrophiles escortent les cellules tumorales circulantes dans la circulation sanguine.



2.3.4 Rôle dans l'angiogenèse

Plusieurs évidences ont montré que les neutrophiles pouvaient stimuler l'angiogenèse pour promouvoir la croissance tumorale (**Figure 11**). Il a en effet été démontré que la déplétion spécifique des neutrophiles induisait une réduction significative du nombre de vaisseaux sanguin intra-tumoraux, ainsi qu'une croissance tumorale ralentie (335). Dans un modèle murin de mélanome, et de cancer du foie chez le poisson zèbre, les TAN pro-tumoraux expriment des niveaux élevés de facteurs pro-angiogéniques comme le **VEGF** et **MMP-9** (9, 335–337). Des évidences chez l'Homme ont montré que l'activation des neutrophiles par le fMLF induisait la formation de vaisseaux sanguins *in vitro* de par leur sécrétion de VEGF (338). La production de MMP-9 par les neutrophiles est, elle aussi, suffisante pour induire la formation de tubes angiogéniques à la surface de la membrane chorioallantoïque de l'embryon de poussin (339). Les **NET** sembleraient également être impliqués dans la promotion de l'angiogenèse (340). Dans cette étude, il a été montré que les NET induisant l'activation du facteur nucléaire κB (NF- κB) dans les cellules endothéliales pour induire la formation de tubes angiogéniques *in vitro*. *In vivo* les auteurs ont montré que les NET favorisaient le développement de vaisseaux sanguins dans le matrigel.

En revanche, de nouvelles études ont montré que les TAN pouvaient au contraire réduire l'angiogenèse. Il a en effet été montré que les neutrophiles pouvaient sécréter des facteurs antiangiogéniques comme l'isoforme du VEGF-A, à savoir le VEGF-A165b (341, 342). Cela peut avoir pour conséquence directe une augmentation de l'hypoxie intra-

tumorale qui à son tour stabilise le facteur de transcription « **Snail** » afin d'induire une **EMT** partielle et ainsi favoriser la croissance tumorale (331).

2.4 Mécanismes anti-tumoraux des neutrophiles dans les tumeurs précoces

Des évidences plus récentes montrent que dans certains contextes, les TAN possèdent au contraire des propriétés anti-tumorales *in vivo* au stade précoce de la tumorigenèse. Dans un modèle murin de cancer utérin, on a montré que les neutrophiles sont les cellules les plus abondantes dans les tumeurs précoces (10). En utilisant des souris constitutivement déficientes en neutrophiles (déficience génétique du récepteur au G-CSF), les auteurs ont pu montrer que la croissance tumorale était accélérée, suggérant un rôle important des neutrophiles dans l'immunosurveillance des cellules tumorales au stade précoce de la tumorigenèse. Dans cette partie, nous ferons un point sur les différents mécanismes anti-tumoraux des neutrophiles décrits à ce jour.

2.4.1 Cytotoxicité directe des neutrophiles sur les cellules tumorales

Les TAN sont capables d'induire directement l'apoptose des cellules tumorales en sécrétant des molécules cytotoxiques comme les ROS chez l'Homme et chez la souris (9, 343, 344) (**Figure 13**). Une étude plus récente a montré que les neutrophiles issus du sang de donneurs sains étaient capables d'induire la mort cellulaire de plusieurs lignées de cellules cancéreuses *in vitro* via la production de H₂O₂ (345). Les auteurs ont montré que cette fonction cytotoxique des neutrophiles est spécifique des cellules cancéreuses transformées puisque les neutrophiles n'ont montré aucune action cytotoxique envers les cellules primaires ou lignées immortalisées non-transformées. De plus, aucun apport de molécules exogènes n'est nécessaire pour induire les fonctions cytotoxiques des neutrophiles. Ceci suggère donc que les cellules cancéreuses transformées fournissent des « signaux immunogéniques » suffisants pour activer les fonctions cytotoxiques des neutrophiles. La nature de ces signaux immunogéniques ainsi que leur origine restent à définir dans de futures études.

Une autre famille de molécules cytotoxiques secrétées par les neutrophiles a récemment été mise en évidence dans un modèle de tumeurs pulmonaires induites suite à l'injection de cellules tumorales du poumon en sous-cutanée chez la souris (346). Il s'agit des **espèces réactives de l'azote**, dont fait partie le **monoxyde d'azote** (abrégié « **NO** » en anglais) (**Figure 13**). L'activité anti-tumorale des neutrophiles a été mise en évidence en comparant les propriétés cytotoxiques des neutrophiles génétiquement déficients pour le gène c-MET *versus* les neutrophiles WT (346). Les neutrophiles déficients en c-MET

présentent une plus faible capacité à induire la mort de la lignée tumorale. L'inhibition par la **L-NMMA** (N-Methylarginine) de l'enzyme responsable de la production de NO (synthase de monoxyde d'azote ou « **iNOS** ») réduit considérablement le pouvoir cytotoxique des neutrophiles WT, pratiquement au même niveau que celui des neutrophiles déficients pour c-MET (346). La production de NO par les neutrophiles sous la dépendance de la voie de signalisation c-MET semble donc être importante pour leurs fonctions cytotoxiques directes sur les cellules cancéreuses.

On a également rapporté que les neutrophiles humains stimulés par l'IFN- α ont la capacité de sécréter la forme soluble du ligand inducteur de mort cellulaire « **sTRAIL** » (347) (**Figure 13**). Dans cette même étude, les auteurs ont pu démontrer que sTRAIL dérivé des neutrophiles était suffisant pour induire l'apoptose des cellules leucémiques (347).

Quant aux NET produits par les neutrophiles, ceux-ci sont principalement décrits pour leur capacité à stimuler la prolifération et la mobilité/migration des cellules tumorales pré-métastatiques (322, 333). Quelques études ont tout de même démontré que les NET pouvaient également induire la mort des cellules tumorales (348) (**Figure 13**). Cet impact différentiel des NET sur l'induction de la prolifération ou de la mort des cellules tumorales reste à déterminer.

Une étude récente a révélé pour la première fois que les TAN pouvaient sécréter la molécule cytotoxique granzyme B dans un modèle murin de tumeur du colon après traitement par un analogue du lipide A (la partie lipidique active du LPS) connu pour être un agoniste du TLR4 (349). Il n'est cependant à ce jour pas clairement établi que l'effet thérapeutique de l'analogue du lipide A dépend des neutrophiles *in vivo*.

2.4.2 Détachement des cellules tumorales de la membrane basale

Blaisdell et *al.* ont mis en évidence pour la première fois en 2015 une nouvelle fonction anti-tumorale des neutrophiles (10). Dans un modèle de tumeur utérine chez la souris, les auteurs ont pu montrer que les neutrophiles étaient les principales cellules de l'immunité innée recrutées dans les **tumeurs précoces**. En utilisant des souris génétiquement déficientes en neutrophiles (souris déficientes pour le G-CSF-R), la croissance tumorale des tumeurs utérines était accélérée, démontrant ainsi un rôle anti-tumoral des neutrophiles. La production de **ROS** et de **MMP-9** par les neutrophiles est suffisante pour induire la dégradation de la membrane basale à laquelle sont attachées les cellules tumorales, et ainsi favoriser le **détachement** de celles-ci, permettant de contrôler la croissance tumorale (**Figure 13**). La même équipe a plus récemment montré que la capacité

des neutrophiles à induire cette nouvelle fonction anti-tumorale pouvait être augmentée en limitant l'**hypoxie** des tumeurs. Cela a été rendu possible grâce à un élevage des souris porteuses de tumeurs sous atmosphère enrichie en oxygène (60% au lieu de 21%) (350). Cet effet anti-tumoral des neutrophiles sous hypoxie semble être indépendant des lymphocytes T (350), qui sont la cible principale des immunothérapies actuelles (351). Cela renforce l'idée que de nouveaux effecteurs de l'immunité anti-tumorale peuvent être exploités pour la prochaine génération d'immunothérapie.

2.4.3 Stimulation de l'immunité adaptative anti-tumorale

Suivant le contexte tumoral, les effets anti-tumoraux des TAN peuvent nécessiter une coopération avec les **anticorps** ou bien avec les **lymphocytes T**.

2.4.3.1 Coopération avec les plasmocytes

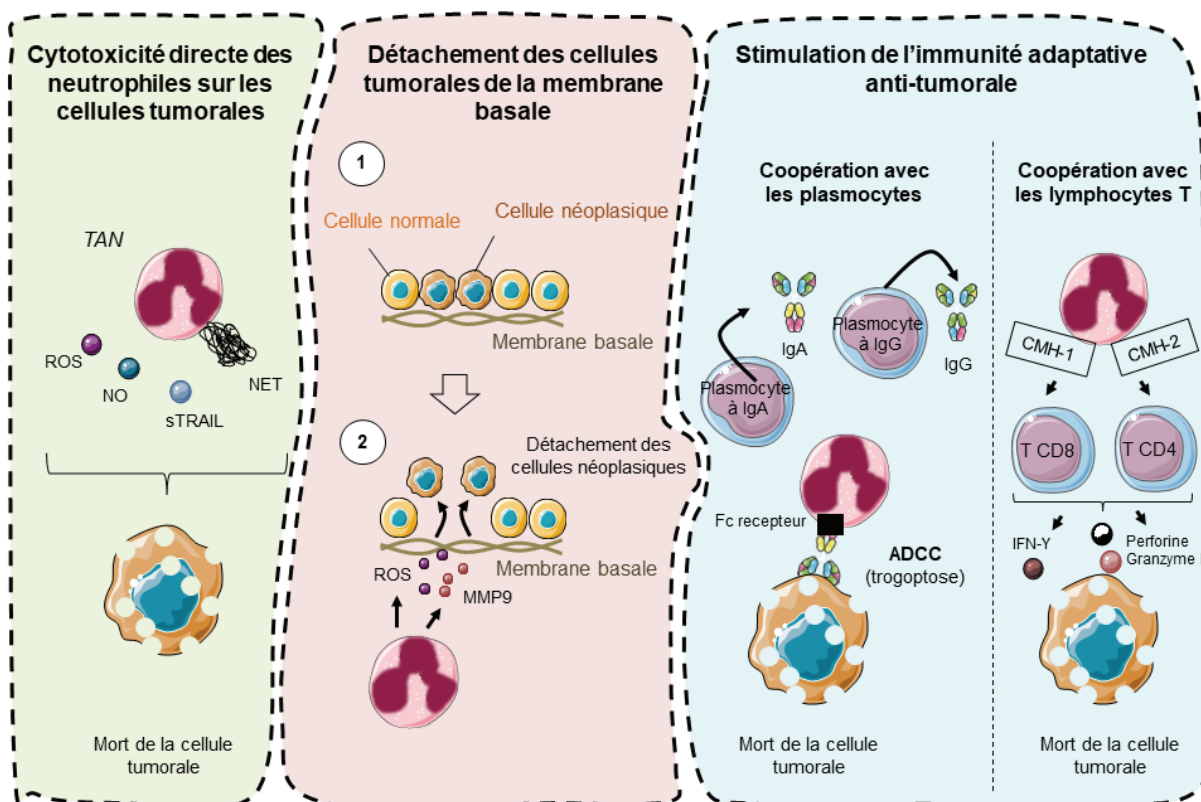
D'autres fonctions anti-tumorales des neutrophiles nécessitent une coopération avec les cellules de l'immunité adaptative C'est notamment le cas de la cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (**ADCC**) (**Figure 13**). Grâce à leurs **récepteurs Fc**, les neutrophiles ont la capacité de fixer la partie constante (fragment Fc) d'anticorps reconnaissant des antigènes exprimés par les cellules tumorales. On distingue plusieurs types de récepteurs Fc propres à chaque type d'isotype de l'immunoglobulines (Ig). Les plus connus sont les récepteurs aux IgG (FcγR) et aux IgA (FcαR). Cette fixation aux récepteurs Fc va conduire à l'activation des neutrophiles se traduisant par la sécrétion de granules cytotoxiques pour ainsi détruire de façon sélective les cellules tumorales au contact des neutrophiles (93, 352–354). Alors que l'ADCC induite par les neutrophiles était principalement décrite *in vitro*, de récentes études montrent qu'elle peut également se produire *in vivo* (140, 355). Un type particulier d'ADCC a récemment été décrit en contexte tumoral *in vitro* and *in vivo* chez la souris ; il s'agit de la **trogoptose** (140). Ce type d'ADCC nécessite la reconnaissance des cellules tumorales par les neutrophiles au moyen d'anticorps pour ensuite y établir une synapse immunologique fortement dépendante des intégrines CD11b/CD18 (MAC-1) exprimées par les neutrophiles. Cela permet ainsi aux neutrophiles d'ingérer une fraction de la membrane plasmique des cellules cancéreuses (phénomène de **trogocytose**). Cela va conduire à une mort de type **lytique/nécrotique** de la cellule tumorale (phénomène de trogoptose). Contrairement aux autres mécanismes cytotoxiques liés à l'ADCC, principalement décrits dans les cellules NK, la trogoptose est indépendante de l'exocytose des granules et de l'action de la NADPH oxydase (140). L'ADCC des cellules tumorales par les neutrophiles impliquent donc une coopération avec les **plasmocytes** sécréteurs d'anticorps. Plusieurs types de plasmocytes existent en fonction du type d'isotype qu'ils

sécrètent. L'ADCC des cellules tumorales par les neutrophiles *in vitro* chez l'Homme semble être plus efficace avec des anticorps d'isotypes IgA que IgG, reconnaissant bien évidemment le même antigène tumoral (352–354).

2.4.3.2 Coopération avec les lymphocytes T

Dans certains contextes, l'action anti-tumorale des neutrophiles nécessite une coopération avec les lymphocytes T (**Figure 13**). Dans des tumeurs pulmonaires humaines de stade précoces (stade I-II), on rapporte que les TAN sont des cellules capables de présenter des antigènes tumoraux aux lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺ *via* le complexe majeur d'histocompatibilité de classe 2 (CMH-2) ou 1 (CMH-1) (11, 356). Cette présentation des antigènes tumoraux aux lymphocytes T par les neutrophiles conduit à la stimulation de la production de molécules cytotoxiques des lymphocytes T comme l'IFN- γ et le Granzyme B (11). La capacité des neutrophiles à stimuler les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques a également été décrite dans des tumeurs colorectales humaines (357). Une étude récente conduite dans un modèle murin de sarcome a montré que les TAN en coopération avec les macrophages étaient essentiels pour l'activation des fonctions anti-tumorales des lymphocytes T $\alpha\beta$ non conventionnels (304).

Figure 13. Mécanismes anti-tumoraux des neutrophiles présents dans les tumeurs précoces.

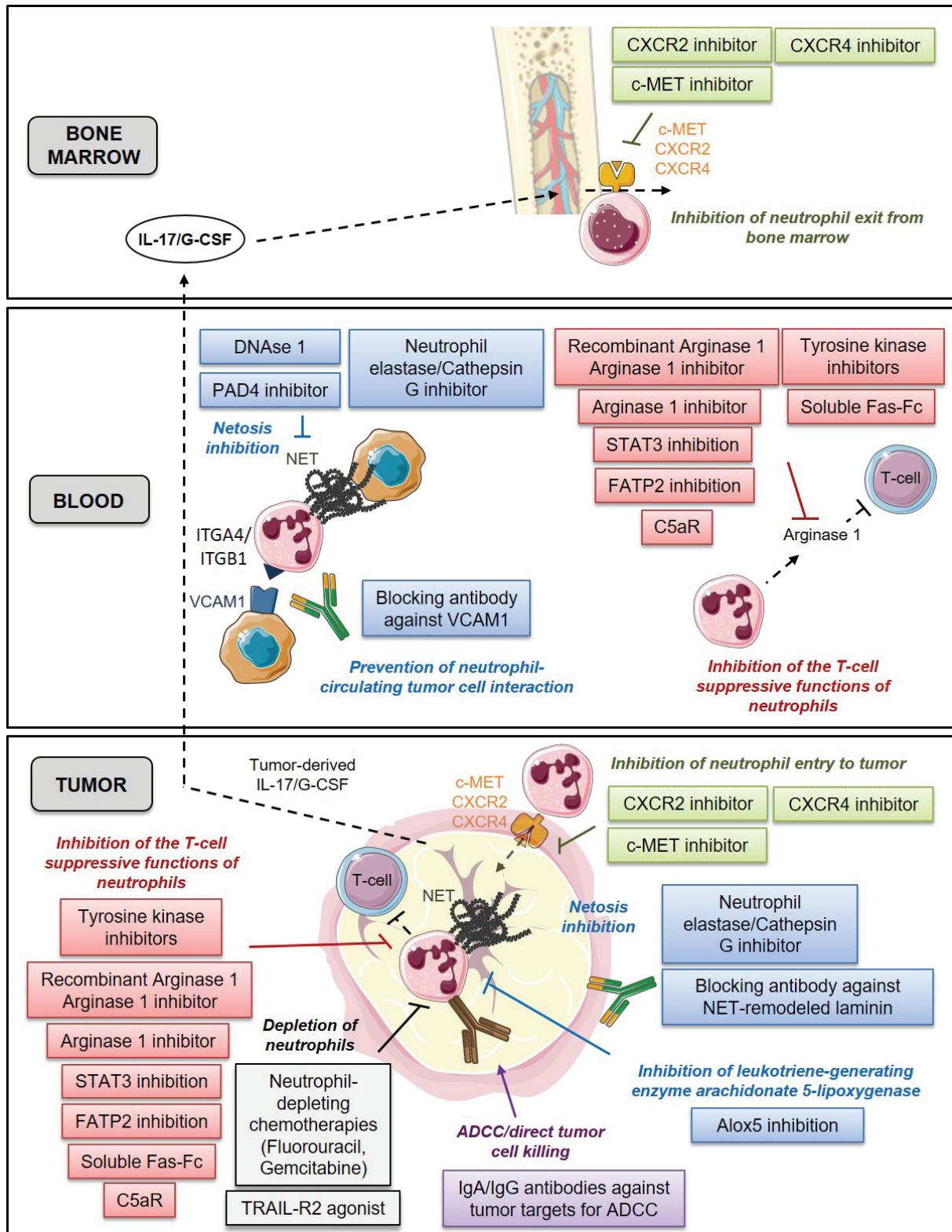


CHAPITRE 3 : Une place pour les neutrophiles dans l'immunothérapie de demain en oncologie

L'immunothérapie a montré des effets sans précédent sur la survie globale des patients atteints de cancer (358). Les immunothérapies actuelles agissent principalement sur les cellules de l'immunité adaptative. Par exemple, les immunothérapies anti-PD1 ou anti-CTLA4 bloquent les points de contrôle du système immunitaire (ICP pour « immune checkpoints ») PD1 ou CTLA4 qui eux-mêmes inhibent l'action des lymphocytes T anti-tumoraux. Cette levée de l'inhibition permet ainsi restaurer les fonctions anti-tumorales des lymphocytes T cytotoxiques.

Le développement d'immunothérapies ciblant l'immunité innée reste encore limité, mais semble regorger de nouvelles opportunités thérapeutiques. Dans ce chapitre, nous aborderons les différentes stratégies thérapeutiques qui impliquent spécifiquement les neutrophiles dans le contexte du cancer (**Figure 14**).

Figure 14. Stratégies thérapeutiques basées sur les neutrophiles



3.1 Inhibition de la sortie des neutrophiles de la moelle osseuse et de l'entrée des neutrophiles au site tumoral

Une façon d'atténuer les fonctions pro-tumorales des neutrophiles consisterait à prévenir leur entrée dans la tumeur ou leur sortie de la moelle osseuse vers le sang périphérique.

3.1.1 Modulation de l'axe G-CSF/IL-17

Un certain nombre d'études chez la souris a suggéré la modulation du niveau de G-CSF pour empêcher l'expansion des neutrophiles pro-tumoraux. Ainsi, l'ablation du G-CSF avec des anticorps anti-G-CSF a montré que celle-ci empêchait l'accumulation de neutrophiles dans le sang (15, 17, 359), tandis que la surexpression du G-CSF induisait l'expansion des neutrophiles circulants et augmentait le développement de métastases (17, 59, 359). Bien que le G-CSF soit utilisé pour stimuler la production de neutrophiles chez les patients qui ont un risque de neutropénie induite par la chimiothérapie (360), on ne sait toujours pas si le G-CSF endogène est suffisant pour expliquer la neutrophilie observée chez les patients cancéreux. Quelques études ont fait état d'un taux sérique de G-CSF plus élevé chez les patients atteints de cancer du pancréas (361), de cancer colorectal (362) et de cancer du poumon non à petites cellules (363), par rapport aux sujets sains. Aucune de ces études n'a montré de corrélation entre une concentration élevée de G-CSF sérique et la neutrophilie. Seules quelques études effectuées chez des patients ont montré un lien entre un taux sérique élevé de G-CSF endogène et une augmentation du nombre de globules blancs constitués principalement de neutrophiles (61–63). Dans l'ensemble, les évidences d'un rôle du G-CSF sérique endogène en tant que cause dominante de la neutrophilie chez les patients cancéreux restent limitées. Il convient de noter que le G-CSF thérapeutique exogène ne semble pas non plus aggraver la survie des patients cancéreux traités par chimiothérapie (364, 365). L'interleukine-17 (IL-17) est récemment apparue comme un régulateur en amont du G-CSF et, par la suite, de la production de neutrophiles *in vivo* (15, 366, 367). Dans un modèle murin de métastase pulmonaire, la neutralisation de l'IL-17 a réduit de manière significative le niveau de G-CSF et a empêché l'expansion systémique des neutrophiles sanguins. Il est intéressant de noter que certaines études ont d'ores et déjà fait part d'une augmentation de l'IL-17 dans le sang de patients atteints d'un cancer du foie (368), ou d'un cancer du poumon non à petites cellules (367, 369, 370). Un taux élevé d'IL-17 sérique a même été associé à un pronostic plus défavorable pour les patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules (369, 370). Néanmoins, la corrélation entre le taux d'IL-17 sérique et la neutrophilie reste à démontrer dans de futures études.

3.1.2. Inhibition de CXCR2/CXCR4

CXCR2 est connu pour être important dans la migration des neutrophiles, en contrôlant leur sortie de la moelle osseuse vers la circulation sanguine et leur recrutement vers les sites d'inflammation (78, 371, 372). Les neutrophiles acquièrent CXCR2 pour sortir de la moelle osseuse (372, 373). Il a précédemment été montré que l'inhibition génétique ou pharmacologique de CXCR2 diminuait la croissance des tumeurs pulmonaires primaires (374, 375) et supprimait les métastases du cancer du pancréas chez les souris (375). Dans les deux études, la déplétion spécifique des neutrophiles Ly6G⁺ récapitule l'effet thérapeutique de l'inhibition de CXCR2. Bien que certaines études montrent que l'inhibition de CXCR2 pourrait empêcher le recrutement de cellules myéloïdes CD11b⁺ Gr1⁺ dans les tumeurs PTEN^{-/-} de la prostate (323), on ne sait toujours pas clairement si l'infiltration des neutrophiles Ly6G⁺ au site de la tumeur est altérée lorsque CXCR2 est inhibé. Comme les effets thérapeutiques de l'inhibition de CXCR2 peuvent également s'expliquer par son action directe sur les cellules tumorales (376–378), des études supplémentaires seront nécessaires pour déterminer la contribution des neutrophiles aux effets thérapeutiques liés à l'inhibition de CXCR2. Cela permettrait de justifier l'utilisation d'un inhibiteur de CXCR2 pour empêcher le recrutement des neutrophiles.

Il a précédemment été démontré que CXCR4 agissait de manière antagoniste avec CXCR2 pour la sortie des neutrophiles de la moelle osseuse (372, 373, 379). Les neutrophiles perdent CXCR4 pour sortir de la moelle osseuse afin d'être libérés dans la circulation (373, 379). A l'inverse, l'acquisition de CXCR4 semble importante pour l'infiltration des neutrophiles dans la tumeur, du moins dans un modèle préclinique de cancer colorectal. Ainsi, le blocage de CXCR4 par l'agent Plerixafor (AMD3100) (approuvé par la FDA pour la mobilisation de cellules souches dans de multiples pathologies (380)) inhibe l'infiltration tumorale des neutrophiles et des monocytes Ly6Clow induite par la thérapie anti-VEGFR2 (381). De plus en plus d'évidences montrent des effets thérapeutiques de l'inhibition de l'axe CXCL12/CXCR4 (382). Cependant à ce jour, on ne sait pas très bien si l'effet anti-tumoral du blocage de CXCR4 repose principalement sur son action sur les neutrophiles.

3.1.3 Inhibition de c-MET

Le capmatinib, un inhibiteur de la protéine tyrosine kinase MET (c-MET), a d'abord été développé pour traiter les patients atteints de cancer présentant des altérations de la voie c-MET dans les cellules cancéreuses en raison de mutations activatrices du gène c-MET, de sa surexpression, de son amplification et même de translocations conduisant à sa fusion avec d'autres gènes pro-oncogéniques (383). Il est intéressant de noter que le capmatinib a potentialisé les effets thérapeutiques des immunothérapies par transfert adoptif de lymphocytes T et par inhibition des points de contrôle du système immunitaire, dans plusieurs modèles murins de cancer en empêchant le recrutement de neutrophiles suppresseurs de lymphocytes T dans les tumeurs et dans les ganglions lymphatiques

drainants (384). Il est important de noter que l'effet thérapeutique de l'inhibition de c-MET a été attribué aux neutrophiles car l'ablation génétique de l'activité de la kinase c-MET spécifiquement dans les neutrophiles reproduit le même effet (384). Dans cette étude, les auteurs ont pu démontrer que les différentes lignées de cellules tumorales utilisées étaient insensibles au capmatinib *in vitro* et *in vivo*, ce qui exclut la contribution de c-MET propre aux cellules tumorales dans l'effet thérapeutique du capmatinib. Une autre étude a montré que la co-inhibition de c-MET à la fois dans les cellules tumorales ainsi que dans les cellules stromales résultait en une plus faible inhibition de la croissance tumorale par rapport à l'inhibition de c-MET spécifiquement dans les cellules tumorales (346). Cela suggère que c-MET dans les cellules stromales leur conférerait des propriétés anti-tumorales. Les auteurs ont réussi à démontrer que c-MET était particulièrement important non seulement pour l'extravasation des neutrophiles du sang au site tumoral, mais aussi pour l'induction de leurs propriétés anti-tumorales. Ces études plaident donc en faveur de l'évaluation de l'impact pronostique de l'expression de c-MET dans les cellules tumorales mais également dans les TAN chez des patients cancéreux traités par le capmatinib.

3.2 Élimination des neutrophiles

3.2.1 Anticorps agonistes de TRAIL-R2

Le récepteur TRAIL-R2 est une protéine transmembranaire appartenant à la famille des récepteurs au TNF. Il a été démontré qu'un anticorps agonistique de TRAIL-R2 induit la mort cellulaire des G-MDSC de souris *in vitro*. Les auteurs ont pu également montrer *in vivo* chez la souris que cet anticorps potentialisait l'effet du blocage du point de contrôle du système immunitaire CTLA-4 (385). L'anticorps agoniste TRAIL-R2 a récemment fait l'objet d'une étude clinique de phase 1 chez des patients présentant différents types de cancers avancés (385). Les patients présentant des niveaux élevés de LDNs dans le sang avant traitement ont vu leur quantité de LDN drastiquement chuter après l'administration de l'anticorps (385). Cette déplétion semble être assez spécifique des LDN puisqu'aucune diminution significative des NDN ni des autres populations myéloïdes et lymphoïdes du sang périphérique n'a été observée au cours du traitement (385). L'anticorps agonistique TRAIL-R2 ne semble pas non plus présenter de toxicité particulière limitant la dose administrée (385). Toutefois, la déplétion des LDN n'aura pas duré plus de 14 jours après le début du traitement pour des raisons physiopathologiques qu'on ignore. En raison du traitement à court terme et du petit nombre de patients dans la cohorte, des études supplémentaires seront nécessaires pour conclure sur la déplétion sélective des LDNs lors du traitement par l'anticorps agoniste TRAIL-R2.

3.2.2 Chimiothérapies

Dans l'ensemble, les études évaluant les effets de déplétion des neutrophiles par certaines chimiothérapies déjà approuvées restent contrastées. Ces divergences sont probablement dues à des différences de doses, de temps d'administration ainsi que des modèles expérimentaux précliniques (386, 387). Les futures investigations devraient donc tenir compte de ces paramètres afin d'identifier dans quels cadres ces thérapies pourraient être les plus bénéfiques sur la déplétion des neutrophiles.

Le **fluorouracile (5FU)**, utilisé dans le traitement de différents types de cancers, présente des effets anti-tumoraux *in vivo* chez la souris (388). Cet effet thérapeutique a été associé à une élimination sélective des cellules myéloïdes suppressives G-MDSC et MDSC monocytaires (M-MDSC) dans la rate et dans la tumeur (388). Aucune autre population immunitaire ne s'est vue éliminée par le traitement, démontrant l'élimination spécifique des G-MDSC et M-MDSC (388). De plus, l'effet anti-tumoral du 5FU ne semble pas être expliqué par l'induction de la mort immunogénique des cellules tumorales stimulant l'immunité anti-tumorale (388).

3.3 Diminution des fonctions pro-tumorales des neutrophiles inhibant la prolifération des lymphocytes T cytotoxiques

3.3.1 Inhibition de l'arginase 1

La L-arginine est un acide aminé important qui sert notamment d'élément de base pour la synthèse des protéines et de précurseur pour de multiples métabolites intracellulaires (389). La L-arginine est connue pour être particulièrement importante pour la prolifération et la survie des cellules T (390). De plus, il a été démontré qu'une augmentation de la L-arginine intracellulaire dans les lymphocytes T favorisait leur différenciation en lymphocytes T-mémoire aux propriétés anti-tumorales accrues chez l'Homme et la souris (391). La L-arginine est principalement catabolisée par l'arginase 1, qui est une enzyme sécrétée par différentes cellules myéloïdes dont les neutrophiles (85, 97, 326, 392). *In vitro*, chez l'Homme, l'arginase 1 est suffisante pour induire la suppression de la prolifération des cellules T par les neutrophiles, puisque que l'ajout d'un inhibiteur de l'arginase 1 est capable de restaurer la prolifération normale des lymphocytes T (85). L'effet thérapeutique de l'inhibiteur de l'arginase 1 (norNOHA) sur la croissance des tumeurs a également été observé dans un modèle préclinique de cancer du poumon chez la souris (326, 391). Cependant, le rôle de l'arginase 1 comme promoteur de tumeurs reste controversé car la L-arginine favorise également la prolifération et la survie des cellules tumorales. *In vitro*, l'arginase 1 humaine recombinante induit l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose des lignées

cellulaires tumorales humaines (393–397). Il a été démontré que l'arginase 1 recombinante, dont la demi-vie a été prolongée par la PEGylation, exerce des effets anti-tumoraux dans des modèles murins de xénogreffes (394, 396, 398, 399). De récentes évidences suggèrent que l'arginase 1 PEGylée humaine (AEB1102) exerce des effets anti-tumoraux additifs sur la croissance tumorale lorsqu'elle est combinée à un anti-PD-1 ou un anti-PD-L1 dans plusieurs modèles murins précliniques du mélanome, du cancer du poumon à petites cellules ainsi que des sarcomes (398, 399). Ces résultats démontrent donc que la perturbation de l'équilibre physiologique de la L-arginine peut soit inhiber soit favoriser la progression tumorale en fonction de la sensibilité des cellules T et des cellules tumorales à la privation d'arginine. L'efficacité thérapeutique synergique de l'arginase 1 recombinante, de l'inhibiteur de l'arginase 1 en combinaison avec diverses chimiothérapies ou du Pembrolizumab (anti-PD-1) est en cours d'essai clinique de phase 1 et 2 dans plusieurs types de cancers solides avancés (NCT03371979 ; NCT02903914 ; NCT03361228 ; NCT03314935).

3.3.2 Inhibition des tyrosines kinases

De récentes évidences ont montré que l'activité tyrosine kinase des neutrophiles était importante pour leur fonction suppressive sur la prolifération des lymphocytes T (76). Une faible dose de **sorafenib**, un inhibiteur multikinase, semble en effet diminuer de façon significative les fonctions immunosuppressives des TANs (76). Le sorafenib montre également un effet synergique avec le blocage de PD-L1 (76). En revanche, le bénéfice thérapeutique du Sorafenib, notamment par son action sur les neutrophiles, reste contrasté. Une étude menée dans un modèle murin du HCC a montré que le sorafenib pouvait favoriser l'expansion des TAN pro-tumoraux (400). Dans cette même étude, les auteurs ont montré, cette fois chez l'Homme, que les TANs étaient plus abondants chez les patients HCC traités en néo-adjuvant par le sorafenib avant la résection du foie, par rapport aux patients HCC non traités (400).

3.3.3 Blocage de C5aR

On a récemment suggéré l'importance du récepteur membranaire C5a (C5aR, CD88) dans l'induction des fonctions immunosuppressives des cellules myéloïdes. Il a été démontré que les cellules cancéreuses du poumon produisaient du C5a pouvant se lier au C5aR exprimé par les cellules myéloïdes, ce qui avait pour conséquence d'augmenter leurs fonctions immunosuppressives (401). De plus, la concentration sérique de C5a était nettement plus élevée chez les patients porteurs de tumeur que celle des donneurs sains (401). Une étude préclinique récente a montré des effets thérapeutiques additifs de l'inhibition pharmacologique du C5a en combinaison avec le blocage de PD-1 déclenchant une réponse anti-tumorale dépendante des cellules T CD8 dans un modèle de cancer du poumon (402). Dans cette dernière étude, l'inhibiteur du C5a appelé NOX-D21 est un

aptamère de forme isomérique L qui se lie étroitement au C5a et inhibe l'interaction avec son récepteur C5aR. Un autre groupe a récemment signalé, dans un modèle préclinique de carcinome épidermoïde, que le ciblage du C5aR1 essentiellement dans les macrophages avec un antagoniste peptidique (PMX-53) améliorait l'efficacité de la chimiothérapie au paclitaxel et était associé à la réponse des lymphocytes T CD8 (403). Un anticorps bloquant l'interaction du C5a à son récepteur C5aR (IPH5401) a récemment été développé et est l'objet d'un essai clinique de phase 1 en combinaison avec le blocage de la PD-L1 pour les patients atteints d'un cancer du poumon (NSCLC) et de la tête et du cou (HCC) (NCT03665129). Des évidences récentes suggèrent que non seulement les macrophages mais aussi les neutrophiles expriment un niveau élevé de C5aR (404). De plus, les auteurs ont montré que IPH5401 inhibait sélectivement l'activation et la migration des neutrophiles sanguins humains induites par le C5a (404), ce qui suggère que les neutrophiles pourraient être la cible thérapeutique de l'anticorps bloquant le C5aR.

3.3.4 Inhibition de STAT3

STAT3 est une protéine associée aux récepteurs à cytokines (405). Lorsque les cytokines comme le G-CSF et l'IL-6 se fixent sur leurs récepteurs, celles-ci induisent la phosphorylation de STAT3 par la Janus Kinase (JAK) (405, 406). STAT3 une fois phosphorylé peut ainsi migrer jusqu'au noyau et agir comme facteur de transcription (405). La voie de signalisation JAK/STAT3 est connue pour son rôle dans les activités pro-tumorales des neutrophiles, telles que la promotion de l'immunosuppression (407–410) ou de l'angiogenèse tumorale (411). Des études récentes suggèrent que l'activation de STAT3 conduit à l'expression de la translocase d'acide gras CD36 qui, à son tour, augmente l'absorption des lipides et le métabolisme oxydatif, et par conséquent la fonction immunosuppressive des cellules myéloïdes (412, 413). Les essais cliniques utilisant des petites molécules inhibant STAT3 ont montré des effets thérapeutiques limités ainsi que des effets secondaires majeurs (414). D'autres approches visant à inhiber la voie de signalisation de STAT3 en utilisant notamment le siRNA de STAT3 sont actuellement évaluées dans le cadre d'essais cliniques (414). Il sera nécessaire dans de future étude d'évaluer l'implication des neutrophiles dans l'effet thérapeutique du blocage de STAT3.

3.3.5 Inhibition des transporteurs lipidiques

Des évidences récentes suggèrent que le métabolisme des lipides serait impliqué dans l'activation pathologique des neutrophiles immunosuppresseurs (413, 415). Chez l'Homme, les TAN et les PMN-MDSC du sang périphérique surexpriment à leur surface plusieurs transporteurs de lipides tels que CD36, MSR1, LDLR ou LOX1, par comparaison avec les neutrophiles de donneurs sains. L'ajout de lipoprotéines de faible densité (LDL en

anglais pour low-density lipoproteins) augmente la capacité des PMN-MDSC à supprimer la prolifération lymphocytes T *in vitro* (413). De plus, les neutrophiles murins génétiquement déficients pour CD36 ont une moindre capacité à supprimer la prolifération des lymphocytes T par rapport aux neutrophiles de souris sauvage (413). Une étude plus récente a montré que la déficience génétique des neutrophiles murins pour le gène SLC27A2 (également connu sous le nom de FATP2 codant pour un transporteur lipidique) réduisait significativement leurs capacités à inhiber la prolifération des lymphocytes T *in vitro*. De plus, en utilisant les souris S100a8-cre, les auteurs ont pu montrer que la déficience génétique de FATP2 spécifiquement dans les neutrophiles *in vivo*, diminuait de manière significative la croissance tumorale, et ce dans différents modèles de tumeurs (415). Il a été observé que l'administration de la petite molécule inhibitrice de FATP2, la lipofermata, était capable de ralentir la croissance tumorale et semblait avoir un effet synergique avec les anticorps anti-CTLA4 ou anti-CSF1R (415). Par ailleurs, il a été constaté que les TANs humains avaient une teneur en lipides intracellulaires plus élevée que les neutrophiles sanguins du même patient (415). De futures investigations sur des échantillons humains seront nécessaires pour évaluer la pertinence clinique du ciblage du FATP2 chez les patients atteints de cancer.

3.3.6 Fas-Fc soluble

Dans un modèle tumoral murin de résistance à différentes immunothérapies, il a été rapporté que les TAN exprimaient le ligand du récepteur de mort Fas (Fas-L) de façon suffisamment forte pour déclencher l'apoptose des lymphocytes T infiltrant la tumeur qui expriment le récepteur Fas (328). Dans cette étude, l'injection *in vivo* de Fas-Fc soluble neutralise le Fas-L exprimé par les neutrophiles, inhibant ainsi leur effet immunosuppresseur et rendant les tumeurs sensibles aux immunothérapies ciblant les lymphocytes T. D'autres études seront nécessaires pour déterminer si les neutrophiles exprimant Fas-L pourraient constituer un nouveau marqueur prédictif de réponse aux immunothérapies dans le traitement des cancers.

3.4 Inhibition des fonctions pro-tumorales des neutrophiles favorisant la prolifération et la migration des cellules cancéreuses

3.4.1 Inhibition de la netose

Pour rappel, la netose correspond au processus de production de NET par les neutrophiles. De plus en plus d'évidences démontrent que ces NET favorisent grandement le processus de métastase (322, 333, 334). Les NET étant principalement constitués d'ADN extracellulaire, il a été proposé comme stratégie thérapeutique d'utiliser de la DNase pour

éliminer les NET (126). L'enzyme peptidylarginine désaminase 4 (PAD4) semble être le principal facteur contrôlant la formation de NET. Plusieurs inhibiteurs de PAD4 ont été développés, cependant leurs utilisations *in vivo* restent très limitées en raison de leurs courtes demi-vies (416). Il en est de même pour les inhibiteurs des protéases associées aux NET, comme la NE et la cathepsine G (416). Récemment, il a été démontré chez la souris que la NE et la métalloprotéinase 9 (MMP9), clivaient séquentiellement la **laminine 111** (322). La forme clivée de la laminine 111 induit la prolifération des cellules cancéreuses dites « dormantes » en activant la signalisation de l'intégrine $\alpha 3\beta 1$. Il a été montré que l'utilisation d'un anticorps dirigé contre la laminine 111 remodelée par les NET empêchait le réveil des cellules cancéreuses dormantes *in vivo* chez la souris (322). Le développement d'anticorps monoclonaux contre la laminine humaine remodelée par les NET permettra de déterminer dans de futures études si de tels mécanismes se produisent chez les patients. Plus récemment, il a été découvert que la protéine transmembranaire **CCDC25** fortement exprimée à la surface des cellules tumorales est un des récepteurs clés de l'ADN des NET (333). L'activation de CCDC25 par les NET stimule la voie de signalisation de la parvin ILK- β augmentant ainsi la motilité des cellules tumorales (333). Un inhibiteur spécifique de CCDC25 pourrait ainsi constituer une nouvelle thérapie permettant d'inhiber les effets délétères de la netose.

3.4.2 Inhibition de l'arachidonate 5-Lipoxygénase (Alox5)

Quelques évidences ont montré que les leucotriènes dérivés de neutrophiles pouvaient favoriser le développement de métastases (14). Les auteurs ont montré que les neutrophiles sélectionnaient un pool de cellules cancéreuses métastatiques dont la survie et la prolifération dépendaient fortement des leucotriènes (14). L'inhibition pharmacologique par le zileuton de l'arachidonate 5-lipoxygénase (Alox5) responsable de la production de leucotriènes a produit la diminution de l'activité pro-métastatique des neutrophiles *in vivo* chez la souris (14).

3.4.3 Blocage de l'interaction entre les neutrophiles et les cellules circulantes tumorales

De plus en plus de évidences montrent que les neutrophiles interagissent avec les cellules tumorales circulantes pour favoriser leur prolifération et leur extravasation vers des sites métastatiques chez l'Homme et chez la souris (17, 334, 417). Les NET et la molécule d'adhésion VCAM1 semblent être importants dans l'interaction entre les neutrophiles et les cellules tumorales circulantes. Le traitement à la DNase 1 ou la déficience génétique des cellules tumorales en VCAM1 est suffisant pour rompre cette interaction et prévenir la formation de métastases *in vitro* et *in vivo* (17, 334, 417).

3.5 Promotion des fonctions anti-tumorales des neutrophiles

Bien que la majorité des études montrent un rôle pro-tumoral des neutrophiles, de récentes évidences démontrent également qu'ils peuvent posséder des fonctions anti-tumorales.

3.5.1 Cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (ADCC)

De plus en plus d'éléments viennent étayer le concept de ciblage des récepteurs Fc sur les neutrophiles dans l'immunothérapie anti-tumorale. Bien qu'ils expriment les récepteurs IgA-Fc (CD89) et les récepteurs IgG-Fc (CD16 ; CD32 ; CD64), il a été montré *in vitro* que les neutrophiles sont plus efficaces dans la médiation de l'ADCC par les anticorps IgA que les anticorps IgG (352–354). Cela semble également être vrai *in vivo* chez la souris. La forme endogène de CD89 étant absente chez la souris, il a fallu par génie génétique insérer le gène CD89 humain dans le génome de la souris. Les souris transgéniques pour CD89 ont une capacité supérieure à induire la mort des cellules tumorales par ADCC via les IgA par rapport aux IgG, de manière dépendante des neutrophiles (418). En raison de sa demi-vie plus courte par rapport aux autres isotypes sériques, l'ingénierie des anticorps IgA pourrait être une option thérapeutique prometteuse pour accroître l'efficacité des immunothérapies reposant sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux pour induire l'ADCC (419).

3.5.2 Stimulation de la production de ROS par les neutrophiles dans les tumeurs précoces

Les formes réactives de l'oxygène (ROS) jouent un double rôle dans le cancer avec des effets pro ou anti-tumoraux suivant le contexte (420). Aux stades précoces de la tumorigenèse, il a été rapporté que la forte production de ROS par les neutrophiles avait des effets anti-tumoraux (10, 350). Potentialiser la production de ROS par les neutrophiles dans les tumeurs précoces apparaît donc comme une stratégie thérapeutique intéressante.

3.5.2.1 Production de ROS par levée de l'hypoxie tumorale

Plus récemment, il a été montré que la réduction de l'hypoxie intra-tumorale *in vivo* était suffisante pour augmenter la sécrétion de ROS par les neutrophiles afin d'éliminer efficacement les cellules tumorales dans un modèle murin du cancer utérin (350). Cette réduction de l'hypoxie intra-tumorale a été effectuée par élevage des souris porteuses de

tumeurs en chambre à hyperoxie (60% d'oxygène). Des agents pharmacologiques anti-hypoxiques ont déjà montré leur efficacité en combinaison avec les immunothérapies anti-cancéreuses (421, 422). Il conviendra d'évaluer dans de futures études si les neutrophiles sont responsables de cet effet anti-tumoral induit par les agents anti-hypoxiques.

3.5.2.2 Augmentation de la production de ROS par l'inhibition de la voie de signalisation du TGF β

Le TGF β est connu pour influencer *in vitro* la polarisation des neutrophiles d'un phénotype anti-tumoral dit « N1 » vers un phénotype plutôt pro-tumoral dit « N2 ». Dans plusieurs modèles murins précliniques de tumeurs transplantées, la déplétion sélective des neutrophiles ralentit la croissance tumorale, suggérant une activité pro-tumorale N2 des neutrophiles dans ces conditions. L'administration d'une petite molécule inhibitrice de l'activité kinase (kinases ALK4/ALK5) du récepteur au TGF β (le SM16), réduit de la même façon la croissance tumorale de façon significative. De façon intéressante, la déplétion sélective des neutrophiles de ces souris porteuses de tumeurs traitées par le SM16 annule son effet thérapeutique. L'activité anti-tumorale des neutrophiles suite au blocage de la voie de signalisation du TGF β , est dépendante des ROS. De nombreuses études précliniques, ont souligné le bénéfice thérapeutique de cibler le TGF β et/ou ses voies de signalisation (423, 424). De récentes évidences montrent que le TGF β atténue fortement la réponse aux immunothérapies bloquant l'axe PD-1/PD-L1, soutenant donc le fort intérêt clinique de cibler le TGF β (425, 426). Le développement de ces thérapies ciblant la signalisation du TGF β peut s'opérer à trois niveaux : le ligand lui-même, l'interaction ligand/récepteur et les kinases du récepteur. La plupart de ces thérapies induisent néanmoins de nombreux effets secondaires (427) et ont donc empêché l'étude de leur efficacité en cancérologie chez l'Homme. Cependant, un nouvel inhibiteur des kinases du récepteur au TGF β (le galunisertib) a récemment été testé en essai clinique de phase 1 et semble être moins toxique que ses prédécesseurs, bien que cela reste à valider (428). Cet essai a relancé l'engouement pour tester l'efficacité du blocage de la signalisation du TGF β chez les patients atteints de cancer. Un essai clinique en cours vise à évaluer la toxicité et l'efficacité de la combinaison du galunisertib avec le nivolumab (anti-PD-1) (NCT02423343) afin de rétablir la réponse immunitaire anti-tumorale (425, 426). Il apparaît alors pertinent de déterminer dans de futures études si le galunisertib est capable de reprogrammer les neutrophiles pro-tumoraux vers un phénotype anti-tumoral, notamment pour les cancers où un fort infiltrat en neutrophiles est associé à un mauvais pronostic (HNC et cancers du poumon) (267). L'anticorps bispécifique anti-PD-L1/anti-TGF β RII receptor (« récepteur au TGF β ») a récemment démontré une faible toxicité lors d'une étude de phase 1 chez des patients atteints du cancer de l'estomac (429). Il pourrait également être utilisé pour favoriser la repolarisation des neutrophiles pro-tumoraux en neutrophiles anti-tumoraux.

Afin d'évaluer la pertinence clinique de l'exploitation des capacités anti-tumorales des neutrophiles producteurs de ROS, plusieurs questions méritent d'être posées. Les TANs sont-ils les principales cellules immunitaires productrices de ROS dans les tumeurs précoces humaines ? La concentration en ROS dans les tumeurs précoces est-elle suffisamment toxique pour les cellules tumorales, ou autres types cellulaires contribuant à la progression tumorale ? Quelle est la spécificité de la cytotoxicité des ROS dérivés des neutrophiles sur les cellules tumorales par rapport aux cellules non-tumorales voisines ? Quel est l'impact pronostique des neutrophiles producteurs de ROS dans les tumeurs précoces de patients ?

3.5.3 Blocage des récepteurs inhibiteurs des neutrophiles

Les neutrophiles expriment à leur surface des récepteurs inhibiteurs permettant de réguler leurs fonctions pour ainsi éviter l'inflammation pathologique et les dommages tissulaires (430). Dans un contexte infectieux, certains pathogènes comme la bactérie à gram positif *Staphylococcus Aureus* (*S. Aureus*), ont su tirer profit de ces récepteurs inhibiteurs pour échapper à l'attaque des neutrophiles (430). Dans le cancer, bien qu'il n'y ait encore que peu d'études à ce jour, il est fort probable que la tumeur puisse, elle aussi, tirer profit de ces récepteurs inhibiteurs pour échapper à l'immunosurveillance par les neutrophiles. Certaines études ont déjà révélé le potentiel thérapeutique des anticorps bloquant l'interaction entre les récepteurs inhibiteurs des neutrophiles et leurs ligands. C'est le cas pour l'anticorps bloquant l'interaction entre le récepteur SIRP α (exprimé par les neutrophiles) et son ligand CD47 (« don't eat me signal ») exprimé par les cellules tumorales, entre autres. Le blocage de cette interaction potentialise de façon significative l'effet anti-tumoral de l'ADCC induit par les neutrophiles sur des lignées cellulaires tumorales (140, 214). L'anticorps anti-SIRP α fait actuellement l'objet d'études cliniques de phase 1 pour une étude de toxicité (NCT03783403 ; NCT03990233). L'anticorps bloquant l'interaction entre le récepteur inhibiteur Siglec-9 (exprimé à la surface des neutrophiles) et ses ligand potentiels (acides sialiques) a lui-même montré son efficacité en restaurant l'activité tumoricide des neutrophiles indépendamment des anticorps, notamment par le relargage de ROS cytotoxiques (431). L'étude des récepteurs inhibiteurs des neutrophiles dans le cancer est plutôt récente, ce qui laisse penser que de nouvelles cibles thérapeutiques restent donc à découvrir.

OBJECTIFS DE LA THESE

L'objectif principal de ma thèse était de mieux définir l'hétérogénéité des neutrophiles au cours de la tumorigenèse. Pour cela, je me suis intéressé aux neutrophiles circulants chez des patients atteints de cancer, et aux neutrophiles associés aux tumeurs (TAN) dans un modèle murin de tumeur spontanée. Chez l'homme, nous avons combiné des approches de bioinformatique et de biologie, tandis que chez la souris, nous nous sommes principalement concentré sur des approches de biologie allant de l'anatomopathologie à la cytométrie en flux multi-paramétrique avec analyse non-supervisée des données.

RESULTATS

ARTICLE DE THESE

« Les neutrophiles circulants liés aux plaquettes possèdent une signature transcriptomique distincte qui est associée au pronostic du patient dans certains types de tumeurs »

Introduction à l'article de thèse

Bien que certaines évidences suggèrent que les TAN peuvent ralentir le développement tumoral (11, 304, 432), un nombre important d'études démontre un rôle pro-tumoral des neutrophiles (14, 15, 322). De plus en plus d'évidences provenant d'études menées chez la souris montrent que la pré-activation des neutrophiles (ou « priming » en anglais) en systémique est nécessaire pour leur permettre d'exercer pleinement leurs fonctions pro-tumorales une fois présents dans le microenvironnement tumoral (23, 76).

Les plaquettes sont connues pour former des agrégats avec les leucocytes dans la circulation sanguine. Dans le sepsis, il a été rapporté que l'agrégation plaquettaire sur les neutrophiles (formant les ANP pour agrégats neutrophiles-plaquettes) potentialisait les fonctions pro-inflammatoires de ces derniers (220, 224, 225). De plus, les ANP semblent avoir des capacités de migration transendothéliale supérieures par rapport aux neutrophiles libres (246, 433), favorisant ainsi une inflammation chronique pathologique dans les tissus.

Au début de ma thèse, le rôle des ANP dans le cancer restait inexploré. Nous avons donc fait l'hypothèse que l'agrégation plaquettaire sur les neutrophiles circulants pouvait les « conditionner » et avoir un impact sur leur fonction une fois présents dans le microenvironnement tumoral.

Dans cette étude, grâce à la cytométrie d'image (ImageStream®X), nous avons pu mettre en évidence que les neutrophiles agrégés aux plaquettes (ANP) étaient différents des neutrophiles dépourvus de plaquettes sur la base des marqueurs CD15 et CD14. De plus, nous avons montré que les ANP étaient enrichis dans la sous-population de neutrophiles de faible densité (Low Density Neutrophils, « LDN ») décrite chez les patients porteurs de cancer/tumeur. En utilisant des données de scRNAseq (GSE127465) de leucocytes issus de sang total de patients atteints de cancer du poumon, nous avons identifié un cluster de neutrophiles exprimant des gènes plaquettaires pouvant correspondre aux ANP. De façon intéressante, ce « cluster ANP » présente une signature moléculaire spécifique par rapport aux autres sous-populations des neutrophiles, qui semble avoir un impact pronostique sur la survie des patients atteints de cancer.

L'article ci-dessous est le fruit d'un travail collaboratif avec des personnes qui ont montré un réel enthousiasme et investissement pour mener à bien ce projet. Je tiens également à remercier Arthur Tourbez, étudiant en M2 à l'époque, que j'ai eu la chance d'encadrer. Son travail de M2 portant sur la génération de signature transcriptomique de neutrophile a significativement contribué à l'amélioration de la qualité de l'article suivant.

1 **Main Manuscript for**

2

3 **Circulating neutrophils bound to platelets possess a distinct gene signature that is**
4 **associated with patient's prognosis in selected tumor types.**

5

6 Pacôme Lecot¹, Maude Ardin¹, Sébastien Dussurgey², Vincent Alcazer¹, Lyvia Moudombi¹, Hector
7 Hernandez-Vargas¹, Aurélie Swalduz³, Alain Viari⁴, Christophe Caux¹, Marie-Cécile Michallet¹.

8

9 ¹TERI (Tumor Escape, Resistance and Immunity) Department, Centre de Recherche en Cancérologie
10 de Lyon, Centre Léon Bérard, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052,
11 CNRS 5286, 69008 Lyon, France

12 ²Université de Lyon, SFR Biosciences, ENS de Lyon, Inserm US8, CNRS UMS3444, UCBL - 50
13 Avenue Tony Garnier, 69007 Lyon, France

14 ³Department of Lung and Thoracic Medical Oncology, Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France

15 ⁴Synergie Lyon Cancer, Plateforme de Bio-informatique 'Gilles Thomas', Lyon, France

16

17 **Corresponding author Email:** Marie-cecile.michallet@lyon.unicancer.fr

18

19 **This PDF file includes:**

20 Main text

21 Figures 1 to 5

22 Supplemental Figures 1 to 4

23 Supplemental Tables 1 to 5

24

25 **Abstract**

26

27 Beyond their critical role in hemostasis, platelets physically interact with neutrophils to form
28 neutrophil-platelet aggregates (NPAs), enhancing neutrophil effector functions during inflammation.
29 NPAs may also promote disease progression in various inflammatory diseases. However,
30 characterization of NPAs in cancer remains totally unexplored. By using ImageStream®X (ISX)
31 imaging flow cytometer, we could identify and visualize CD15⁺ CD14^{low} CD36⁺ ITGA2B⁺ NPAs in non-
32 small cell lung cancer (NSCLC) patients as well as healthy donor's blood. We found that neutrophils

33 from NPA were distinct from free neutrophils based on a higher expression of CD15 and CD14
34 markers at the protein level. We further showed that platelets aggregated preferentially to low-density
35 neutrophils (LDN) as opposed to normal-density neutrophils (NDN). We next aimed to define a specific
36 gene signature of NPAs to evaluate their prognostic impact in cancer patients. By re-analyzing recent
37 public single-cell RNA sequencing (scRNAseq) data of whole blood leukocytes from NSCLC patients
38 (GSE127465), we could identify a subset of neutrophils with high platelet gene expression that may
39 correspond to NPAs. Interestingly, we showed that NPA possessed a specific molecular signature
40 compared with the other neutrophil subsets, independently of platelet genes. Lastly, we found that the
41 specific gene signature of NPA was associated with a worse prognosis in pancreatic cancer patients
42 but with a better prognosis in uveal melanoma patients. Collectively, our results suggest that
43 neutrophils from NPAs are a unique subset of neutrophils that once at tumor site may either promote
44 or prevent cancer progression depending on tumor types.

45

46 **Main text**

47

48 **Introduction**

49

50 Although, some recent evidence suggested that tumor-associated neutrophils (TANs) could
51 display anti-tumor properties (1–3), a large body of evidence demonstrated that TANs could promote
52 metastasis (4–6). Pro-tumor TANs can assist metastasis by blunting anti-tumor T-cell responses (4),
53 stimulating proliferation and invasiveness of metastatic tumor cells (5, 6). Accumulating evidence from
54 mouse studies showed that the priming of neutrophils outside of the tumor bed was necessary to fully
55 display their tumor-promoting functions once at tumor site (7, 8). A subset of circulating neutrophils,
56 termed low-density neutrophils (LDN) was found to display features of pro-tumor neutrophils, such as
57 increased T-cell suppressive functions, as opposed to normal-density neutrophils (NDN). Several
58 studies have shown that LDN expand in cancer patient's blood, especially in breast (9), lung (NSCLC)
59 (9–11) and head and neck cancer (HNC) (10, 12). Nevertheless, LDN remains a heterogeneous
60 population of cells including mature and immature neutrophils (9, 10). A subset of LDN expressing the
61 LOX-1 scavenger receptor was reported to display higher T-cell suppressive functions as compared to
62 LOX-1⁻ LDN (10). LOX-1⁺ T-cell suppressive neutrophils were recently reported to be also present in
63 lung tumors and were associated with a worse patient survival (13), supporting the idea that tumor-
64 promoting TAN may be derived from a distinct subset of neutrophils pre-existing in peripheral blood.

65

66 Beyond their critical role in hemostasis, platelets, the most abundant element in the human
67 blood, can bind to circulating leukocytes forming leukocyte-platelet aggregates, so as to enhance their
68 effector functions. Platelet P-selectin has been shown to enhance cross-presenting capacity of
69 monocyte-derived dendritic cells (14). In sepsis, in contrast to free neutrophils, NPAs produce higher
70 amount of neutrophil extracellular traps (NETs) (15–17) and display increased phagocytic function
71 (18–20). Furthermore, NPA display enhanced trans-endothelial migration (21, 22) therefore promoting
72 neutrophil infiltration to site of injury and fueling pathological inflammation in various diseases (17, 23–
73 25). However, to our knowledge, the characterization of NPAs in cancer patients remains unexplored.
74 We hypothesized that platelet aggregation on circulating neutrophils may prime them to foster tumor
75 progression once at tumor site.

76

77 In this study, by combining imaging flow cytometry on blood neutrophils and analysis of public
78 transcriptomic data of human neutrophils, we provided evidence that neutrophil from NPA was a
79 unique subset of neutrophils. Moreover, we showed that LDN as opposed to NDN were preferentially
80 involved in NPA formation. Interestingly, we could generate a specific gene signature of NPA that we
81 found to be associated with a worse prognosis in pancreatic cancer patients but with a better
82 prognosis in uveal melanoma patients. Collectively, our results suggest that neutrophil from NPA
83 might be “primed” in a distinct way so as to either promote or prevent cancer progression.

84

85

86

87 **Results**

88

89 **Neutrophils aggregated to platelets are distinct from free-neutrophils based on CD15 and CD14** 90 **protein expression, in both NSCLC patients and healthy donors' peripheral blood.**

91

92 Whole blood from a cohort of metastatic NSCLC patients (Table S1) included in the LIBIL
93 clinical trial (NCT02511288) at the Léon Bérard Hospital, was collected in EDTA-coated tubes. Age
94 and sex-matched healthy donors' (HDs) whole blood drawn with the same anticoagulant was used as
95 a control cohort. Using ImageStream®X imaging flow cytometer (ISX), NPAs from NSCLC patients
96 and HDs' whole blood were identified as CD15⁺ CD14^{low} neutrophils that were double positive for

97 platelet glycoprotein 4 (CD36) and integrin alpha-IIb (ITGA2B, also known as CD41a) (Fig. 1A-B). We
98 could also easily identify NPAs in unprocessed NSCLC patients' whole blood smear through May-
99 Grünwald-Giemsa staining (Fig. 1C). Because the frequency of NPAs was shown to be increased in
100 the blood of patients with various pathologies as compared to HD (26-28), we next quantified by ISX
101 the frequency of NPAs among neutrophils between NSCLC patients (median frequency = 0.73%) and
102 with the same gating strategy. We found that NPA frequency (median frequency = 0.73%) was quite
103 homogeneous NSCLC patients, whereas in HDs NPA proportion (median frequency = 1.17%) was
104 highly heterogeneous (Fig. 1D). Although there was a tendency for a decreased percentage of NPAs
105 in NSCLC patients compared to HD, the difference was not statistically significant (p-value = 0.11)
106 (Fig. 1D). These results suggest that NPAs preexist in basal condition and are not modulated by
107 cancer-related cues, at least in NSCLC cancer. Nevertheless, it is unknown if neutrophils from pre-
108 existing NPAs display a different phenotype as compared to free neutrophils, independently of healthy
109 or cancer condition. To address this question, we compared median fluorescence intensity (MFI) of
110 neutrophil markers between neutrophils from NPA and free neutrophils as a control condition, in both
111 NSCLC patients and HDs combined. Interestingly, we found a significant (p-value = 0.00037) higher
112 expression of CD15 (median MFI = 30 270) in neutrophils from NPAs as compared to free neutrophils
113 (median MFI = 28 751) (Fig. 1E). Although CD14 is expressed at a much lower level on neutrophil
114 surface compared to CD15, we noticed a significant (p-values = 0.025) increase of CD14 expression
115 in neutrophil from NPAs (median MFI = 1 901) as opposed to free neutrophils (median MFI = 1 685)
116 (Fig. 1E). We next wondered if platelets from NPAs were different from free platelet, especially
117 regarding platelet activation level. We therefore compared MFI of P-selectin (CD62P) platelet
118 activation marker between platelet from NPAs as opposed to free platelet. Similarly to what we found
119 for neutrophil markers, we found a significant (p-value = 0.03) higher expression of CD62P on platelet
120 from NPAs (median MFI = 3 239) compared to free platelets (median MFI = 2 899) (Fig. S1), meaning
121 that platelet bound neutrophils are more activated than free platelet. Collectively, these results suggest
122 that platelet aggregation to neutrophil result in phenotypic change of both neutrophils and platelets, at
123 least at the protein level.

124

125 **Platelets preferentially bind to low-density neutrophils, as opposed to normal-density**
126 **neutrophils in cancer patients' blood.**

127

128 Given the detrimental role of LDN in cancer (9–12, 29, 30), we next wondered if there was a
129 link between the lower density of neutrophil and platelet aggregation. We first determined whether
130 platelet genes were differentially expressed between LDN and NDN. Using publicly available
131 transcriptomic data of LDNs and NDNs from NSCLC and HNC patients' blood (GSE79404), we could
132 show that the published platelet-specific gene signature (Table S2) was significantly (p -value =
133 0.0022) more enriched in LDNs (median ssGSEA score = 0.34) than in NDNs (median ssGSEA score
134 = 0.24) (Fig. 2A) suggesting that platelets would more likely bind to LDN than to NDN. We next
135 performed Ficoll density gradient centrifugation on fresh NSCLC patients' whole blood in order to
136 harvest LDN and NDN (Fig. 2B). Using ISX, we could visualize $CD15^+ CD14^{low} CD36^+ ITGA2B^+$ NPAs
137 from LDNs (Fig. 2B-C) as detected in whole blood (Fig. 1B). NPAs represented around 2% of LDNs
138 but were negligible in the NDN population (Fig. 2D). Collectively, these results suggest that platelet
139 would preferentially bind to LDNs rather than NDNs.

140

141 **Platelet genes discriminate a subset of neutrophils in public scRNAseq data from NSCLC**
142 **patients' whole blood leukocytes.**

143

144 To go deeper into the characterization of NPAs in NSCLC patients, we took advantage of the
145 recently published scRNAseq dataset of NSCLC patients' whole blood leukocytes (GSE127465) (31).
146 Given the small size of platelets, we hypothesized that NPAs could be isolated as a single cell (Fig.
147 1B), just like free neutrophil, and therefore be present in scRNAseq data. Therefore, for our analysis
148 we used normalized counts tables and kept author's major cell type annotations to identify blood cell
149 populations. We then re-clustered all leukocytes (Fig. 3A) and distinguished six clusters of neutrophils
150 (named Neu 0, Neu1, Neu 2, Neu 6, Neu 7 and Neu 10) (Fig. 3B). Interestingly, we observed that Neu
151 7 cluster seemed to be distinct from the other neutrophil clusters, through its close proximity with the
152 platelet cluster (Fig. 3B). Using a published neutrophil gene signature (Table S2), we showed that Neu
153 7 had an enrichment score similar to the other neutrophil clusters, and greater than the other cell type
154 clusters (Fig. 3C), validating that Neu 7 correspond to a cluster of neutrophils. Moreover, individual
155 neutrophil-specific genes (*CSF3R*, *CXCR2* and *FCGR3B*) were expressed at the highest level in all six
156 clusters of neutrophils (Fig. 3E). We then evaluated the enrichment score of a published platelet-
157 specific gene signature (Table S2) (32, 33) across all neutrophil subsets and the other major immune
158 cell types by performing a single sample Gene Set Enrichment Analysis (ssGSEA). We found that the

159 neutrophil subset Neu 7 was highly enriched for the platelet signature (mean ssGSEA score 1.36),
160 almost as much as the platelet cluster (mean ssGSEA score 1.56) compared to the other neutrophil
161 clusters (mean ssGSEA score 0.82) and immune cell types (mean ssGSEA score 0.90) (Fig. 3D).
162 Looking at the gene level, among the 5 most-differentially upregulated platelet genes *PF4*, *PPBP* and
163 *NRGN* (Table S3) were the most discriminating genes (1.14, 1.46 and 1.75 log₂ fold change,
164 respectively) of Neu 7 cluster (Table S4) compared to the other neutrophils and immune cell types
165 (Fig. 3F). To rule out that platelet genes are upregulated in a subset of activated neutrophils, we
166 tested whether the enrichment of platelet signature was increased upon neutrophil activation. We used
167 public transcriptomic data of *in vitro* activated neutrophils (34, 35) and we could show that the
168 enrichment score of the platelet signature in neutrophils did not significantly differ upon activation
169 compared to control (Fig. S2). Expression of platelet genes in Neu 7 cluster seems therefore to be
170 independent of neutrophil activation status. Collectively, all these results strongly suggest that Neu 7
171 neutrophil cluster displaying a high expression of platelet genes most likely correspond to NPAs.

172

173 **Neutrophil from NPA possess a distinct gene signature compared with the other neutrophil**
174 **clusters in NSCLC patients' blood.**

175

176 Before going into the analysis of the NPA transcriptome, we noticed that only a small fraction
177 of cells of the Neu 7 cluster expressed platelet specific genes (*PF4*, *PPBP* and *NRGN*) (Fig. 3F).
178 When we re-projected cells for each individual neutrophil cluster, keeping the same UMAP parameters
179 used to discriminate each individual subset of leukocytes, we could show that the Neu 7 cluster was
180 more heterogeneous than the other neutrophil clusters based on visual cell dispersion (Fig. 4A and
181 Fig. S3). We wondered if such heterogeneity of the Neu 7 cluster could be explained by the lack of
182 expression of platelet specific genes for the majority of the cells. We showed that heterogeneity of Neu
183 7 cluster was clearly reduced after filtering out Neu 7 cells that did not co-expressed the 3 platelet
184 specific genes (*PF4*, *PPBP* and *NRGN*) at a level above 1 log₂ CPM (Fig. 4A). We came up with 48
185 cells (named "Neu 7 PPBP^{high} PF4^{high} NRGN^{high}") out of the 437 that highly expressed each of the 3
186 platelet specific genes, which represents 10% of all Neu 7 cells and 0.54 % among all neutrophils
187 (8873 cells). The latter percentage is consistent with the median frequency of NPA among all
188 neutrophil (0.73%) in our cohort of NSCLC patients. Considering all Neu 7 as NPA would have
189 represented 4.92% of NPA among all neutrophils, that is far beyond the 0.73% we found in our cohort,
190 suggesting that NPA in scRNAseq are overestimated if any filtering of the population (as described

191 above) has not been performed. For the generation of a specific gene signature of NPAs, only the 48
192 Neu 7 PPBP^{high} PF4^{high} NRG1^{high} cells were considered as NPA cells.

193

194 To generate a specific gene signature of NPAs, we performed a differential gene expression
195 analysis of the NPA cluster (Neu 7 PPBP^{high} PF4^{high} NRG1^{high} cells) in comparison to each individual
196 neutrophil clusters (Fig. 4B). Through Venn diagram approach, we could identify 72 genes that were
197 significantly upregulated in NPA cluster as compared to any of the other neutrophil clusters (Fig. 4C).
198 We further determined whether out of the 72 genes, some could still discriminate NPA cluster from the
199 other types of leukocytes (NK cells, Monocytes, T cells, B cells/pDC). We identified 46 genes that
200 distinguished NPA cluster not only from the other neutrophil clusters but also from the other types of
201 leukocytes (Fig. 4C). To next determine if neutrophils (and not platelets) from NPAs cluster were
202 distinct from any other subsets of neutrophils, we investigated whether out of the 46 genes, some
203 were not expressed by free platelet cluster (Table S3). Interestingly, we found 16 genes that were
204 exclusive to NPA cluster as opposed to free platelet cluster (Fig. 4D and Table S5). We then checked
205 that the 16 genes could significantly discriminate NPA cells from any other neutrophil subsets, and
206 other major immune cell types. For that we calculated the MCP counter score (reflecting the absolute
207 abundance of a given gene signature from transcriptomic data) of the “16_gene_NPA_signature” for
208 each individual neutrophils and performed statistical comparison of the mean MCP score between the
209 NPA cluster and each of the neutrophil clusters. As expected, we found that the
210 “16_gene_NPA_signature” could significantly (p -values ≤ 0.0001 for all comparison with NPA cluster)
211 discriminate NPA cells from any other subsets of neutrophils or other major immune cell types (Fig.
212 4E). Taken together, we could successfully generate a specific signature of NPA as opposed to the
213 other subset of neutrophils and the other major immune cell types, at least in NSCLC patients' blood.

214

215 **Specific NPA gene signature is associated with patient's prognosis in selected tumors types.**

216

217 We finally assessed the prognostic impact of the “16_gene_NPA_signature” for all cancer
218 types available in the TCGA. We found through a multivariate analysis that the
219 16_gene_NPA_signature was strongly associated with a worse overall survival of pancreatic cancer
220 patients (PAAD) (Hazard Ratio = 2.4 ; p -value = 0.002) (Fig. 5D-E, Fig. S4) independently of patient
221 age and tumor stage. In contrast, the 16_gene_NPA_signature was strongly associated with a better
222 overall survival for uveal melanoma patients (UVM) (Hazard Ratio = 0.13 ; p -value = 0.007)

223 independently of patient age and tumor stage. Interestingly, we showed that conventional neutrophil
224 signatures could not recapitulate prognostic impact of the 16_gene_NPA_signature observed in
225 pancreatic and uveal melanoma patients (Fig. 5D, Fig. S4). Collectively, our results therefore suggest
226 that not all neutrophils, but only a subset of them corresponding to NPA, when present in tumors may
227 either be protective or detrimental depending on the cancer types.

228

229 **Discussion**

230

231 To our knowledge, this is the first study that characterized NPA in cancer patients. We have
232 provided evidence that neutrophils from NPAs possessed a distinct phenotype as compared to any
233 other subsets of free neutrophils. We show that in contrast to NDN, LDN would be particularly involved
234 in the formation of NPA. Finally we found that this distinct subset of neutrophil bound to NPA was
235 associated with a worse overall survival in liver and pancreatic cancer patients but with a better
236 survival in uveal melanoma patients.

237

238 We show through ISX that NPA preexist in HDs' blood but they are not enriched under
239 cancer-related conditions. Nevertheless, we found that neutrophils from NPA were distinct from free
240 neutrophils through their higher expression of CD15 and CD14 (Fig. 1E). Moreover, platelets bound to
241 NPAs were also distinct from free platelet due to the increased expression of the platelet activation
242 marker CD62P (Fig. S1). Interestingly, CD15 is one the ligand for CD62P (36), which suggest that
243 such ligand/receptor couple may in part mediate the interaction between platelets and neutrophils.

244

245 Although unexpected, this is the first study that identified a yet unreported new subset of
246 neutrophils with high platelet gene expression that may most likely correspond to NPA. We ruled out
247 the possibility that platelet genes could be expressed by a subset of activated neutrophils as we did
248 not find enrichment of platelet signature in stimulated neutrophils (Fig. S2). Moreover, it is also unlikely
249 that neutrophils expressing platelet genes correspond to a common progenitor of megakaryocyte
250 (platelet-producing cell) and neutrophils, as the closest common progenitor between the two is the
251 common myeloid progenitor (CMP), which gives rise to all myeloid cells (37). High expression of
252 neutrophil-specific genes at this stage of differentiation was therefore unlikely to occur. Taken
253 together, platelet genes are more likely to be expressed exogenously by neutrophils through
254 aggregated-platelets. It is however plausible that platelets could have been isolated in the same

255 droplet than neutrophils, without any interaction. The potential random contamination of platelets
256 during single cell isolation of immune cells would have yielded cluster of cells expressing platelet-
257 specific genes in all immune cell types. However, expression of platelet specific genes was restricted
258 to neutrophil cell type, as opposed to other major immune cell types (Fig. 2F). Moreover, we found that
259 the frequency of neutrophil co-expressing the 3 platelet specific genes (*PF4*, *PPBP* and *NRGN*) was
260 very similar to the one we accurately determined by ISX in our cohort of NSCLC patients. This further
261 supports the idea that the cluster of neutrophils with high expression of platelet genes that we
262 identified in Zilionis's scRNAseq dataset may most likely correspond to NPA.

263

264 It was interesting to see that despite the fact that the majority of cells belong to the Neu 7
265 cluster (NPA cluster) did not co-expressed the 3 platelets genes, they were still belonged to NPA
266 cluster. Most cells expressed only 1 of the 3 platelet genes. This observation may support the fact that
267 NPA are distinct from the other subsets of neutrophils independently of genes expressed by free
268 platelets. We identified 16 genes not expressed by free platelet cluster that could discriminate the NPA
269 cluster from any other blood immune cell types, at least in blood tissue of NSCLC patients. It will be
270 paramount to confirm that such cluster of neutrophil expressing platelets genes is present in other
271 scRNAseq dataset of both cancer patients and HDs' blood leukocytes. This will allow us to determine
272 if the "16_gene_NPA_signature" is specific to cancer condition and/or cancer type dependent.

273

274 Many research groups reported that LDNs with enhanced T-cell suppressive properties,
275 expanded in cancer patients' blood as opposed to healthy donors (9–12, 38). Recent evidence
276 showed that high LDN expansion in cancer patients was associated with worse prognosis (11, 12),
277 including NSCLC patients (11). By performing a Ficoll density gradient, we showed that platelets
278 would preferentially bind to LDN in contrast to NDN (Fig. 3B-3C-3D). One likely explanation that
279 platelet bind preferentially to LDNs would be that LDNs *per se* have a higher potential for inducing
280 platelet aggregation to neutrophils. This is supported by previous studies showing that upon neutrophil
281 stimulation, neutrophil-secreted proteins, including Cathepsin G and MPO, induced platelet
282 aggregation (39, 40). In contrast, the lower density of neutrophil bound to platelet may also be a
283 consequence of platelet binding. Since NDN activation is sufficient to convert NDN into LDN (29), one
284 can hypothesize that activated platelets when bound to NDN activate and convert them into LDN. We
285 cannot either exclude that platelets may behave as floats changing NDN's density and retaining them

286 at the surface of the Ficoll gradient, explaining their recovery within peripheral blood mononuclear
287 cells (PBMCs).

288

289 Lastly, we found that NPA signature was associated with a poorer prognosis in pancreatic
290 cancer patients. This is consistent with the tumor-promoting role of TAN documented in pancreatic
291 cancer (41, 42). Interestingly, the NPA signature was associated with a better prognosis in uveal
292 melanoma patients. To our knowledge, no prior studies have documented any roles of neutrophils in
293 uveal melanoma tumors. Our study proposes NPA signature as a new potential good prognostic factor
294 for this relatively rare but deadly cancer (43). One possible explanation for the better survival of uveal
295 melanoma patients associated with the high expression of NPA signature could rely on the pro-
296 inflammatory phenotype of NPA (15–18, 23–25), which in this case may have anti-tumor properties. It
297 will be of great importance in future scRNAseq studies to determine if the “16_gene_NPA_signature”
298 could distinguish a particular subset of neutrophils especially in cancer types for which NPA signature
299 had a prognostic impact.

300

301 **Materials and Methods**

302

303 **Preparation of whole blood, LDNs and NDNs-enriched fractions for ISX**

304

305 Blood from NSCLC patients or healthy donors (HDs) was withdrawn in EDTA-coated vacutainers 1
306 hour prior to the processing. Two tubes of 3 ml of blood were centrifuged at 800 rpm (no brake) for 15
307 min at room temperature (RT) to separate plasma from leukocyte-enriched red pellet. Platelet-rich
308 plasma was discarded for both tubes. One out of the two tubes was used for whole blood staining
309 while the other served for the separation of LDNs from NDNs. For such separation, leukocyte-enriched
310 red pellet was re-suspended in 6 ml of PBS_{1x} (5 mM EDTA) and then gently layered on the top of 3 ml
311 of Ficoll (CMSMSL01-01, EUROBIO), before being centrifuged at 1800 rpm for 20 min at RT
312 (acceleration 5 and brake 1). LDNs-enriched PBMC ring and NDNs-enriched red pellet were washed
313 with PBS_{1x}, and pellets were re-suspended in BD Pharm Lyse™ (555899) according to manufacturer's
314 protocol to eliminate red blood cells. In parallel, whole blood leukocyte-enriched red pellet was also re-
315 suspended in BD Pharm Lyse™ for the same purpose. After incubation, RBC-lysed leukocytes were
316 washed twice with PBS_{1x} (5 mM EDTA) were re-suspended at the final concentration of 20.10⁶ cells/ml

317 prior to be stained. Samples were acquired on ISX no more than 5 days following cell staining and
318 fixation.

319

320 **Cell staining and fixation for ISX**

321

322 2.10^6 cells per sample were stained for 30 min in the dark at 4°C in 100 µl staining buffer (PBS_{1X}, 2 %
323 SVF, 5 mM EDTA) with antibodies against CD15 (561584, Clone HI98), CD14 (562335, MφP9),
324 CD41a (559777, HIP8) (all from BD), and CD36 (130-110-739, REA760) and CD62P (130-105-714,
325 REA389) from Miltenyi Biotec. Cells were washed twice with PBS_{1X} (5 mM EDTA, 2% fetal bovine
326 serum (FBS)) before being fixed in 2% formaldehyde solution (252549, Sigma-Aldrich). After
327 incubation at 4°C, cells were washed twice with PBS_{1X} (5 mM EDTA, 2% FBS) and re-suspended in a
328 final volume of 180 µl PBS_{1X} (5 mM EDTA, 2% FBS).

329

330 **Multi-spectral Imaging Flow Cytometry**

331

332 NPAs were imaged with ImageStream®X imaging flow cytometer (Amnis Corporation-Luminex,
333 Seattle, WA) using 405, 488, 561, and 642 lasers and the 40X objective. Brightfield provided
334 morphological and structural details of the cell. At least 300 000 RBC-lysed blood cells from NSCLC
335 patients or HDs separately, excluding debris and free-platelet with low_area, were collected for each
336 sample. Since flow-speed could influence the proportion of NPAs (44), RBC-lysed blood cells were
337 acquired with a flow-speed between 500 to 1000 events/second for each sample. Data were analyzed
338 using IDEAS image analysis software (Amnis Corporation, Seattle, WA). A specific gating strategy,
339 with multiple filtering steps was set up to identify non-coincidental viable NPAs. Such strategy aimed
340 first at retaining only focused cells based on Gradient RMS values for each event. Remaining debris
341 and free platelets with Low_Area were discarded. Dead cells positive for Zombie NIR (Biolegend)
342 viability marker were then eliminated. Neutrophile were selected as cells with high expression of CD15
343 and a low expression of CD14 markers. Low area event on CD15 object mask were eliminated to
344 exclude CD15⁺ debris or CD15⁺ insufficient quality staining for an accurate estimation of true NPA.
345 Platelet-related events were then selected by gating on events positive for both ITGA2B and CD36
346 cell-surface markers. A second filter was applied to narrow down the selection of platelet-related
347 events by only considering the ones that with high ITGA2B intensity on ITGA2B-related component
348 with the largest area to remove residual platelet debris. To only retain non-coincidental NPAs, two

349 distinct masks delimiting neutrophil-related CD15 stained-area and platelet-related ITGA2B stained-
350 area were created. Non-coincidental NPAs were events for which neutrophil and platelet-associated
351 masks were overlapping with at least one pixel, and confirmed by image examination of random
352 samples. Only the most-focused platelet-related events were considered by selecting events with high
353 gradient RMS of ITGA2B marker on platelet area. Frequencies of NPAs were calculated on at least
354 100 non-coincidental NPAs for each NSCLC patients and HDs. Median fluorescence intensity of
355 CD14, CD15 and CD62P was measured on both non-coincidental and coincidental NPAs (control
356 condition) was calculated based on overall fluorescence of neutrophil with the platelet attached or not.

357

358 **May-Grünwald-Giemsa staining**

359

360 A blood smear from a drop of NSCLC patients' whole blood was performed on a glass slide. Blood
361 smear was dried up for 10/15 min at RT. 500 to 750 μ l of May-Grünwald staining was layered on dried
362 blood smear and covered to prevent evaporation. 500 to 750 μ l of PBS_{1x} was layered on slide to rinse.
363 Blood smear slide was dived in freshly made Giemsa staining solution (1500 μ l of staining in 20 ml of
364 PBS_{1x}) and incubated for 20 min at RT. Slide was then taken out and completely dried at RT before
365 being visualized under microscope with a 60X objective.

366

367 **Bioinformatic analysis of public scRNAseq data of human whole blood leukocytes**

368

369 ScRNAseq data of 6 NSCLC patients' whole blood cells were downloaded from GEO (GSE127465) as
370 normalized count per million (CPM) gene expression matrix. Briefly, pre-processing of scRNAseq data
371 performed by the authors (31) included the removal of dead cells, identified by a mitochondrial gene
372 content > 20% among total gene transcribed ; cells with poor quality transcriptome, as being cells with
373 less than 300 counts ; removal of doublet cells performed with Scrublet (45). We next performed
374 analysis of CPM gene expression matrix from 6 NSCLC patients' whole blood leukocytes by using
375 Seurat R package (version 3.1.1). We first removed genes that were not expressed in at least 3 cells
376 and filtered-out cells with less than 200 different transcribed-genes (Seurat default parameters). Matrix
377 was log-transformed and scaled prior to principal component analysis (PCA) with ScaleData Seurat
378 function. PCA was performed on the 2000 most-variable genes, using RunPCA function. We used
379 JackStraw function to determine the statistical significance of PCA scores that led us to retain the first
380 9 principal components (PCs). We next define the number of clusters by using FindNeighbors and

381 FindClusters functions that take into account the first 9 PCAs and a resolution of 0.66, leading to 11
382 clusters. We ran the uniform manifold approximation and projection (UMAP) dimensional reduction
383 technique, using RunUMAP function, and then display 2D UMAP projection. We re-used the author
384 major cell type annotation (31) based on the validated leukocyte gene signature matrix (LM22) (46).

385

386 **Differential gene expression analysis**

387

388 From Seurat object generated from GSE127465 CPM gene expression matrix, differential gene
389 expression analysis between 2 distinct clusters was performed using FindAllMarkers function from
390 Seurat R package. Only genes detected in at least 25% of cells and with a positive average log fold-
391 change were retained. Platelet signature (Table S3) and Neu 7 signature (Table S4) was defined as all
392 genes upregulated in free platelet cluster compared to all other clusters with an average \log_2
393 fold change of 0.25, but not cutoff value for the adjusted p-value. For differential gene expression
394 analysis of NPA cluster (Neu 7 PPBP^{high} PF4^{high} NRG1^{high} cells) compared to each individual
395 neutrophil cluster, only upregulated genes in NPA cluster were considered, with no cutoff values for
396 the fold change differential expression nor the adjusted p-value.

397

398 **Single sample Gene Set Enrichment Analysis (ssGSEA)**

399

400 SsGSEA from GSVA R package (version 1.32.0) was performed on public microarray data of in vitro
401 stimulated and unstimulated neutrophils (GSE15139 and GSE49757). For both data sets, control
402 probes, and probes with ambiguous gene symbol were removed. For probes matching to identical
403 genes, mean expression value per gene was calculated on probes matching to that gene to retain only
404 one gene expression value per gene. SsGSEA of the Raghavachari platelet signature and the Bindea
405 neutrophil signature (Table S2) was performed on each replicates of each groups using GSVA R
406 package. All ssGSEA scores were bar plotted with ggplot2 R package (version 3.2.1).

407

408 **Venn diagrams**

409

410 Venn diagrams were generated by using the Venn and Compute.Venn function from the VennR
411 package (version 3.1.0.9000).

412

413 **MCP counter on scRNAseq data**

414

415 Normalized CPM expression matrix for all cells was generated from Seurat object. MCP counter
416 scores (mean expression of all genes for a given signature (in \log_2 TPM +1)) of the
417 “16_gene_NPA_signature” (Table S5) were calculated for each individual cells using
418 MCPcounter.estimate function from MCPcounter package (version 1.2.0). Comparison of mean MCP
419 score between NPA cluster (Neu 7 PPBP^{high} PF4^{high} NRG1^{high} cells) and each individual neutrophil
420 clusters was performed with the Stat_compare_means function from the ggpubr package (version
421 0.2.3) choosing non-parametric Wilcoxon rank-sum (Mann–Whitney) statistical test. Results were
422 presented through violin plots that were generated with ggplot2 R package.

423

424 **Survival analysis**

425

426 TCGA pan-cancer RSEM normalized gene expression data were downloaded from UCSC Xena
427 Browser and \log_2 +1 transformed. Updated clinical data with survival endpoints were retrieved from
428 TCGA-CDR paper (Cell 2018, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.052>).

429 Immune signatures (including the “16_gene_NPA_signature”) were calculated as the mean expression
430 of each individual gene. Patients were then stratified in three groups based on each signature’s tercile
431 values.

432 Survival analysis was performed using the survminer and survival R packages. For each cancer type,
433 survival curves were estimated with the Kaplan Meier and compared with the log-rank test.
434 Multivariate analysis considering age and tumor stage as cofounding factors was then performed
435 using a cox model with p-value correction using the Benjamini-Hochberg method.

436

437 **Acknowledgments**

438

439 We thank Laurie Tonon, Janice Kielbassa, Manuela Pereira-Abrantes, Margaux Hubert and Jenny
440 Valladeau-Guilemond for careful reading of the manuscript, helpful comments and suggestions. We
441 want to thank the staff of the core facilities at the Cancer Research Center of Lyon (CRCL) for
442 technical assistance, especially the cytometry core facility, and the biological resource center (BRC) of
443 the Centre Léon Bérard (CLB) for providing human samples. We acknowledge the Agence Nationale
444 de la Recherche (contracts : ANR -11-EQPX-0035 PHENOCAN) as well as the CELPHEDIA

445 Infrastructure (<http://www.celphedia.eu/>), especially the center AniRA in Lyon, for the use of
446 ImageStreamX. P. Lecot was supported by grants from the French Government PhD Fellowship
447 (2016-2019), and 1-year extension Ph.D. Fellowship from Ligue Nationale contre le cancer
448 (2019/2020). We also want to thank the Plan Cancer (INCa-ITMO Cancer), the Ligue contre le Cancer
449 (Régionale Auvergne-Rhône-Alpes, Comité du Rhône), the LABEX DEVweCAN (ANR-10-LABX-0061)
450 of the University of Lyon and the RHU MyPROBE (ANR-17-RHUS-0008), both within the program
451 Investissements d'Avenir organized by the French National Research Agency (ANR), and the
452 LYRICAN (grant INCa-DGOS-Inserm_12563).

453

454 **References**

455

- 456 1. A. Blaisdell, *et al.*, Neutrophils Oppose Uterine Epithelial Carcinogenesis via Debridement of
457 Hypoxic Tumor Cells. *Cancer Cell* **28**, 785–799 (2015).
- 458 2. S. Singhal, *et al.*, Origin and Role of a Subset of Tumor-Associated Neutrophils with Antigen-
459 Presenting Cell Features in Early-Stage Human Lung Cancer. *Cancer Cell* **30**, 120–135 (2016).
- 460 3. A. Ponzetta, *et al.*, Neutrophils Driving Unconventional T Cells Mediate Resistance against
461 Murine Sarcomas and Selected Human Tumors. *Cell* **178**, 346-360.e24 (2019).
- 462 4. S. B. Coffelt, *et al.*, IL17-producing $\gamma\delta$ T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer
463 metastasis. *Nature* **522**, 345–348 (2015).
- 464 5. S. K. Wculek, I. Malanchi, Neutrophils support lung colonization of metastasis-initiating breast
465 cancer cells. *Nature* **528**, 413–417 (2015).
- 466 6. J. Albrengues, *et al.*, Neutrophil extracellular traps produced during inflammation awaken
467 dormant cancer cells in mice. *Science* **361**, eaao4227 (2018).
- 468 7. C. Engblom, *et al.*, Osteoblasts remotely supply lung tumors with cancer-promoting SiglecFhigh
469 neutrophils. *Science* **358** (2017).
- 470 8. C. Wu, *et al.*, Spleen mediates a distinct hematopoietic progenitor response supporting tumor-
471 promoting myelopoiesis. *J. Clin. Invest.* **128**, 3425–3438 (2018).
- 472 9. J. Y. Sagiv, *et al.*, Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in
473 cancer. *Cell Rep* **10**, 562–573 (2015).
- 474 10. T. Condamine, *et al.*, Lectin-type oxidized LDL receptor-1 distinguishes population of human
475 polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in cancer patients. *Sci Immunol* **1** (2016).
- 476 11. M. E. Shaul, *et al.*, Circulating neutrophil subsets in advanced lung cancer patients exhibit
477 unique immune signature and relate to prognosis. *FASEB J.* **34**, 4204–4218 (2020).
- 478 12. S. Lang, *et al.*, Clinical Relevance and Suppressive Capacity of Human Myeloid-Derived
479 Suppressor Cell Subsets. *Clin. Cancer Res.* **24**, 4834–4844 (2018).
- 480 13. Y. Si, *et al.*, Multidimensional imaging provides evidence for down-regulation of T cell effector
481 function by MDSC in human cancer tissue. *Sci Immunol* **4** (2019).
- 482 14. P. Han, *et al.*, Platelet P-selectin initiates cross-presentation and dendritic cell differentiation in
483 blood monocytes. *Sci Adv* **6**, eaaz1580 (2020).

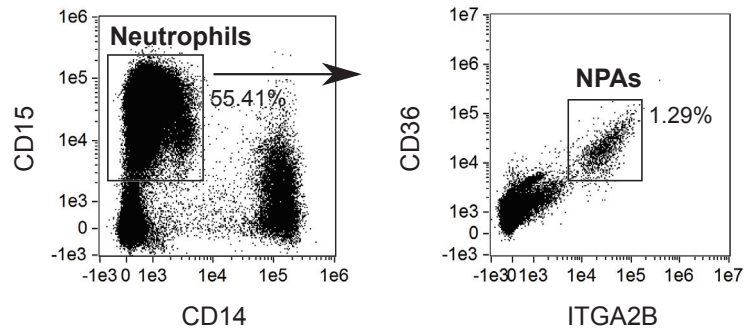
- 484 15. B. McDonald, R. Urrutia, B. G. Yipp, C. N. Jenne, P. Kubes, Intravascular neutrophil extracellular
485 traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis. *Cell Host Microbe* **12**, 324–333
486 (2012).
- 487 16. S. R. Clark, *et al.*, Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in
488 septic blood. *Nat. Med.* **13**, 463–469 (2007).
- 489 17. A. Cadrillier, *et al.*, Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute
490 lung injury. *J Clin Invest* **122**, 2661–2671 (2012).
- 491 18. M. J. Peters, *et al.*, Circulating platelet-neutrophil complexes represent a subpopulation of
492 activated neutrophils primed for adhesion, phagocytosis and intracellular killing. *Br. J. Haematol.*
493 **106**, 391–399 (1999).
- 494 19. A. Assinger, *et al.*, Efficient phagocytosis of periodontopathogens by neutrophils requires plasma
495 factors, platelets and TLR2. *J. Thromb. Haemost.* **9**, 799–809 (2011).
- 496 20. S. M. Hurley, *et al.*, Platelet-Dependent Neutrophil Function Is Dysregulated by M Protein from
497 *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun* **83**, 3515–3525 (2015).
- 498 21. F. W. Lam, A. R. Burns, C. W. Smith, R. E. Rumbaut, Platelets enhance neutrophil
499 transendothelial migration via P-selectin glycoprotein ligand-1. *Am. J. Physiol. Heart Circ.*
500 *Physiol.* **300**, H468–475 (2011).
- 501 22. S. Badrnya, L. M. Butler, C. Söderberg-Naucler, I. Volf, A. Assinger, Platelets directly enhance
502 neutrophil transmigration in response to oxidised low-density lipoprotein. *Thromb. Haemost.* **108**,
503 719–729 (2012).
- 504 23. V. Sreeramkumar, *et al.*, Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. *Science*
505 **346**, 1234–1238 (2014).
- 506 24. J. García-Prieto, *et al.*, Neutrophil stunning by metoprolol reduces infarct size. *Nat Commun* **8**,
507 14780 (2017).
- 508 25. Q. Hou, *et al.*, Inhibition of IP6K1 suppresses neutrophil-mediated pulmonary damage in
509 bacterial pneumonia. *Sci Transl Med* **10** (2018).
- 510 26. K. Ueno, *et al.*, Circulating platelet-neutrophil aggregates play a significant role in Kawasaki
511 disease. *Circ. J.* **79**, 1349–1356 (2015).
- 512 27. R. Polanowska-Grabowska, *et al.*, P-selectin-mediated platelet-neutrophil aggregate formation
513 activates neutrophils in mouse and human sickle cell disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*
514 **30**, 2392–2399 (2010).
- 515 28. F. Herster, *et al.*, Platelets Aggregate With Neutrophils and Promote Skin Pathology in Psoriasis.
516 *Front Immunol* **10**, 1867 (2019).
- 517 29. P. C. Rodriguez, *et al.*, Arginase I-producing myeloid-derived suppressor cells in renal cell
518 carcinoma are a subpopulation of activated granulocytes. *Cancer Res.* **69**, 1553–1560 (2009).
- 519 30. S. Trellakis, *et al.*, Polymorphonuclear granulocytes in human head and neck cancer: enhanced
520 inflammatory activity, modulation by cancer cells and expansion in advanced disease. *Int. J.*
521 *Cancer* **129**, 2183–2193 (2011).
- 522 31. R. Zilionis, *et al.*, Single-Cell Transcriptomics of Human and Mouse Lung Cancers Reveals
523 Conserved Myeloid Populations across Individuals and Species. *Immunity* **50**, 1317–1334.e10
524 (2019).
- 525 32. D. V. Gnatenko, *et al.*, Transcript profiling of human platelets using microarray and serial
526 analysis of gene expression. *Blood* **101**, 2285–2293 (2003).

- 527 33. N. Raghavachari, *et al.*, Amplified expression profiling of platelet transcriptome reveals changes
528 in arginine metabolic pathways in patients with sickle cell disease. *Circulation* **115**, 1551–1562
529 (2007).
- 530 34. A. Daryadel, *et al.*, RhoH/TTF negatively regulates leukotriene production in neutrophils. *J.*
531 *Immunol.* **182**, 6527–6532 (2009).
- 532 35. P. Khaenam, *et al.*, A transcriptomic reporter assay employing neutrophils to measure
533 immunogenic activity of septic patients' plasma. *J Transl Med* **12**, 65 (2014).
- 534 36. E. Larsen, *et al.*, PADGEM-dependent adhesion of platelets to monocytes and neutrophils is
535 mediated by a lineage-specific carbohydrate, LNF III (CD15). *Cell* **63**, 467–474 (1990).
- 536 37. K. Weiskopf, *et al.*, Myeloid Cell Origins, Differentiation, and Clinical Implications. *Microbiol*
537 *Spectr* **4** (2016).
- 538 38. P. C. Rodriguez, *et al.*, Arginase I Production in the Tumor Microenvironment by Mature Myeloid
539 Cells Inhibits T-Cell Receptor Expression and Antigen-Specific T-Cell Responses. *Cancer Res*
540 **64**, 5839–5849 (2004).
- 541 39. N. Faraday, *et al.*, Cathepsin G-dependent modulation of platelet thrombus formation in vivo by
542 blood neutrophils. *PLoS ONE* **8**, e71447 (2013).
- 543 40. H. Kolarova, *et al.*, Myeloperoxidase induces the priming of platelets. *Free Radic. Biol. Med.* **61**,
544 357–369 (2013).
- 545 41. C. W. Steele, *et al.*, CXCR2 Inhibition Profoundly Suppresses Metastases and Augments
546 Immunotherapy in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* **29**, 832–845 (2016).
- 547 42. T. M. Nywening, *et al.*, Targeting both tumour-associated CXCR2+ neutrophils and CCR2+
548 macrophages disrupts myeloid recruitment and improves chemotherapeutic responses in
549 pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gut* **67**, 1112–1123 (2018).
- 550 43. S. Kaliki, C. L. Shields, Uveal melanoma: relatively rare but deadly cancer. *Eye* **31**, 241–257
551 (2017).
- 552 44. M. Mauler, *et al.*, Platelet-neutrophil complex formation—a detailed in vitro analysis of murine and
553 human blood samples. *J. Leukoc. Biol.* **99**, 781–789 (2016).
- 554 45. S. L. Wolock, R. Lopez, A. M. Klein, Scrublet: Computational Identification of Cell Doublets in
555 Single-Cell Transcriptomic Data. *Cell Syst* **8**, 281–291.e9 (2019).
- 556 46. A. M. Newman, *et al.*, Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles. *Nat.*
557 *Methods* **12**, 453–457 (2015).
- 558
- 559
- 560
- 561
- 562
- 563
- 564
- 565
- 566

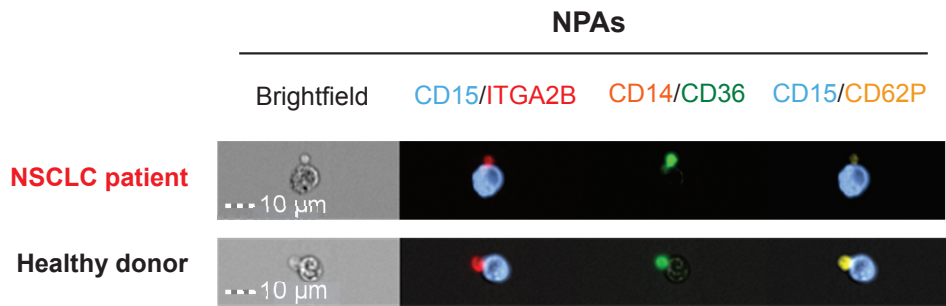
567 **Figures and Supplemental figures**

568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598

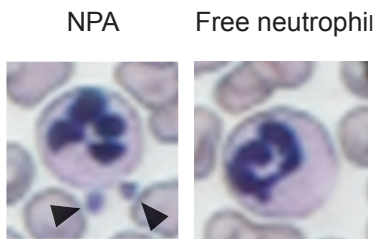
A



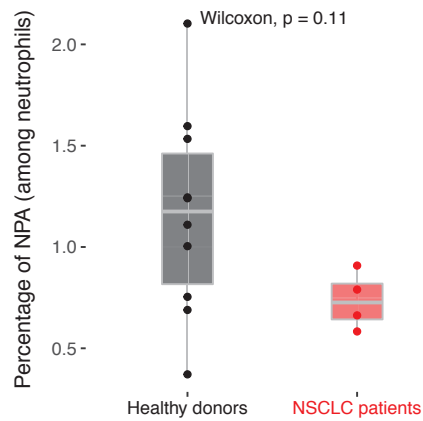
B



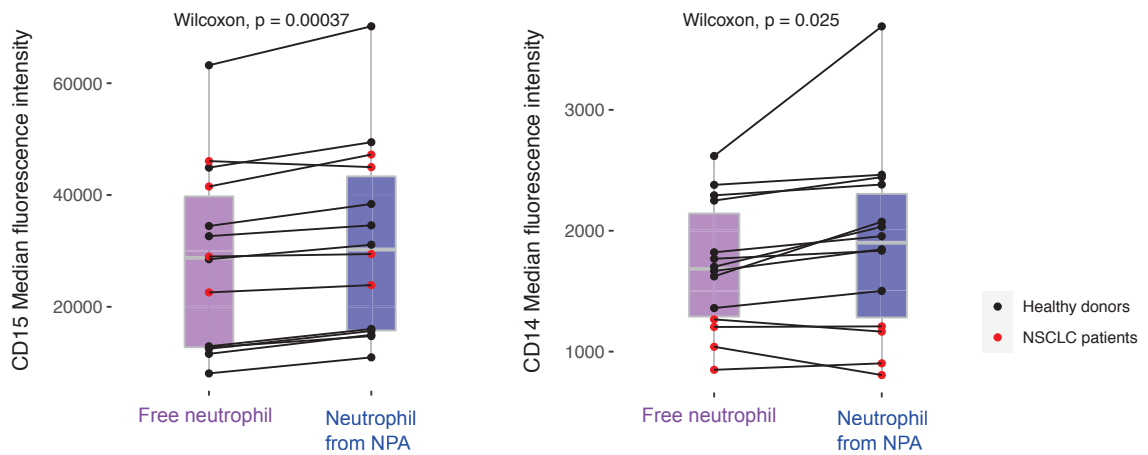
C



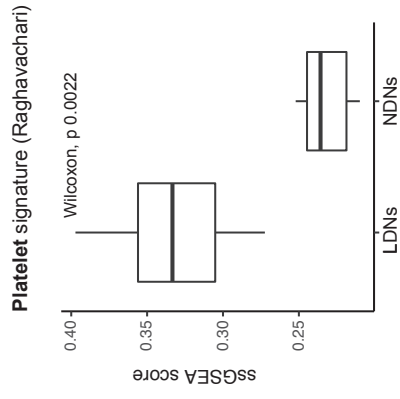
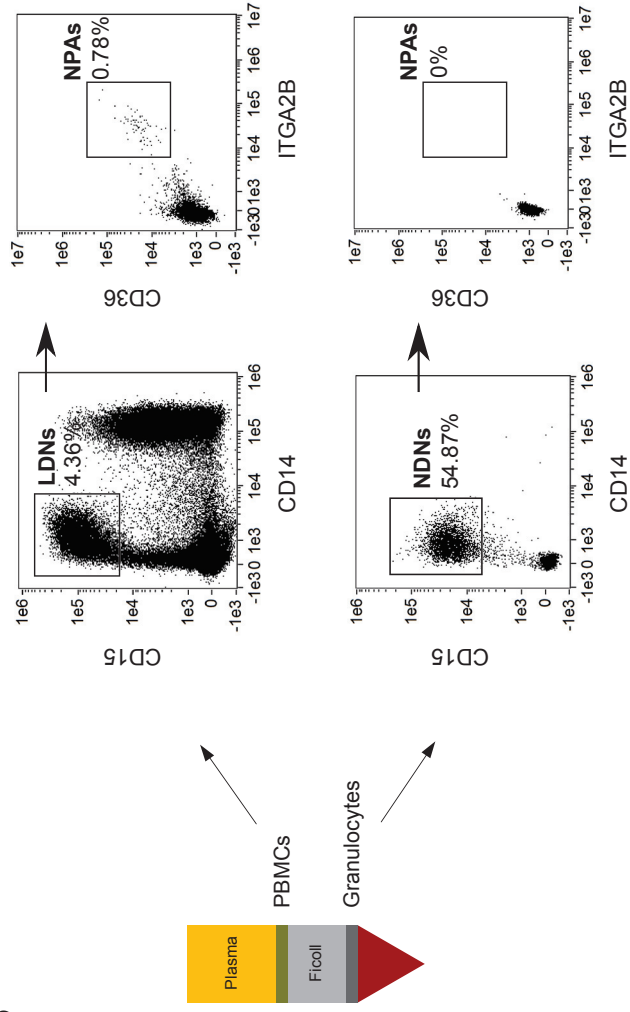
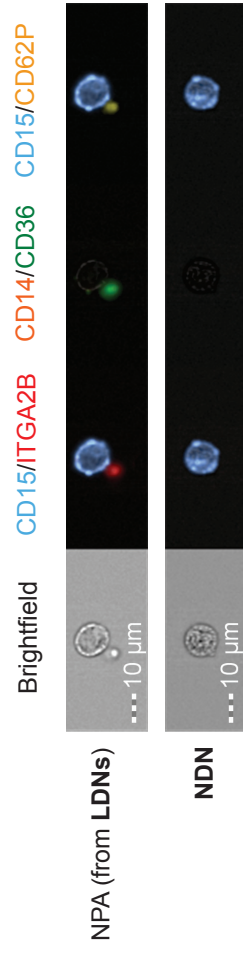
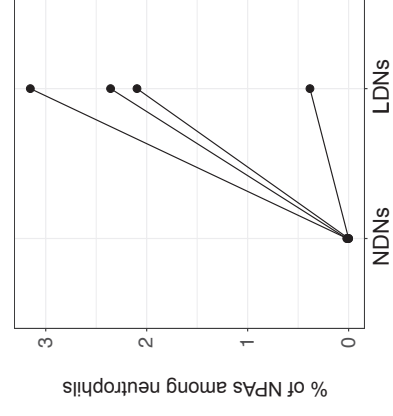
D



E

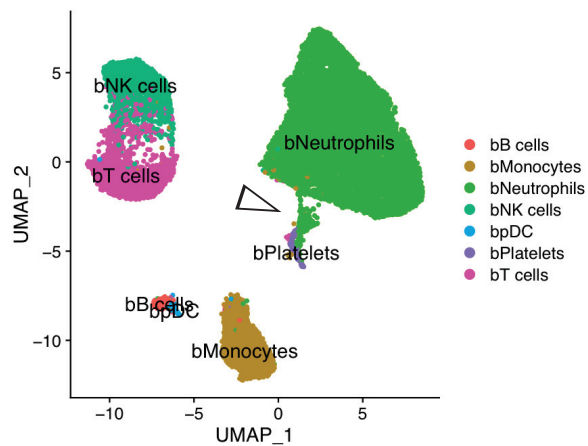


599 **Figure 1. Neutrophils aggregated to platelets are distinct from free-neutrophils based on CD15**
600 **and CD14 protein expression, in both NSCLC patients and healthy donors' peripheral blood.**
601
602 (A) Gating strategy on ISX to identify CD36⁺ ITGA2B⁺ NPAs from CD15⁺ CD14^{low} neutrophils in
603 NSCLC patients' peripheral whole blood (one representative data of n= 4 NSCLC patients' blood). (B)
604 Visualization of CD15⁺ CD14^{low} CD36⁺ ITGA2B⁺ NPAs by ISX in NSCLC patients and HDs' peripheral
605 blood. Images were taken with X40 objective. CD15: Neutrophil marker; CD14: Monocyte marker;
606 ITGA2B, CD36, CD62P: Platelet markers. (C) May-Grünwald-Giemsa coloration on NSCLC patient's
607 whole blood smear. X100 magnification. Dark arrows show the presence of platelets aggregated to
608 neutrophil (NPAs). Neutrophil is evidenced by segmented nucleus in dark purple. Free neutrophil
609 refers to neutrophil free of platelets. (D) Box plot representing the frequency of non-coincidental
610 CD15⁺ CD14^{low} CD36⁺ ITGA2B⁺ NPAs (among all neutrophils) in whole blood of NSCLC (n=4) patients
611 and HDs (n=10), determined by ISX. Difference in terms of frequency of NPAs between NSCLC
612 patients and HDs was assessed by the Wilcoxon rank-sum (Mann–Whitney) statistical test. (E) Box
613 plot representing the median fluorescence intensity (MFI) of CD15 marker (left panel) and CD14
614 marker (right pannel) of neutrophil from non-coincidental NPA compared with neutrophil from co-
615 incidental NPA, termed “free neutrophil” (see Materials and Methods). Difference of MFI between the
616 two different conditions was assessed by the paired Wilcoxon rank-sum (Mann–Whitney) statistical
617 test.
618

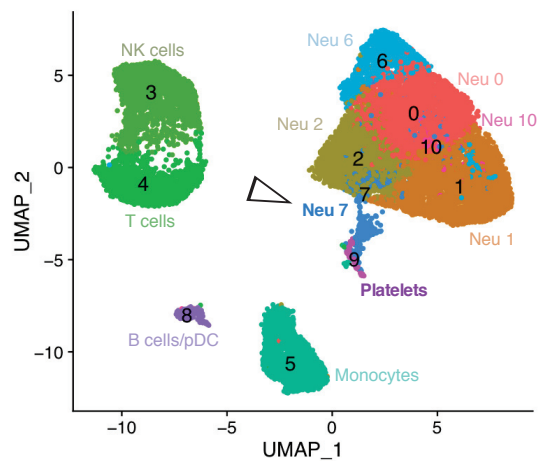
A**B****C****D**

619 **Figure 2. Low-density neutrophils have a higher affinity for platelet binding as opposed to**
620 **normal-density neutrophils.**
621
622 (A) Box plot representing ssGSEA enrichment scores of the Raghavachari platelet signature (Table
623 S2) across LDNs and patients' matched NDNs from 6 cancer patients (GSE79404). Differential
624 enrichment of platelet signature between LDN and NDN groups was assessed by the Wilcoxon rank-
625 sum (Mann–Whitney) statistical test. (B) Schematic representation of Ficoll density gradient
626 centrifugation of human whole blood showing the separation of the low-density fraction (containing
627 PBMCs) from the normal-density fraction (containing mostly granulocytes). Both fractions from NSCLC
628 patients' blood were analyzed by ISX, to identify CD15⁺ CD14^{low} LDNs (in the low-density fraction) and
629 CD15⁺ CD14^{low} NDNs (in the normal-density fraction). From either LDNs or NDNs gates, all CD36⁺
630 ITGA2B⁺ events were gated as "NPAs". (C) Visualization by ISX in NSCLC patients of non-
631 coincidental CD36⁺ ITGA2B⁺ NPAs from LDN gate in the PBMC fraction and NDN gate in the
632 granulocyte fraction. Images were taken with X40 objective. CD15: Neutrophil marker; CD14:
633 Monocyte marker; ITGA2B, CD36, CD62P: Platelet markers. (D) Dot plot reflecting the frequencies of
634 non-coincidental CD15⁺ CD14^{low} CD36⁺ ITGA2B⁺ NPAs among NDNs and LDNs determined by ISX,
635 across n=4 NSCLC patients.
636

A

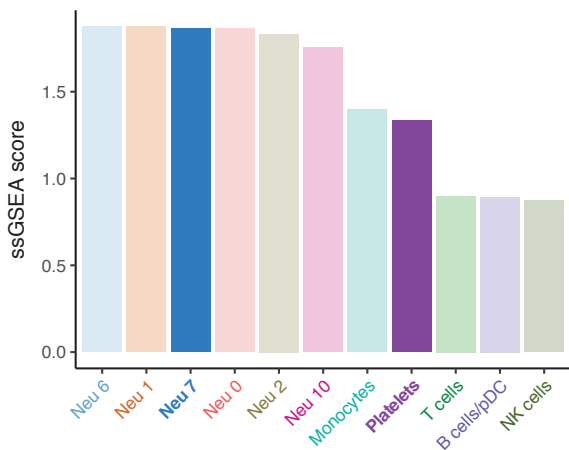


B



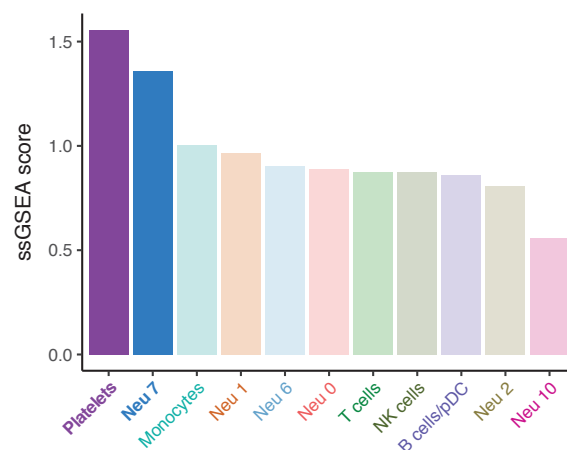
C

Neutrophil signature (Bindea)



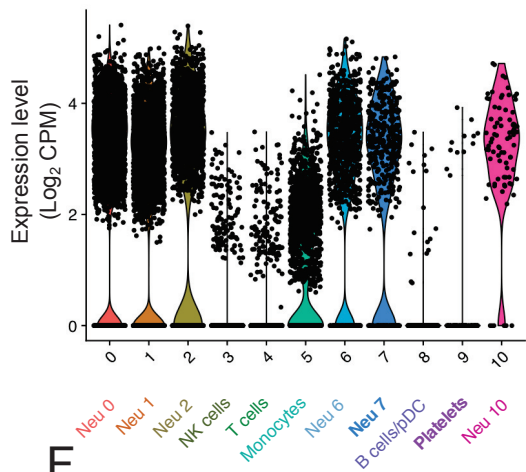
D

Platelet signature (Raghavachari)

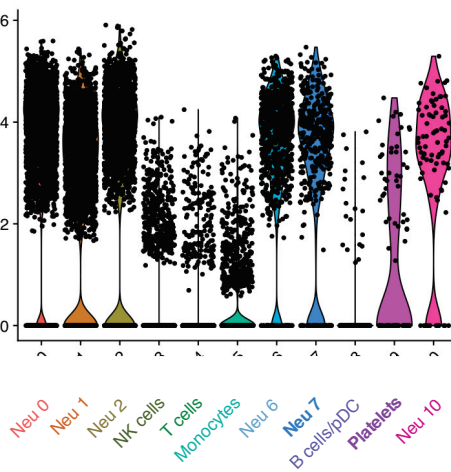


E

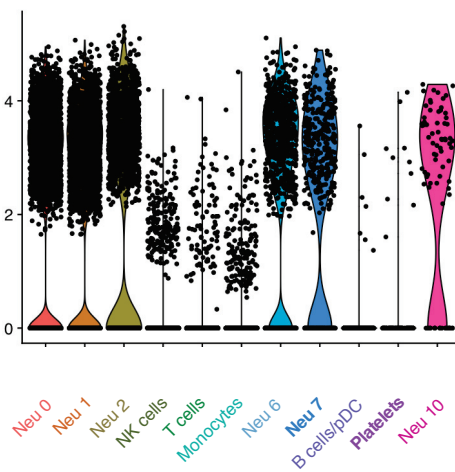
CSF3R



CXCR2

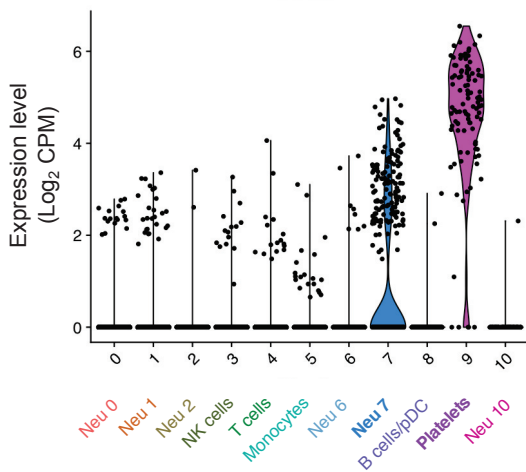


FCGR3B

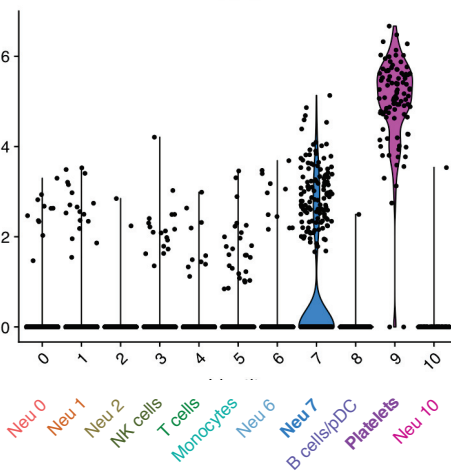


F

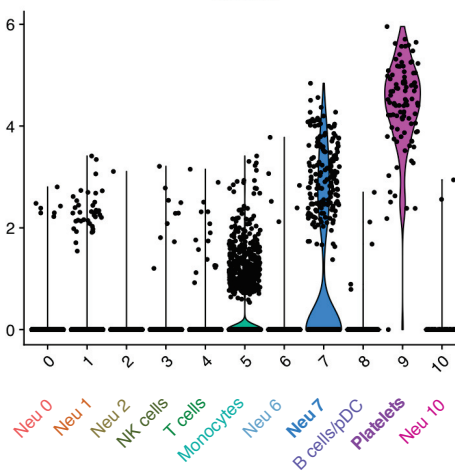
PPBP



PF4



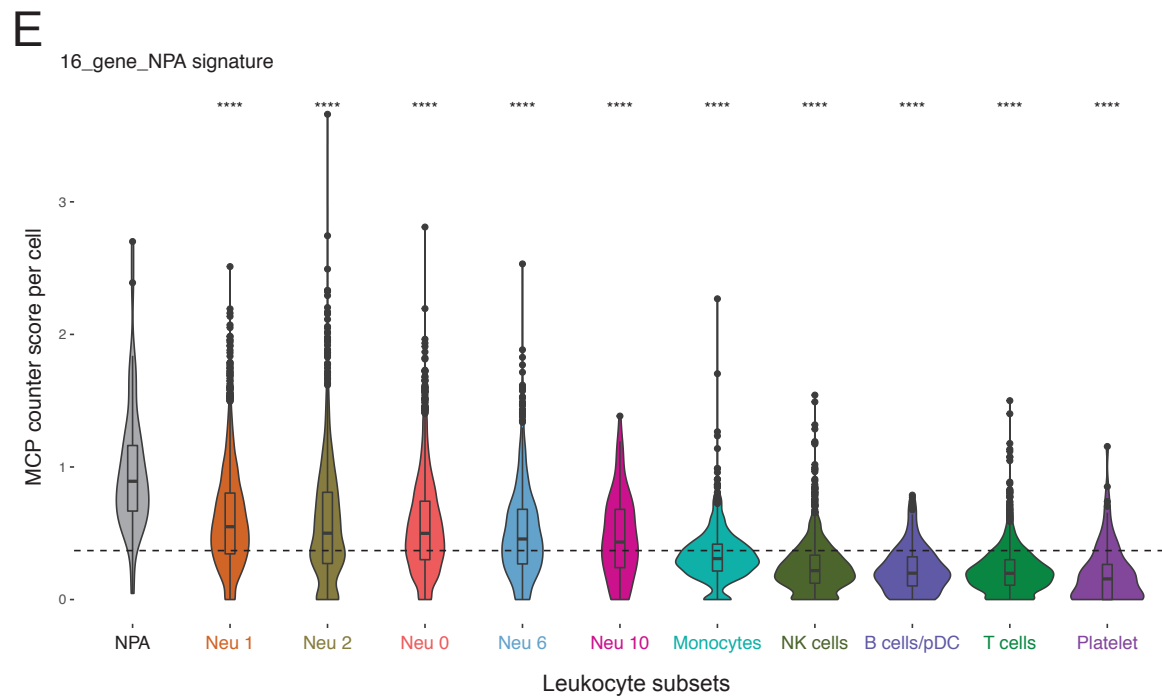
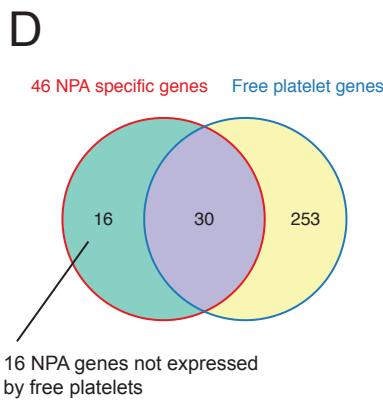
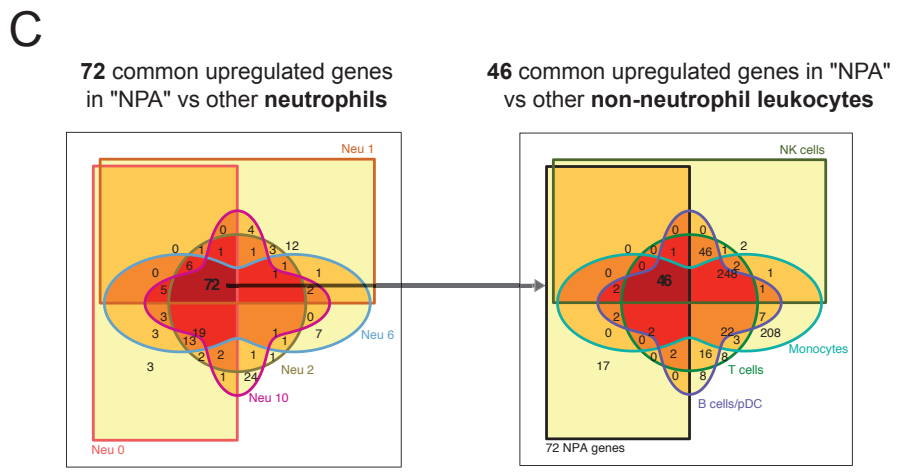
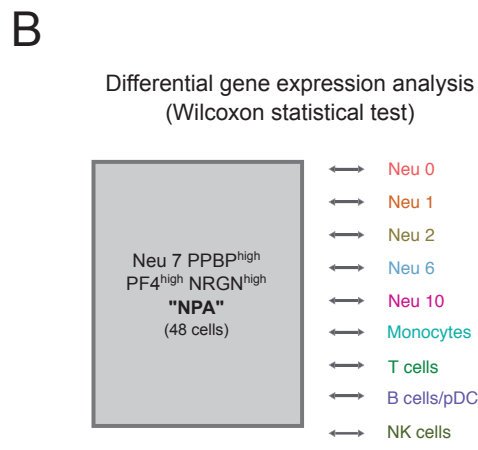
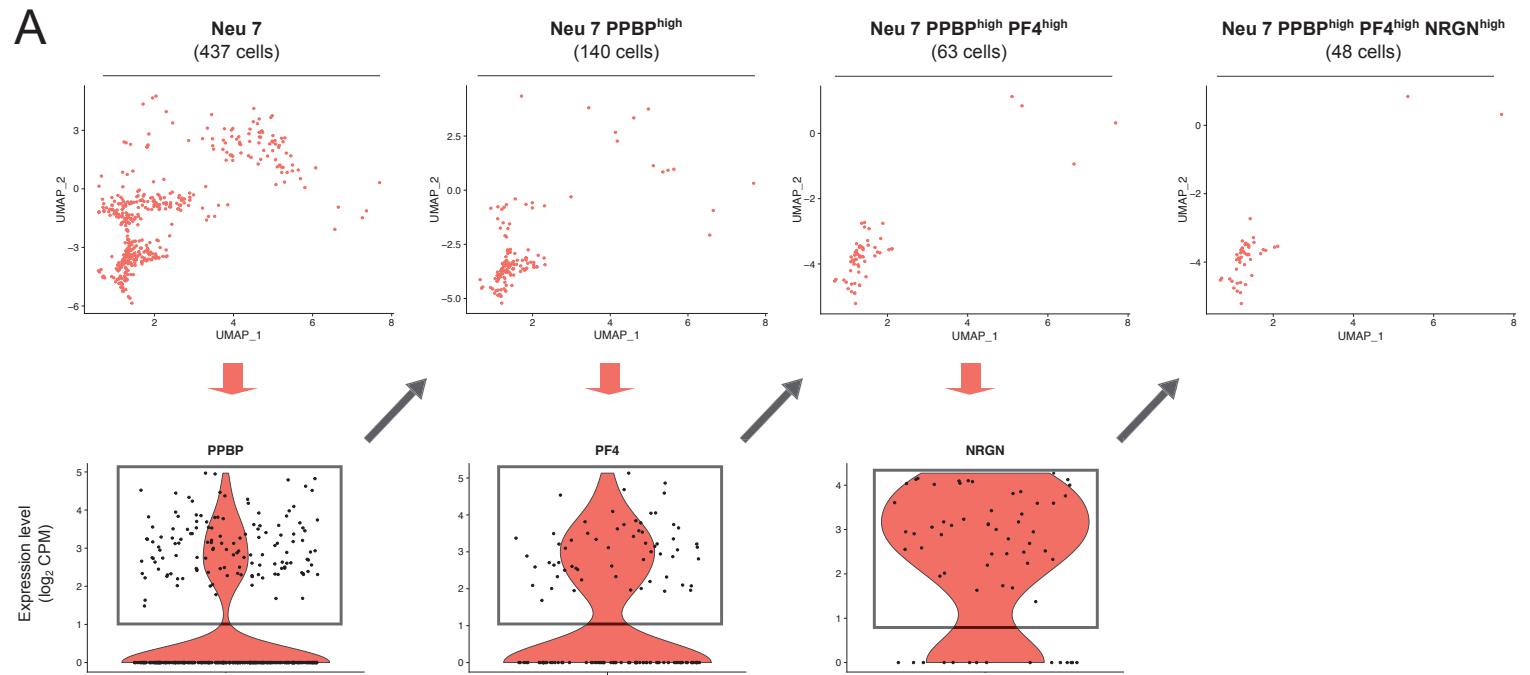
NRGN



637 **Figure 3. Identification of a cluster of neutrophils expressing platelet genes in public**
638 **scRNAseq data from NSCLC patients' peripheral blood leukocytes**

639
640 **(A-B)** Two dimensional-UMAP representation of re-clustered NSCLC patients' whole blood leukocytes
641 from scRNAseq data (GSE127465). **(A)** Major immune cell types were labeled using Zilionis et al.
642 annotation. **(B)** Each of the 11 clusters defined by the analysis were labeled based on the type of
643 immune cell. The 6 clusters of neutrophils were annotated as follow : Neu 0, Neu1, Neu 2, Neu 6, Neu
644 7 and Neu 10. and the platelet cluster (in red). Dark arrows shows Neu 7 neutrophil cluster with high
645 expression of platelet genes. **(C)** Bar plot representing ssGSEA enrichment scores of the Bindea
646 neutrophil signature (Table S2) across all clusters of blood immune cells. **(D)** Bar plot representing
647 ssGSEA enrichment scores of the Raghavachari platelet signature (Table S2) across all clusters of
648 blood immune cells. **(E)** Violin plots representing the \log_2 gene expression (count per million, CPM) of
649 neutrophil-specific genes (*CXCR2*, *CSF3R* and *FCGR3B*) (Table S2) across all clusters of blood
650 immune cells. **(F)** Violin plots representing the \log_2 gene expression (CPM) of platelet-specific genes
651 (*PF4*, *PPBP* and *NRGN*) (Table S3) across clusters of blood immune cells.

652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667

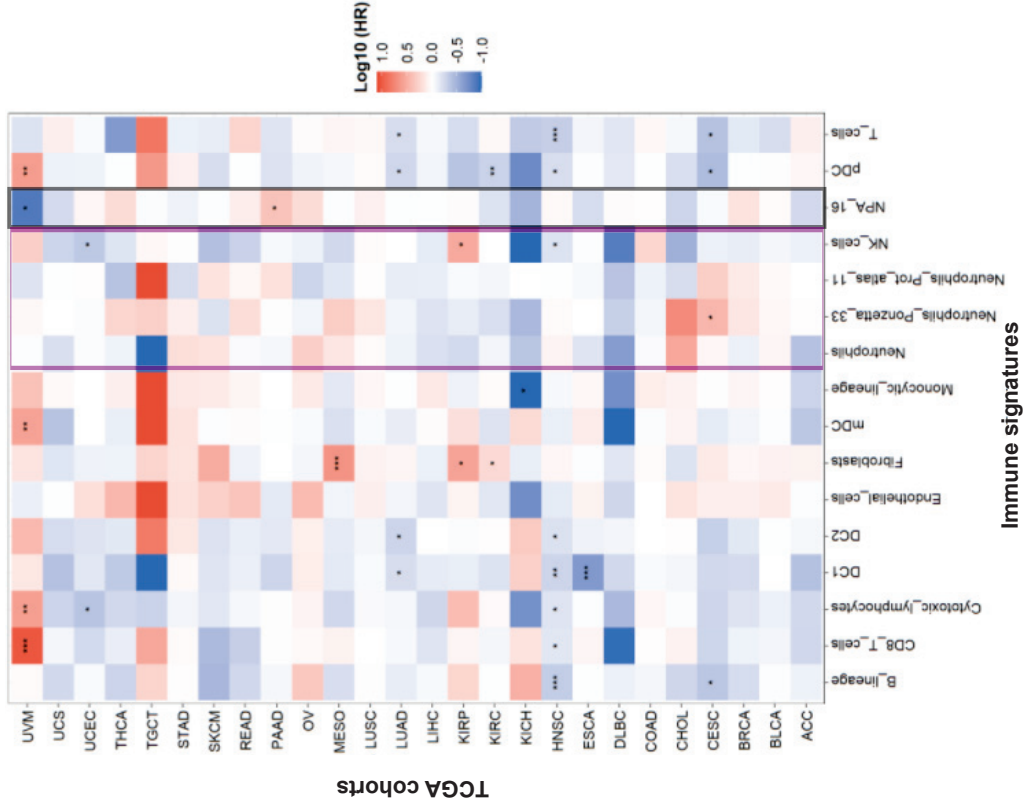


668 **Figure 4. NPA cluster is distinct from the other neutrophil clusters, independently of free**
669 **platelet-related genes.**

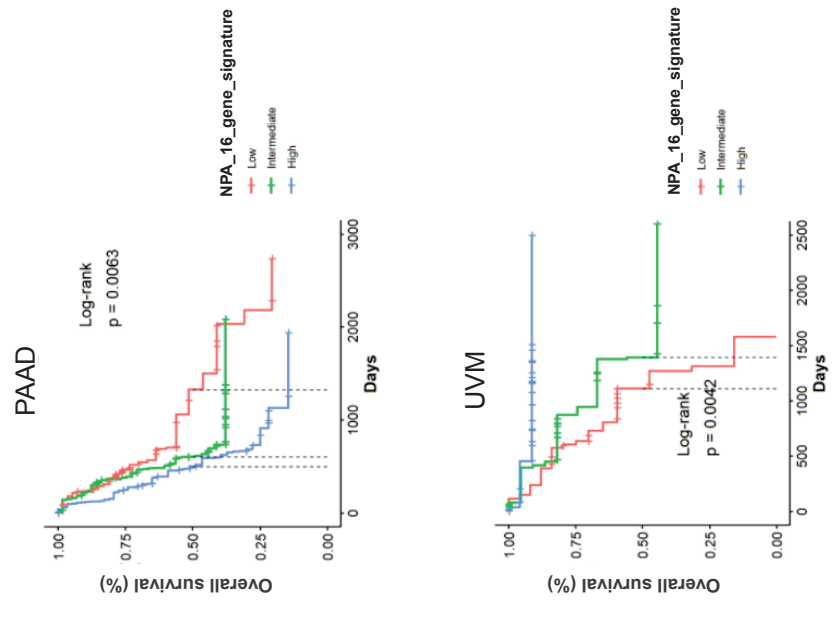
670

671 **(A)** Strategy to make the Neu 7 more homogeneous. The upper lane shows the two dimensional-
672 UMAP projection plots of each individual subset of Neu 7 cells, keeping the same UMAP parameters
673 used to discriminate each individual subsets of leukocytes. The lower lane shows violin plots that
674 represent the \log_2 gene expression (CPM) of platelet-specific genes (*PF4*, *PPBP* and *NRGN*) in a
675 selected subset of cells (bold population name) from Neu 7 cluster. Squares and arrows show the
676 selection process of cells that retain only cells that expressed three platelet specific genes (*PF4*,
677 *PPBP* and *NRGN*) above 1 \log_2 gene expression (CPM). 4 subsets of cells from Neu 7 clusters could
678 have been generated: All Neu 7 cells (“Neu 7”) ; Only Neu 7 cells with a high expression of *PPBP*
679 (“Neu 7 *PPBP*^{high}”) ; Only Neu 7 *PPBP*^{high} cells with a high expression of *PF4* (“Neu 7 *PPBP*^{high}
680 *PF4*^{high}”) ; Only Neu 7 *PPBP*^{high} *PF4*^{high} with a high expression of *NRGN* (Neu 7 *PPBP*^{high} *PF4*^{high}
681 *NRGN*^{high}). For each subsets of cells, number of cells was indicated below the bold population name.
682 **(B)** Differential gene expression approach to get the list of upregulated genes in Neu 7 *PPBP*^{high}
683 *PF4*^{high} *NRGN*^{high} (annotated NPA cluster) as opposed to each individual neutrophil cluster and the
684 other major immune cell types (Monocytes, T cells, B cells/pDC and NK cells). The statistical test used
685 in the differential gene expression analysis was the Wilcoxon rank-sum (Mann–Whitney) test. **(C) Left**
686 **panel:** Venn diagram representing mutually and exclusive upregulated genes in NPA (*PPBP*^{high} *PF4*^{high}
687 *NRGN*^{high} cells) as opposed to each neutrophil cluster (Neu 0, Neu 1, Neu 2, Neu 6 and Neu 10). 72
688 upregulated genes discriminated NPA from each individual remaining neutrophil clusters. **Right panel:**
689 Venn diagram representing mutually and exclusive upregulated genes in NPA (*PPBP*^{high} *PF4*^{high}
690 *NRGN*^{high} cells) as opposed to the non-neutrophil major immune cell types (Monocytes, T cells, B
691 cells/pDC and NK cells). Out of the 72 upregulated genes, 46 upregulated genes (named “46 NPA
692 specific genes”) discriminated NPA from each individual non-neutrophil major immune cell types. **(D)**
693 Venn diagram representing mutually and exclusive upregulated genes between the “46 NPA specific
694 genes” and the genes expressed by free platelets (Table S3). NPA cells in contrast to free platelets
695 exclusively expressed 16 genes (corresponding to the “16_gene_NPA_signature”). **(E)** Violin plot
696 representing the MCP counter score of the 16_gene_NPA_signature for each cluster of neutrophils as
697 well as the other major immune cells types. NPA cluster correspond to Neu 7 *PPBP*^{high} *PF4*^{high}
698 *NRGN*^{high} cells.

A Multivariate analysis of the prognostic values of immune signatures across TCGA



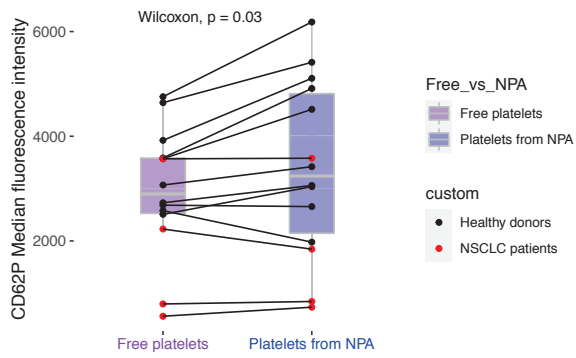
B



699 **Figure 5. Specific NPA gene signature is associated with either a worse or a better prognosis**
700 **depending on tumor type.**
701
702 (A) Differential gene expression approach to get the list of upregulated genes in Neu 7 PPBP^{high}
703 PF4^{high} NRG1^{high} (annotated NPA cluster) as opposed to each individual non-neutrophil clusters
704 (Monocytes, T cells, B cells/pDC and NK cells). The statistical test used in the differential gene
705 expression analysis was the Wilcoxon rank-sum (Mann–Whitney) test. (B) Venn diagram representing
706 mutually and exclusive upregulated genes in NPA (PPBP^{high} PF4^{high} NRG1^{high} cells) as opposed to
707 each individual non-neutrophil clusters (Monocytes, T cells, B cells/pDC and NK cells) but also non-
708 NPA neutrophil clusters (by adding the previously generated “24 gene NPA signature”). 16
709 upregulated genes (named “16 gene NPA signature”) discriminated NPA from any other cluster of
710 blood leukocytes in NSCLC patients (Table S5). (C) Violin plot representing the MCP counter score
711 per cell for each cluster of neutrophils. NPA cluster correspond to Neu 7 PPBP^{high} PF4^{high} NRG1^{high}
712 cells. (D) Heatmap summarizing results of the multivariate analysis of prognostic values of various
713 immune signatures across all available TCGA cohorts. Y axis correspond to TCGA cohort. Each line
714 corresponds to a particular cancer type annotated with the TCGA short name. X axis corresponds to
715 immune signatures including the “16 gene NPA signature”. HR corresponds to the hazard ratio
716 expressed in log₁₀. * refers to a adjusted p-value < 0.05. Black rectangle corresponds to the “16 gene
717 NPA signature” whereas purple rectangle corresponds to the conventional neutrophil signatures. (E)
718 Univariate survival analysis in pancreatic (PAAD) and uveal melanoma (UVM) cancer patients using
719 Kaplan Meier method. For each cancer type, cohort of patient was evenly split into three groups based
720 on the mean expression of the 16 gene NPA signature.

721

722



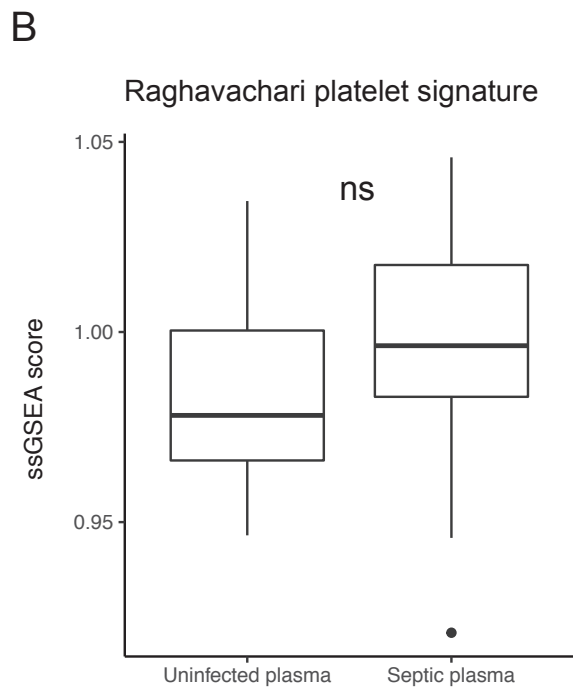
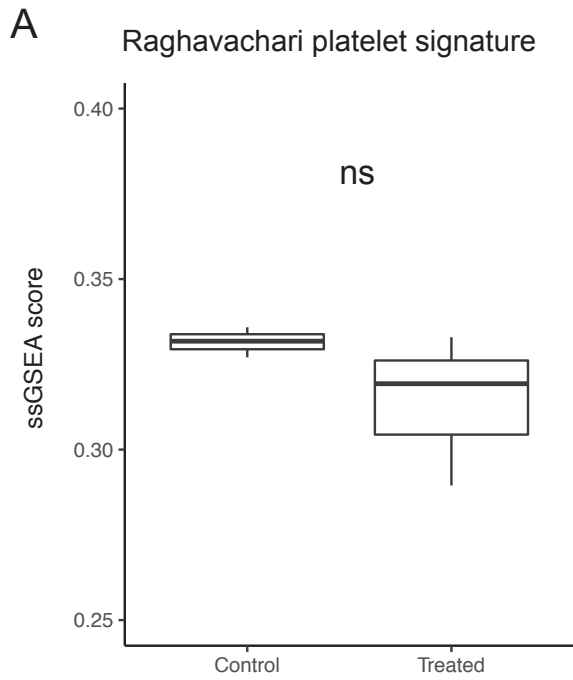
724

725

726 **Figure S1. CD62P median fluorescence intensity in platelet from NPA as compared to free**
 727 **platelet**

728 Box plot representing the median fluorescence intensity (MFI) of CD62P marker of platelet from non-
 729 coincidental NPA compared with platelet from co-incident NPA, termed “free platelet” (see Materials
 730 and Methods). Difference of MFI between the two different conditions was assessed by the paired
 731 Wilcoxon rank-sum (Mann–Whitney) statistical test.

732



733

734 **Figure S2. Enrichment analysis of platelet signatures in stimulated versus unstimulated**
 735 **neutrophils.**

736 **(A)** Box plot representing ssGSEA enrichment scores of two independent platelet signatures
 737 Raghavachari platelet signature (Table S2) in GM-CSF-treated neutrophils (“treated”) versus
 738 untreated neutrophils (“Control”). Blood from 3 HDs were used for each group (GSE15139).
 739 Differential enrichment of platelet signature between “treated” and “control” groups was assessed by
 740 the Wilcoxon rank-sum (Mann–Whitney) statistical test (p-value = 0.4). **(B)** Box plot representing
 741 ssGSEA enrichment scores of the Raghavachari platelet signature (Table S2) in neutrophils treated

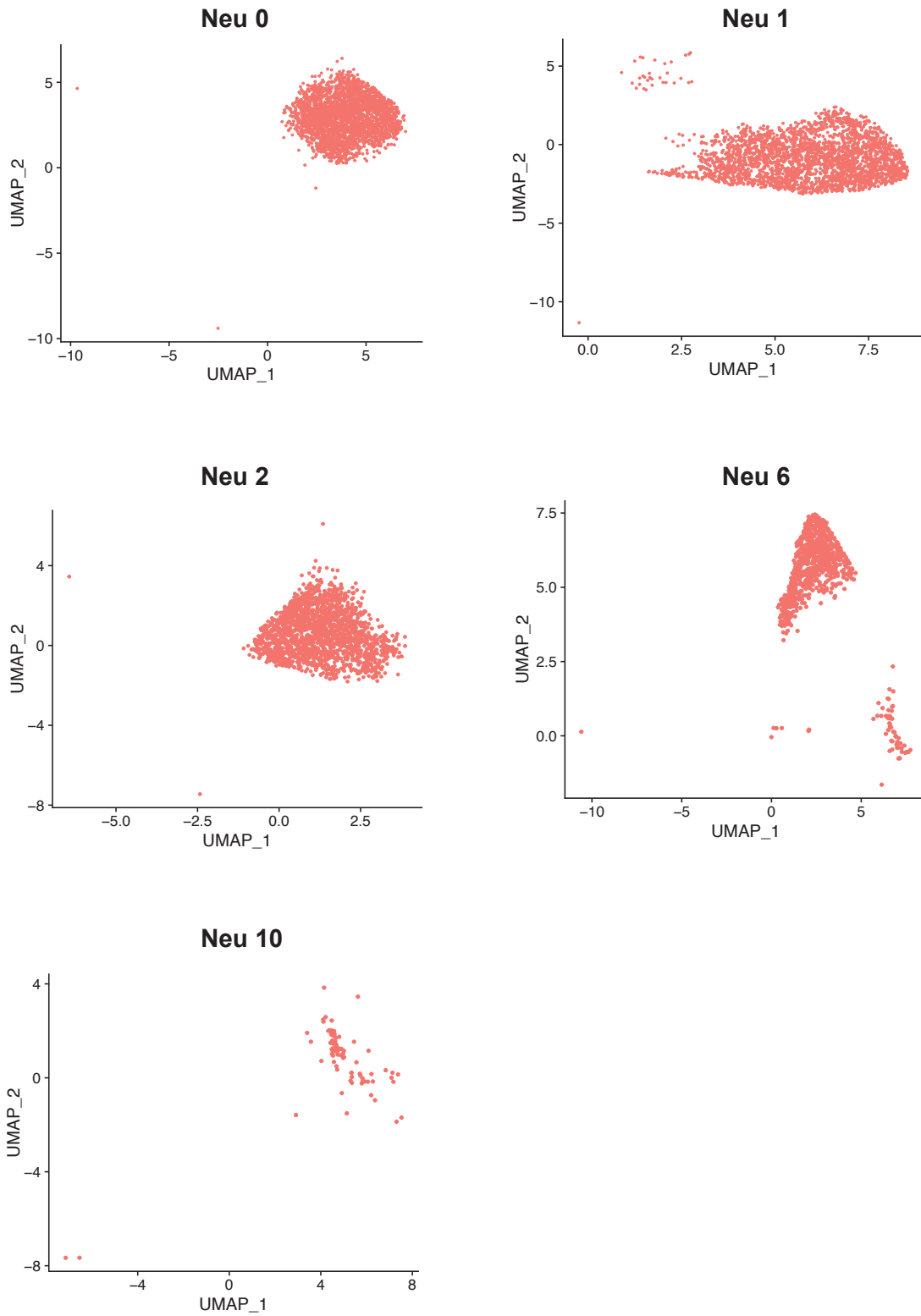
742 either with plasma from septic patients (“Septic plasma”, n = 35) or from HDs (“Uninfected plasma”,
743 n=19) (GSE49757). Differential enrichment of platelet signature between “Septic plasma” and
744 “Uninfected plasma” groups was assessed by the Wilcoxon rank-sum (Mann–Whitney) statistical test
745 (p-value = 0.05202).

746

747

748

749



750

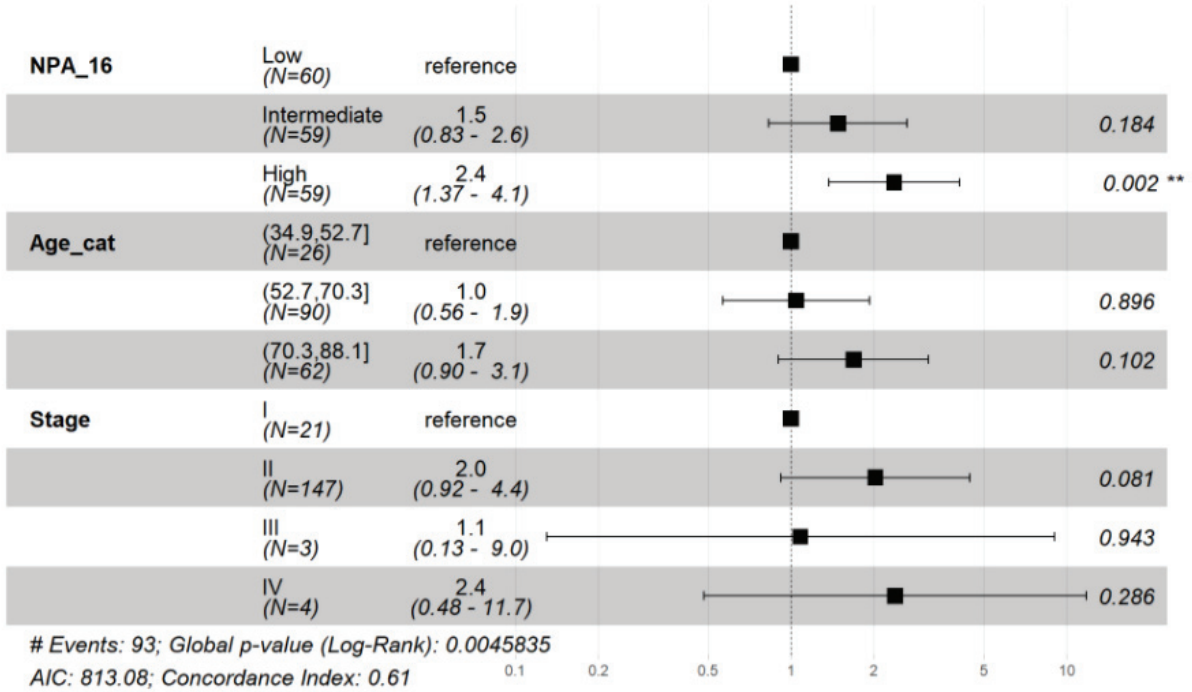
751

752 **Figure S3. Two dimensional-UMAP representation of each neutrophil cluster**

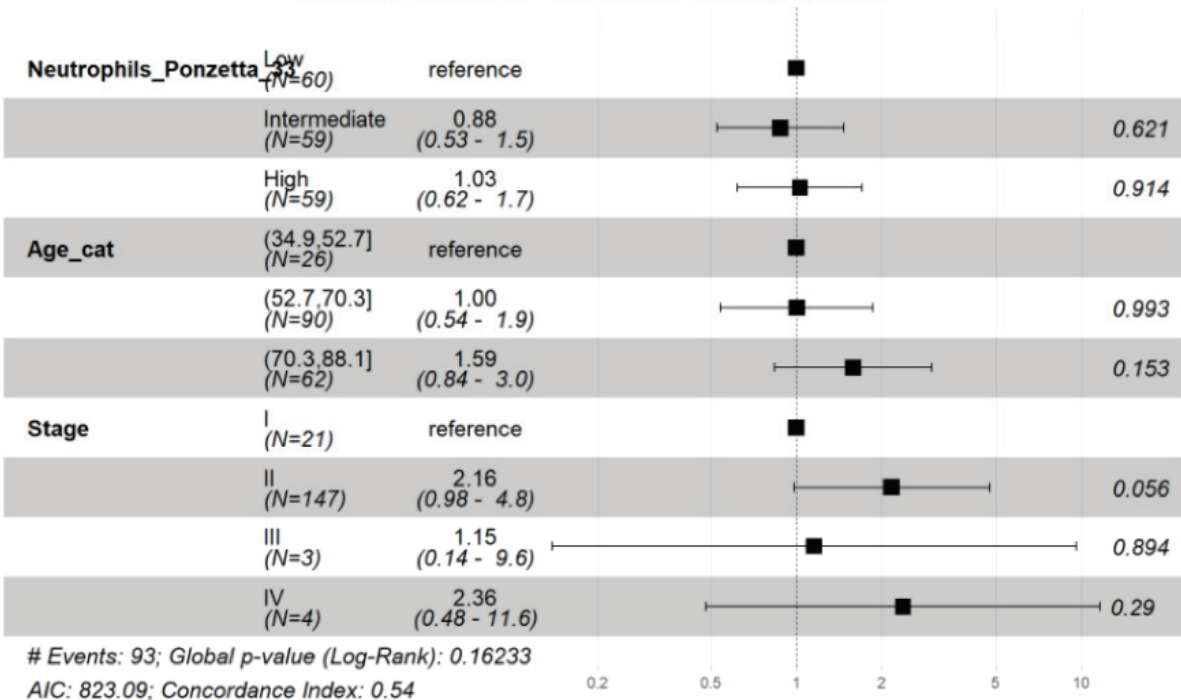
753 Neutrophil clusters were re-projected based on UMAP parameters used to discriminate each individual

754 subset of leukocytes.

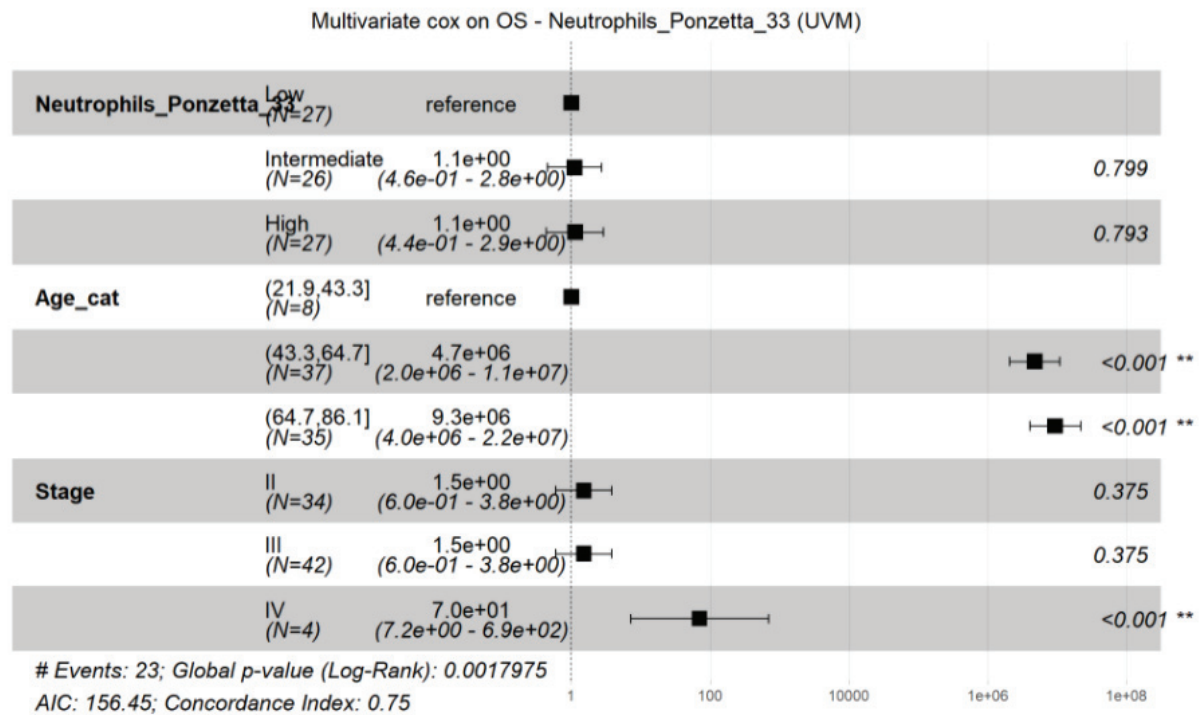
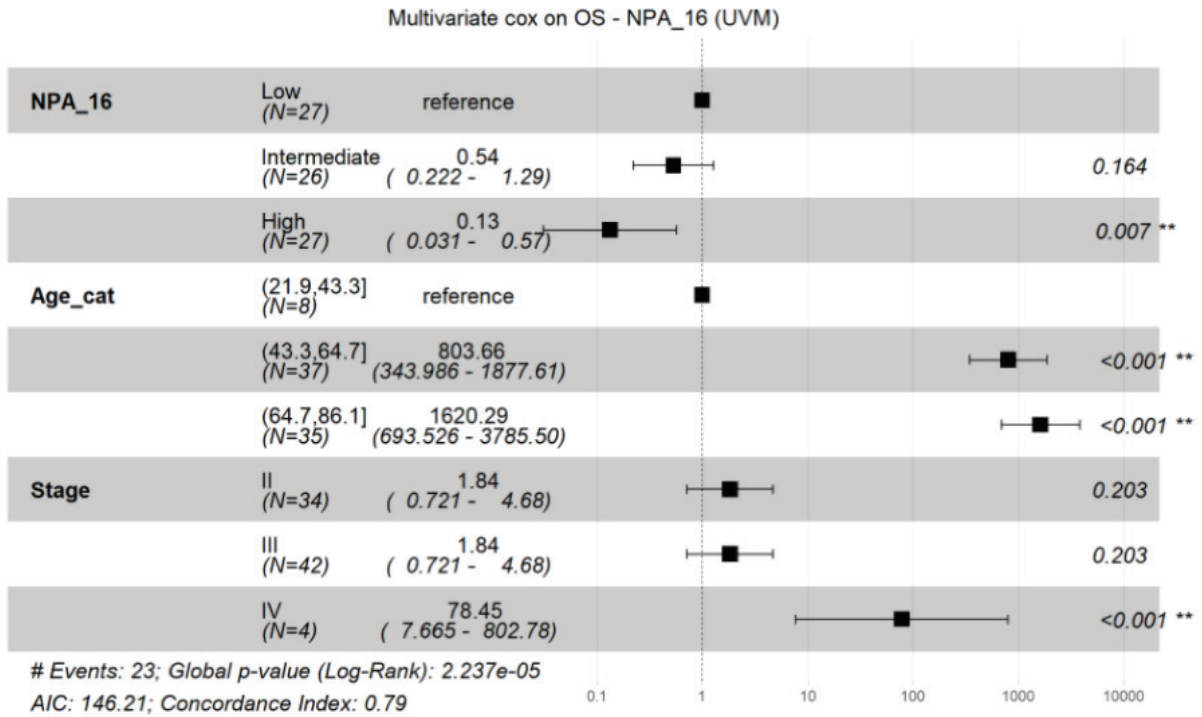
Multivariate cox on OS - NPA_16 (PAAD)



Multivariate cox on OS - Neutrophils_Ponzetta_33 (PAAD)



755
756



757
758

759 Figure S4. Multivariate analysis (Forest plot) of the prognostic impact of the 16 gene NPA
760 signature and the Ponzetta neutrophil signature.

761 **Supplemental tables**

762

763 **Table S1. Clinical features of NSCLC patients.**

764

765

766

Age at diagnosis	Sex	Histology	Anti-platelet treatments	PD-L1 expression	Mutations	Metastatic site at diagnosis
73	Male	Lung adenocarcinoma	RESITUNE 75	100%	KRAS G12V	Lung, Lymph node
54	Male	Lung adenocarcinoma	none	90%	No mutation	Lymph node, Adrenal Gland
50	Male	Lung adenocarcinoma	none	100%	BRAF G469L	Lung, Lymph node, Bone
49	Female	Lung adenocarcinoma	none	50%	Unknown	Lung, Lymph node, Pulmonary pleura, Brain

767

768

769

770 **Table S2. Published platelet and neutrophil specific signatures**

771

772

773

Geneset name	RAGHAVACHARI_PLATELET _SIGNATURE	BINDEA_NEUTROPHILS _SIGNATURE
PMID number	17353439	24138885
Description	Genes in this set correspond to the most abundant and specific transcripts in blood platelets.	Genes in this set correspond to the most specific transcripts of blood neutrophils compared with the other blood immune cell types
Genes	APP	CSF3R
	ASAH1	ALPL
	BEX3	BST1
	CCL5	CD93
	CTSA	CEACAM3
	CTTN	CPPED1
	CXCL5	CREB5
	DAPP1	CRISPLD2
	EIF2AK1	CXCR1
	ENDOD1	CXCR2
	F13A1	CYP4F3
	FHL1	DYSF
	GLA	FCAR
	GNAS	FCGR3B
	GNG11	FPR1
	HBA1	FPR2
	HBB	G0S2
	HBG1	HIST1H2BC
	HIST1H2AC	HPSE
	HIST1H3H	KCNJ15
	HIST2H2BE	LILRB2
	ITGA2B	MGAM
	ITGB3	MME
	ITGB5	PDE4B
	KIF2A	S100A12
	LEPROT	SIGLEC5
	MAP3K7CL	SLC22A4
	MAX	SLC25A37
	MFAP3L	TECPR2
	MLH3	TNFRSF10C
	MMD	VNN3
	MPP1	

774

775

776

MYLK	
NAP1L1	
NRGN	
ODC1	
PDLIM1	
PF4	
PF4V1	
PGRMC1	
PIP4K2A	
PPBP	
PPM1A	
PRDX6	
PRKAR2B	
PRKCB	
PRUNE1	
PTGS1	
PTPN12	
RAB31	
RABGAP1L	
RGS10	
RNF11	
RSU1	
RUFY1	
RYBP	
SNCA	
SNN	
SPARC	
TAX1BP3	
THBS1	
TMEM140	
TNFSF4	
TPM1	
TSC22D1	
TUBA4A	
TUBB2A	
VCL	
WIPF1	
YPEL5	
ZNF185	

778

779

780

781

782

783

784 **Table S3. List of upregulated genes in free platelet cluster as compared to all other leukocytes**

785

786

787

788

Genes	p_val	avg_logFC	pct.1	pct.2	p_val_adj
PF4	0	5.03979755	0.98	0.016	0
PPBP	0	4.83755369	0.949	0.018	0
TUBB1	0	4.40058001	0.99	0.007	0
NRGN	0	4.28797529	0.99	0.045	0
MPIG6B	0	4.17736326	0.909	0.012	0
F13A1	0	3.92354216	0.889	0.036	0
ACRBP	0	3.72420798	0.717	0.009	0
CAVIN2	0	3.57319985	0.879	0.007	0
SPARC	0	3.44701728	0.859	0.01	0
CLU	0	3.33259635	0.768	0.027	0
TSC22D1	0	3.21468788	0.646	0.016	0
ITGA2B	0	3.16700987	0.697	0.014	0
PRKAR2B	0	3.16104446	0.697	0.007	0
GP9	0	3.13948159	0.727	0.002	0
GRAP2	0	3.10796079	0.707	0.026	0
MYL9	0	3.02233724	0.596	0.006	0
SH3BGRL2	0	2.79782836	0.545	0.004	0
CDKN1A	0	2.79549871	0.485	0.013	0
PDLIM1	0	2.73260588	0.485	0.012	0
PTCRA	0	2.70933332	0.556	0.001	0
PTGS1	0	2.68549585	0.545	0.012	0
CMTM5	0	2.66502995	0.505	0.003	0
TMEM40	0	2.6311536	0.535	0.005	0
TREML1	0	2.59846537	0.495	0.005	0
SEPT5	0	2.56925587	0.646	0.013	0
CTDSPL	0	2.56249723	0.475	0.006	0
MMD	0	2.5544219	0.556	0.009	0
BEX3	0	2.49623349	0.525	0.013	0
HIST1H3H	0	2.49295189	0.354	0.003	0
C2orf88	0	2.46179816	0.475	0.004	0
PF4V1	0	2.42373335	0.515	0.003	0
ALOX12	0	2.37249693	0.343	0.001	0
AL160400.1	0	2.35690005	0.374	0.006	0
PDZK1IP1	0	2.32075184	0.404	0.003	0
CD9	0	2.29848748	0.394	0.005	0
SMOX	0	2.27498325	0.424	0.002	0
ITGB5	0	2.24407327	0.374	0.005	0
ESAM	0	2.18108013	0.343	0.003	0
GNG11	0	2.12929342	0.414	0.004	0
LTBP1	0	2.12316106	0.343	0.004	0
GMPR	0	2.10954251	0.354	0.004	0

789

790

791

792

CTTN	0	2.07545163	0.333	0.005	0
AQP10	0	1.95266331	0.283	0.001	0
GNAZ	0	1.93315281	0.333	0.003	0
SELP	0	1.92690601	0.313	0.004	0
TSPEAR-AS2	0	1.88975163	0.343	0.002	0
PEAR1	0	1.88849564	0.303	0.003	0
TSPAN33	0	1.85647482	0.333	0.003	0
LGALS12	0	1.8276617	0.273	0.002	0
AP001189.1	0	1.80554389	0.343	0.003	0
ABLIM3	0	1.76396489	0.273	0.003	0
HIST1H2BJ	0	1.76015655	0.283	0.002	0
CLDN5	0	1.75130566	0.263	0.003	0
TUBA8	0	1.63913189	0.273	0.002	0
MTURN	2.07E-288	3.01383934	0.697	0.031	6.92E-284
EHD3	1.04E-281	1.68594669	0.273	0.004	3.46E-277
TAL1	7.51E-274	1.70871142	0.253	0.003	2.51E-269
CLEC1B	5.45E-259	2.10071069	0.323	0.006	1.82E-254
MFAP3L	2.34E-250	1.61502029	0.283	0.005	7.82E-246
DAB2	1.34E-249	2.34660462	0.424	0.012	4.48E-245
ODC1	6.09E-234	2.48615062	0.525	0.021	2.03E-229
FHL1	7.86E-231	1.95601325	0.354	0.009	2.63E-226
MAP3K7CL	1.97E-222	2.6408813	0.485	0.019	6.58E-218
ELOVL7	1.14E-220	1.66860566	0.253	0.004	3.82E-216
GPX1	1.92E-212	3.38648836	0.909	0.083	6.43E-208
GAS2L1	2.62E-210	1.95375068	0.364	0.011	8.76E-206
PGRMC1	3.13E-208	2.30981918	0.465	0.019	1.04E-203
RUFY1	2.88E-202	2.78257864	0.636	0.038	9.63E-198
MARCH2	2.39E-200	2.45606339	0.606	0.035	7.98E-196
LMNA	4.46E-200	2.05387065	0.374	0.012	1.49E-195
SNCA	8.87E-197	1.87586535	0.293	0.007	2.97E-192
DMTN	4.81E-194	1.65236909	0.263	0.006	1.61E-189
RAB27B	8.80E-194	2.63271623	0.364	0.012	2.94E-189
ENDOD1	4.03E-168	2.02033365	0.333	0.011	1.35E-163
LGALSL	1.25E-156	1.88840065	0.283	0.009	4.17E-152
RGS10	2.42E-156	2.75998866	0.677	0.059	8.09E-152
NEXN	3.60E-155	2.17306108	0.293	0.01	1.20E-150
PCSK6	1.32E-150	1.51731989	0.263	0.008	4.42E-146
LINC00608	4.08E-148	2.14177674	0.414	0.021	1.36E-143
ZNF185	9.07E-146	2.07498981	0.384	0.018	3.03E-141
FAXDC2	9.27E-145	2.23020601	0.556	0.04	3.10E-140
ARHGAP18	3.36E-143	1.67911961	0.343	0.015	1.12E-138
VCL	1.88E-136	3.34746308	0.879	0.127	6.27E-132

YWHAH	3.81E-130	2.44095425	0.576	0.049	1.27E-125
SLA2	9.21E-126	2.17654942	0.384	0.021	3.08E-121
HIST1H2AC	4.76E-122	2.60977611	0.808	0.108	1.59E-117
THBS1	1.55E-121	2.19485124	0.343	0.018	5.18E-117
CTSA	4.47E-119	2.6297131	0.778	0.107	1.49E-114
AC127502.2	2.46E-112	2.2956502	0.404	0.027	8.23E-108
KIF2A	1.64E-109	1.94614946	0.374	0.023	5.48E-105
RGS18	5.01E-109	2.49634058	0.798	0.119	1.67E-104
ILK	1.40E-97	2.07872366	0.495	0.047	4.68E-93
MPP1	3.73E-95	2.38921867	0.657	0.088	1.25E-90
PLA2G12A	1.16E-94	1.86488436	0.414	0.034	3.87E-90
INAFM2	3.33E-94	1.78307568	0.323	0.02	1.11E-89
SMIM3	1.92E-91	1.82356148	0.343	0.024	6.43E-87
STON2	3.61E-90	1.79474786	0.263	0.014	1.21E-85
NCK2	5.71E-90	2.17393574	0.556	0.066	1.91E-85
STOM	2.22E-89	2.30691427	0.535	0.062	7.43E-85
MAX	5.29E-89	2.68261098	0.808	0.157	1.77E-84
NAP1L1	3.66E-84	2.42886834	0.859	0.203	1.22E-79
RNF11	7.29E-82	2.15139184	0.475	0.051	2.44E-77
SCN1B	9.68E-81	1.58495469	0.293	0.019	3.23E-76
PARVB	1.77E-80	1.7462293	0.313	0.022	5.92E-76
TUBA4A	3.02E-80	2.00378286	0.758	0.141	1.01E-75
CCL5	4.58E-80	2.1751463	0.808	0.173	1.53E-75
LIMS1	3.81E-75	2.55261409	0.778	0.178	1.27E-70
GSTO1	1.24E-74	2.35679149	0.505	0.065	4.16E-70
UBL4A	1.53E-74	1.90131204	0.313	0.024	5.12E-70
ANO6	2.40E-74	1.83992719	0.354	0.031	8.03E-70
PTPN18	1.54E-71	2.26735466	0.576	0.09	5.13E-67
TPM4	1.17E-69	2.49735737	0.727	0.161	3.91E-65
TUBA1C	2.97E-69	2.12226326	0.303	0.024	9.93E-65
TUBA4B	8.87E-69	1.80803199	0.475	0.059	2.96E-64
TLN1	5.76E-68	2.48553629	0.909	0.315	1.93E-63
MYLK	1.29E-67	2.10613659	0.434	0.052	4.32E-63
BCL2L1	6.64E-67	1.70726965	0.313	0.027	2.22E-62
OST4	2.27E-66	2.32911503	0.737	0.173	7.57E-62
FLNA	9.37E-60	2.22343016	0.848	0.279	3.13E-55
NORAD	1.27E-59	2.40652421	0.636	0.135	4.24E-55
FERMT3	4.20E-57	2.14134388	0.636	0.14	1.40E-52
PRUNE1	6.57E-54	1.40165387	0.263	0.023	2.19E-49
NT5C3A	2.50E-51	1.92951734	0.444	0.069	8.36E-47
RAB32	1.37E-50	1.81434283	0.404	0.058	4.57E-46
EIF2AK1	1.23E-49	1.92788693	0.374	0.051	4.09E-45

794
795
796
797
798
799
800

CCDC92	3.66E-49	1.55397018	0.273	0.027	1.22E-44
HIST2H2BE	3.38E-48	1.78399979	0.263	0.026	1.13E-43
H2AFJ	9.45E-45	1.68762366	0.273	0.03	3.16E-40
GNAS	2.08E-44	1.88099258	0.909	0.441	6.93E-40
GFI1B	4.93E-44	1.54580013	0.283	0.033	1.65E-39
CD226	4.96E-44	1.96566253	0.545	0.12	1.66E-39
CALM3	1.36E-43	1.93457392	0.687	0.208	4.53E-39
NCOA4	1.11E-41	1.79965876	0.838	0.348	3.71E-37
OAZ1	3.67E-41	1.46916959	0.949	0.692	1.23E-36
PRDX6	3.33E-40	1.7383458	0.394	0.067	1.11E-35
MGAT4B	6.57E-40	1.54796265	0.313	0.044	2.20E-35
PIP4K2A	7.34E-40	1.89867366	0.495	0.107	2.45E-35
MGLL	7.72E-40	1.5794188	0.283	0.036	2.58E-35
PKM	2.16E-39	1.92727968	0.566	0.147	7.20E-35
MAPRE2	6.06E-39	1.69607562	0.384	0.066	2.02E-34
RSU1	1.84E-38	2.03949499	0.465	0.1	6.13E-34
ARHGAP21	1.89E-38	1.5503418	0.263	0.032	6.32E-34
SNN	3.48E-38	1.60560581	0.434	0.085	1.16E-33
RAP1B	7.99E-37	2.04520431	0.737	0.307	2.67E-32
TPST2	5.11E-36	1.86978081	0.465	0.105	1.71E-31
PLEKHO1	2.84E-35	1.8509922	0.535	0.14	9.49E-31
LDLRAP1	6.44E-35	1.58858529	0.323	0.053	2.15E-30
CAPN1	7.44E-35	1.6031836	0.404	0.082	2.48E-30
TAGLN2	1.13E-31	1.29909061	0.879	0.515	3.76E-27
TGFB1	1.27E-31	1.35345735	0.263	0.038	4.26E-27
SH3BGRL3	6.61E-31	1.4214975	0.879	0.615	2.21E-26
ETFA	1.04E-30	2.01578076	0.414	0.096	3.46E-26
PYCR2	3.93E-30	2.04635573	0.323	0.06	1.31E-25
MFSD1	1.18E-29	1.46440923	0.323	0.06	3.94E-25
MTPN	1.22E-29	1.56671148	0.636	0.237	4.08E-25
DAPP1	4.29E-29	1.49530671	0.444	0.11	1.43E-24
CDK2AP1	7.12E-29	1.83910661	0.273	0.045	2.38E-24
TPM1	8.97E-29	1.55491247	0.364	0.077	3.00E-24
TIMP1	1.17E-28	1.71130529	0.495	0.139	3.90E-24
ADIPOR1	2.23E-27	1.50497872	0.444	0.113	7.46E-23
GPX4	5.22E-27	1.67584421	0.404	0.1	1.75E-22
CMIP	1.85E-26	1.58051788	0.525	0.17	6.19E-22
TMSB4X	2.78E-26	0.97813164	0.99	0.956	9.29E-22
MYL12A	3.11E-26	1.40292233	0.758	0.424	1.04E-21
RBBP6	1.28E-25	1.47210808	0.303	0.06	4.26E-21
RAB11A	2.41E-25	1.61814498	0.374	0.088	8.04E-21
CYB5R3	3.84E-25	1.57745233	0.354	0.083	1.28E-20

801
802
803
804
805
806
807

LAMTOR1	6.99E-25	1.56900076	0.485	0.151	2.34E-20
ITGB1	9.59E-25	1.83431176	0.475	0.147	3.20E-20
CARD19	5.32E-24	1.6004179	0.303	0.064	1.78E-19
DYNLL1	1.62E-23	1.89457182	0.374	0.099	5.41E-19
CCND3	2.10E-23	1.51751824	0.566	0.223	7.01E-19
CORO1C	6.43E-23	1.63722415	0.273	0.053	2.15E-18
ACTB	7.28E-23	0.87397539	0.949	0.948	2.43E-18
WBP2	1.56E-22	1.38091639	0.475	0.148	5.20E-18
TLK1	2.18E-22	1.42935826	0.263	0.051	7.29E-18
UQCRH	3.51E-22	1.5913047	0.364	0.096	1.17E-17
PTPN12	4.72E-22	1.53879409	0.444	0.136	1.58E-17
TMEM140	7.22E-22	1.19491524	0.333	0.077	2.41E-17
CD99	9.77E-22	1.72261	0.475	0.168	3.26E-17
RAP2B	2.33E-21	1.96024408	0.343	0.09	7.77E-17
MYL6	2.32E-20	1.43711403	0.707	0.422	7.77E-16
SNRPN	1.52E-19	1.36704255	0.263	0.058	5.09E-15
MYH9	1.73E-19	1.0633443	0.788	0.476	5.78E-15
PTPRJ	2.99E-19	1.39132909	0.333	0.088	9.98E-15
SLC40A1	5.82E-19	1.45235719	0.313	0.08	1.95E-14
SPINT2	6.60E-19	1.39068667	0.303	0.076	2.20E-14
F11R	6.92E-19	1.28212326	0.283	0.065	2.31E-14
WDR1	2.49E-18	1.35065871	0.535	0.224	8.31E-14
PDCD10	5.29E-18	1.19316436	0.253	0.056	1.77E-13
APP	9.84E-17	1.50000193	0.253	0.061	3.29E-12
MT-RNR2	7.61E-16	0.5489767	1	0.991	2.54E-11
RAB37	9.31E-16	1.22746106	0.283	0.075	3.11E-11
SERF2	4.56E-15	1.20572137	0.667	0.398	1.52E-10
HACD4	5.56E-15	1.10739116	0.303	0.088	1.86E-10
STK24	1.08E-14	1.4524173	0.354	0.121	3.62E-10
KCTD20	1.64E-14	1.14967266	0.343	0.113	5.48E-10
GSN	4.35E-14	1.14051089	0.374	0.132	1.45E-09
ARPC1B	4.75E-14	1.15155586	0.727	0.491	1.59E-09
CDKN2D	6.06E-14	1.17265665	0.444	0.182	2.02E-09
CERS2	7.56E-14	1.08683616	0.273	0.079	2.53E-09
TMBIM1	9.08E-14	1.41420718	0.364	0.132	3.03E-09
AMD1	9.53E-14	0.93367395	0.253	0.067	3.18E-09
ABCC3	9.72E-14	1.13675535	0.283	0.083	3.25E-09
H3F3A	1.49E-13	0.48022917	1	0.91	4.98E-09
DIAPH1	2.19E-13	1.29637011	0.364	0.139	7.33E-09
HLA-E	4.45E-13	0.58156492	0.929	0.873	1.49E-08
ARF1	5.34E-13	1.0597722	0.556	0.288	1.78E-08
MT-ND2	8.32E-13	0.83460301	0.788	0.585	2.78E-08

808

809

810

811

812

813

RASA3	1.08E-12	1.09017019	0.253	0.074	3.62E-08
MT-ND1	1.51E-11	0.70215757	0.919	0.719	5.05E-07
TUBA1B	2.15E-11	1.08399274	0.354	0.14	7.20E-07
SH3BGRL	3.44E-11	1.26035437	0.343	0.137	1.15E-06
RAB1B	4.12E-11	1.36350121	0.273	0.093	1.38E-06
NFE2	4.49E-11	1.02677597	0.273	0.089	1.50E-06
MT-RNR1	1.03E-10	0.50557512	0.97	0.869	3.43E-06
ASAP1	2.12E-10	1.0449773	0.374	0.156	7.08E-06
PTP4A2	3.01E-10	1.13872401	0.556	0.321	1.01E-05
SNAP23	4.13E-10	1.26969928	0.323	0.129	1.38E-05
MT-ATP6	5.14E-10	0.4389576	0.949	0.666	1.72E-05
YWHAZ	7.24E-10	1.16084731	0.586	0.395	2.42E-05
GAPDH	7.84E-10	0.91187195	0.596	0.397	2.62E-05
MTRNR2L12	8.24E-10	0.52449487	0.929	0.918	2.75E-05
BIN2	9.50E-10	1.04376343	0.515	0.297	3.17E-05
AP2M1	1.09E-09	1.22569339	0.313	0.129	3.65E-05
SQSTM1	1.77E-09	1.10082275	0.364	0.165	5.91E-05
USF2	3.43E-09	1.2305219	0.273	0.106	0.00011466
EMC3	3.83E-09	1.15585623	0.293	0.12	0.00012783
PPP3R1	1.19E-08	1.05906159	0.263	0.098	0.00039822
MBNL1	2.81E-08	1.26909454	0.434	0.258	0.00093888
MT-ND4	3.71E-08	0.44614602	0.889	0.674	0.00124065
TRAPPC1	5.74E-08	0.91408767	0.313	0.144	0.00191848
HDGF	6.09E-08	1.282589	0.253	0.102	0.00203489
YPEL5	1.61E-07	1.06032505	0.343	0.162	0.0053785
GNAQ	1.81E-07	1.04763685	0.333	0.163	0.00603551
ACTN1	2.84E-07	0.87926899	0.495	0.296	0.00949973
PPDPF	3.20E-07	1.24773103	0.283	0.135	0.01069027
CAPNS1	4.17E-07	1.17674974	0.343	0.182	0.01391873
TPM3	7.77E-07	0.80454014	0.515	0.341	0.02595365
HMGB1	8.44E-07	1.03782295	0.515	0.358	0.02819479
WIPF1	8.70E-07	0.67345247	0.576	0.42	0.02906959
RAB8A	9.14E-07	1.04179475	0.263	0.119	0.03054299
EIF4G2	9.26E-07	0.84162952	0.444	0.278	0.03093416
ZYX	9.62E-07	0.6359983	0.535	0.354	0.03214706
IQGAP2	1.12E-06	0.94062502	0.283	0.13	0.03727738
MT-CYB	1.25E-06	0.41439139	0.747	0.519	0.04166832
UCP2	1.35E-06	0.8686212	0.343	0.184	0.04521116
MT-CO1	2.15E-06	0.2932858	0.788	0.485	0.07171666
DNAJB6	2.52E-06	1.11341721	0.283	0.137	0.08403642
TPP1	2.72E-06	1.09492541	0.283	0.141	0.09079002
RASGRP2	4.98E-06	0.86755628	0.263	0.124	0.16636981

815

816

817

818

819

PTMA	5.97E-06	0.65629506	0.515	0.341	0.19937986
ACTG1	9.06E-06	0.75263988	0.636	0.536	0.30275432
R3HDM4	1.21E-05	0.88471077	0.293	0.146	0.40389714
PLEK	8.27E-05	0.98226213	0.404	0.275	1
PRKCB	0.00010744	0.73484355	0.485	0.343	1
PARK7	0.00012374	0.67070179	0.283	0.158	1
MOB1A	0.00012953	0.85324536	0.313	0.189	1
CAPZB	0.00015025	0.57860303	0.495	0.363	1
TMEM50A	0.00015275	0.69283192	0.283	0.157	1
SLC44A2	0.00017842	0.56475722	0.384	0.231	1
MT-ND5	0.00077769	0.53439094	0.556	0.415	1
MT-ND3	0.00093546	0.26624237	0.818	0.6	1
ARL6IP5	0.00107144	0.89181296	0.283	0.185	1
UBB	0.00327809	0.68797496	0.414	0.309	1
CAPZA2	0.0041092	0.61106751	0.364	0.257	1
FXD5	0.00557077	1.09820435	0.273	0.19	1
SAT1	0.00557599	0.38053929	0.556	0.463	1
MTRNR2L8	0.00802828	0.41392619	0.283	0.187	1
FKBP1A	0.03458585	0.47678183	0.323	0.259	1
SEC14L1	0.05757506	0.53549137	0.303	0.235	1
SLC2A3	0.06524097	0.39213344	0.343	0.278	1
ARPC4	0.09999717	0.39259271	0.273	0.216	1
CD63	0.1035943	0.47280239	0.283	0.227	1
CALM1	0.16416131	0.44418735	0.354	0.327	1
RHOA	0.22011357	0.31513415	0.525	0.519	1
ATP6V0E1	0.26091485	0.27615936	0.253	0.217	1
HLA-A	0.2617449	0.29451954	0.747	0.765	1
MT-ND4L	0.32110387	0.633047	0.283	0.262	1
FYB1	0.48641355	0.25085195	0.505	0.496	1
ASAH1	0.54267204	0.51942674	0.293	0.287	1
SRP14	0.82403964	0.46879532	0.222	0.26	1
PPIA	0.87953595	0.27768678	0.303	0.326	1

832
833

Table S4. List of upregulated genes in Neu 7 / NPA cluster as compared to all other leukocytes

	p_val	avg_logFC	pct.1	pct.2	p_val_adj
PPBP	0	1.456431	0.32	0.015	0
PF4	3.24E-294	1.1365725	0.281	0.014	1.08E-289
NRGN	6.33E-270	1.74566267	0.407	0.04	2.12E-265
MT-RNR2	1.34E-48	0.39256475	0.995	0.991	4.48E-44
FTH1	6.43E-37	0.41365379	0.986	0.899	2.15E-32
NAMPT	5.24E-30	0.42028964	0.883	0.61	1.75E-25
FTL	1.12E-28	0.39149955	0.913	0.863	3.74E-24
NEAT1	5.09E-27	0.35154508	0.961	0.825	1.70E-22
MTRNR2L12	2.51E-26	0.33194452	0.952	0.917	8.38E-22
CXCR2	1.44E-25	0.41168116	0.84	0.614	4.81E-21
MT-RNR1	5.12E-25	0.35685659	0.92	0.868	1.71E-20
IFITM2	8.50E-25	0.337618	0.979	0.874	2.84E-20
FCGR3B	8.14E-22	0.43633985	0.744	0.518	2.72E-17
CSF3R	3.71E-21	0.3669319	0.796	0.599	1.24E-16
DUSP1	8.24E-20	0.43707597	0.696	0.516	2.75E-15
RGS2	3.88E-18	0.35703297	0.789	0.603	1.30E-13
OAZ1	7.73E-15	0.36582465	0.764	0.692	2.58E-10
LITAF	3.68E-13	0.28235398	0.815	0.736	1.23E-08
SOD2	6.25E-13	0.26951897	0.741	0.593	2.09E-08
MNDA	1.16E-12	0.31580503	0.659	0.513	3.87E-08
S100A11	1.98E-12	0.29264948	0.769	0.674	6.61E-08
Metazoa-SRP	8.66E-12	0.25196094	0.874	0.86	2.89E-07
YPEL3	2.52E-11	0.47282824	0.508	0.396	8.41E-07
FOS	2.92E-11	0.45989039	0.412	0.279	9.76E-07
TAGLN2	3.86E-11	0.37609061	0.622	0.514	1.29E-06
NCF1	8.25E-11	0.44349149	0.513	0.382	2.76E-06
HLA-E	9.51E-11	0.27166819	0.867	0.874	3.18E-06
FPR1	1.36E-10	0.37046228	0.602	0.483	4.54E-06
RIPOR2	1.93E-10	0.30155153	0.703	0.652	6.46E-06
RTN3	1.97E-10	0.50656653	0.366	0.253	6.57E-06
SLC25A37	2.79E-10	0.30228795	0.622	0.477	9.33E-06
IFITM3	7.12E-10	0.55991834	0.334	0.224	2.38E-05
BASP1	2.33E-09	0.25140776	0.659	0.519	7.80E-05
MMP25	7.05E-09	0.3330728	0.398	0.277	0.00023562
GPSM3	1.74E-08	0.49354672	0.327	0.23	0.0005827
H3F3B	1.82E-08	0.25483962	0.748	0.713	0.00060744
MBOAT7	2.01E-08	0.34092291	0.414	0.299	0.00067269
RAB31	3.27E-08	0.48825888	0.407	0.309	0.00109393
PHC2	3.29E-08	0.38745142	0.405	0.305	0.00109964
LYN	4.10E-08	0.32414819	0.593	0.5	0.00137095
KCTD21-AS1	4.79E-08	0.38389154	0.54	0.466	0.00159878

834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845

TSC22D3	5.32E-08	0.3619371	0.59	0.52	0.00177726
EVI2B	7.01E-08	0.30973319	0.595	0.511	0.0023408
PTRH1	7.67E-08	0.43201941	0.336	0.247	0.00256099
RNASET2	1.48E-07	0.43102506	0.503	0.434	0.00494057
IDH2	1.83E-07	0.50170143	0.318	0.235	0.00610306
S100P	3.60E-07	0.33638472	0.295	0.197	0.01203543
MXD1	3.85E-07	0.28099167	0.476	0.36	0.0128781
USP10	4.71E-07	0.40459903	0.359	0.264	0.01572722
AQP9	1.53E-06	0.30794355	0.352	0.253	0.0510011
TALDO1	2.56E-06	0.29932979	0.535	0.449	0.08547837
CXCR1	2.60E-06	0.38783303	0.405	0.313	0.08689192
CEBPB	4.40E-06	0.34669208	0.533	0.463	0.14712822
LAPTM5	7.06E-06	0.25543543	0.696	0.67	0.23588017
SAT1	8.37E-06	0.25597236	0.54	0.462	0.27975892
MCL1	1.04E-05	0.29022391	0.622	0.59	0.34719968
ABTB1	1.37E-05	0.44476004	0.295	0.219	0.45775874
MSRB1	1.54E-05	0.33405844	0.444	0.358	0.51462849
SDCBP	1.75E-05	0.29185148	0.563	0.496	0.58565316
ACTN1	1.79E-05	0.37936914	0.373	0.295	0.5964775
IRS2	2.28E-05	0.43879031	0.325	0.26	0.76248451
ICAM3	2.33E-05	0.31329714	0.378	0.301	0.78001659
XPO6	2.62E-05	0.31120923	0.364	0.282	0.87395051
CYP4F3	2.75E-05	0.38293186	0.284	0.206	0.91963153
CDA	2.97E-05	0.37840574	0.3	0.227	0.9915553
SLC11A1	3.21E-05	0.36929625	0.327	0.257	1
FMNL1	4.01E-05	0.32948379	0.426	0.375	1
MYADM	5.16E-05	0.34381267	0.357	0.291	1
FFAR2	5.26E-05	0.3740605	0.304	0.232	1
SEC14L1	6.75E-05	0.32474666	0.307	0.233	1
UBALD2	0.00013128	0.29554015	0.38	0.32	1
SMAP2	0.0001342	0.34440321	0.346	0.287	1
ANP32A	0.00019677	0.30721167	0.437	0.387	1
NADK	0.00032087	0.32767433	0.309	0.249	1
STX3	0.00037862	0.32738451	0.263	0.202	1
ACSL1	0.00040446	0.25754401	0.343	0.277	1
CLEC4E	0.00041466	0.32435111	0.261	0.201	1
NINJ1	0.00043459	0.26253262	0.3	0.236	1
SLAMF6	0.00106363	0.43525058	0.341	0.297	1
LRRC25	0.00125303	0.52414005	0.263	0.217	1
CPPED1	0.00128624	0.32380261	0.368	0.317	1
OAZ2	0.00168132	0.26108973	0.339	0.285	1
PTEN	0.00178914	0.3614677	0.323	0.275	1

846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859

UBE2B	0.00283856	0.28556251	0.366	0.316	1
SKAP2	0.00298484	0.28678031	0.309	0.262	1
SERPINA1	0.00328204	0.29207947	0.348	0.306	1
VASP	0.00388701	0.26743954	0.343	0.299	1
STAT3	0.00410928	0.33129877	0.295	0.259	1
NCOA4	0.00476307	0.2710217	0.38	0.35	1
LINC01001	0.00656242	0.27721254	0.302	0.258	1
MSL1	0.00665961	0.27156341	0.307	0.265	1
HELLPAR	0.00693127	0.31717256	0.421	0.421	1
ARHGAP9	0.01125177	0.27699612	0.311	0.275	1
MARCKS	0.02167769	0.34026489	0.261	0.225	1
ADAM8	0.02262501	0.27366344	0.275	0.242	1
VSIR	0.0349125	0.27232263	0.382	0.367	1
ZFP36	0.03794549	0.30876515	0.295	0.274	1
LILRB3	0.04375291	0.27003129	0.314	0.29	1
ANXA11	0.04449215	0.36812117	0.307	0.293	1
ERGIC1	0.04911922	0.26598289	0.284	0.262	1
RAP1A	0.06027995	0.4042463	0.281	0.269	1
MTPN	0.11121576	0.40656825	0.252	0.24	1
RNF130	0.11152275	0.25120262	0.256	0.237	1
ZYX	0.11982136	0.28764036	0.357	0.355	1
TLN1	0.23330283	0.25627137	0.309	0.32	1
PRKCB	0.28478432	0.25834928	0.33	0.345	1
GTF2I	0.34185555	0.26248359	0.281	0.285	1
IGF2R	0.56162668	0.282584	0.261	0.272	1
CACNB4	0.64418298	0.26042903	0.261	0.283	1
BAZ2B	0.83141321	0.26079465	0.229	0.254	1

860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873

874 **Table S5. The 16 gene NPA signature**
875

16_gene_NPA_signature
RTN3
RAB3D
IL10RB
GPR82
SPAG9
B4GALT5
RBPJ
IDH2
TMUB2
ZNF397
NXPE3
TRIM41
HELLPAR
CCNI
TSC22D4
YY1

876

**Caractérisation des neutrophiles au cours de la
tumorigenèse de la glande mammaire dans le
modèle murin MMTV-NeuT**

Introduction

Nous avons vu précédemment dans l'introduction bibliographique que les rôles anti- et pro-tumoraux des TAN était souvent associé aux stades d'évolution de la tumeur. Ainsi, les TAN issus de tumeurs précoces auraient tendance à avoir des fonctions anti-tumorales (11, 432, 434) alors que les TAN de tumeurs avancées ont plutôt des propriétés pro-tumorales (14, 15, 23, 322). Plus récemment a été mis en évidence la notion d'hétérogénéité phénotypique des neutrophiles grâce à la découverte de plusieurs sous-populations de TAN à un stade tardif de la tumorigenèse pulmonaire chez la souris (435). Notre première étude sur les ANP (article de thèse) menée chez l'homme a permis d'identifier un nouveau cluster de neutrophiles, confortant l'idée que les neutrophiles circulants sont hétérogènes à un stade avancé du cancer. Cependant il n'est encore à ce jour pas très clair si une telle hétérogénéité phénotypique existe également à des stades précoces de la tumorigenèse, et si elle est qualitativement et/ou quantitativement différente des stades tardifs. L'accès aux tumeurs précoces/prénéoplasiques chez l'homme est encore aujourd'hui très limité. Afin d'étudier cette question, nous avons opté pour un modèle murin de tumeurs mammaires spontanées (modèle MMTV-NeuT) dont la cinétique de développement tumoral est connue avec une distinction très claire des stades précoces et avancés (436).

But de l'étude

Le but de cette étude est de caractériser les TAN à différents stades de la tumorigenèse.

Présentation du modèle

Pour ce faire, nous avons utilisé le modèle murin de tumeurs mammaires spontanées MMTV-NeuT sur fond génétique BALB/c. Ce modèle de souris transgénique a été créé par l'équipe de G Forni en 1998 (437). Dans ce modèle, l'oncogène « NeuT » de rat muté et amplifié est sous le contrôle du promoteur MMTV (« mouse mammary tumor virus ») restreignant l'expression de l'oncogène aux cellules épithéliales des glandes mammaires chez les souris femelles (437). G Forni et ses collègues ont montré que l'expression du transgène NeuT conduisait au développement de tumeurs sur l'ensemble des glandes mammaires (**modèle multifocal**) des femelles MMTV-NeuT (437). La **pénétrance** est de **100%**, soit 100% des femelles MMTV-NeuT développent des tumeurs (437). Bien que les auteurs aient caractérisé la cinétique du développement tumoral, celle-ci reste très approximative. Néanmoins, les auteurs ont pu distinguer 3 stades distincts de la tumorigenèse mammaire. Les souris MMTV-NeuT commencent par développer des **hyperplasies mammaires atypiques** (de la 5^{ème} à la 13^{ème} semaine de développement de

la souris) qui évoluent ensuite en **carcinomes lobulaires *in situ*** (de la 13^{ème} à la 17^{ème} semaine) puis en **carcinomes lobulaires invasifs** (de la 17^{ème} à la 25^{ème} semaine) (437). Ce modèle semble par conséquent convenir à l'étude comparative des différents stades de la tumorigenèse mammaire en particulier les stades précoces (hyperplasies atypiques) et tardifs (carcinomes invasifs).

Les objectifs

Les objectifs de ce projet ont donc été de (i) valider et/ou affiner d'avantage l'analyse anatomopathologique des différents stades tumoraux et leur cinétique, sur la base de celle faite initialement par l'équipe de G Forni (437) ; (ii) Étudier l'infiltrat immunitaire des tumeurs, en particulier celui des neutrophiles aux différents stades tumoraux ; (iii) Caractériser le phénotype des TAN aux différents stades de la tumorigenèse mammaire.

Les résultats présentés ci-dessous sont le fruit d'un travail collaboratif avec Manuela Pereira-Abrantes, aujourd'hui étudiante en première année de thèse dans notre sous-groupe, que j'ai eu la chance d'encadrer pendant son stage de M2.

Résultats

1. Caractérisation du modèle murin MMTV-NeuT de tumeurs mammaires spontanées.

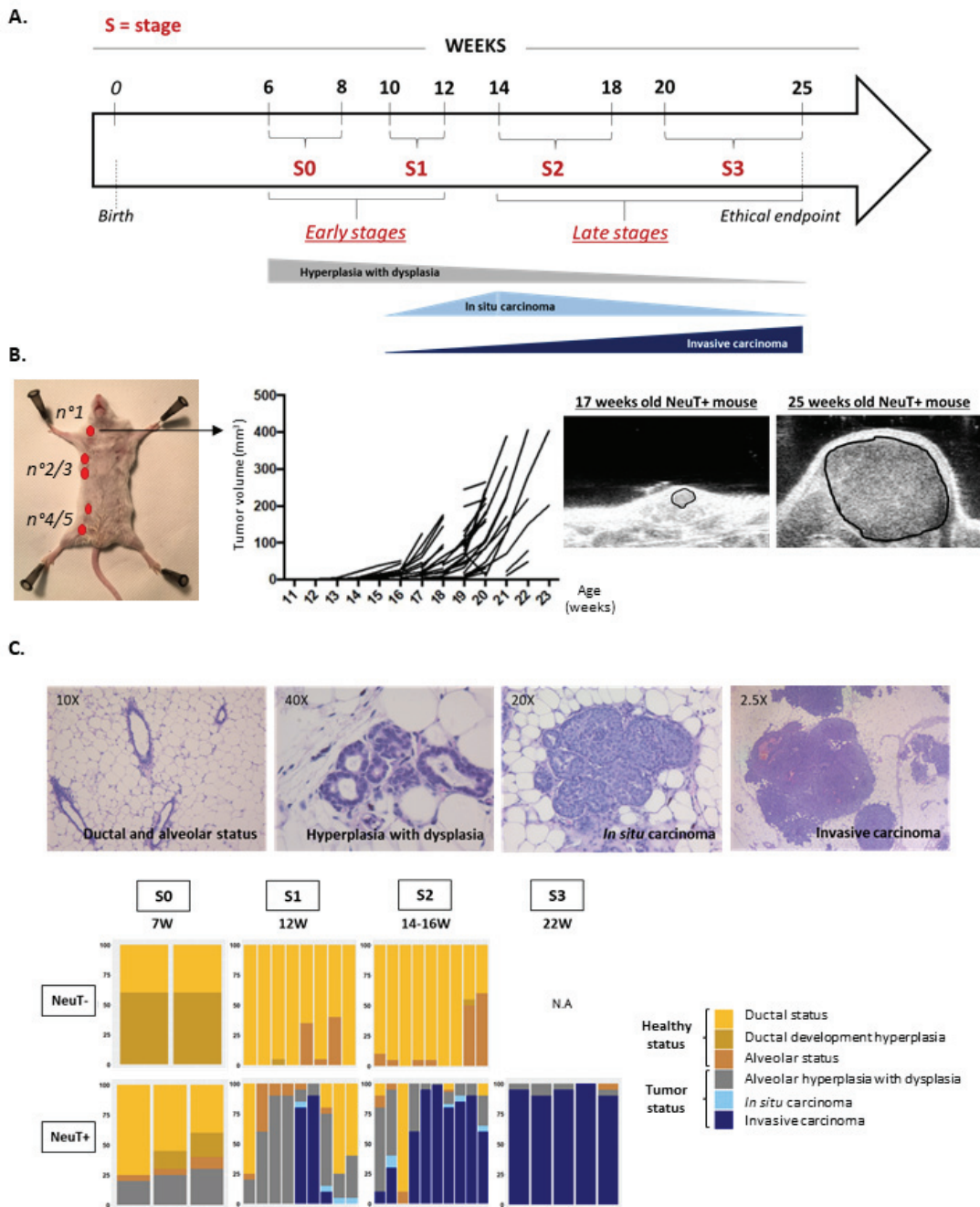
Basé sur la première analyse de l'équipe de G Forni (437), nous avons défini 4 stades de développement de la tumorigenèse mammaire. Un stade 0 « S0 » (de la 6^{ème} à la 8^{ème} semaine de vie de la souris), le stade 1 « S1 » (de la 10^{ème} à la 12^{ème} semaine), le stade 2 « S2 » (de la 14^{ème} à la 18^{ème} semaine) et le stade 3 « S3 » (de la 20^{ème} à la 25^{ème} semaine) (Figure 1A). Nous avons initialement considéré les stades S0 et S1 comme les stades précoces et les stades S2 et S3 comme les stades tardifs (Figure 1A).

À l'aide d'un échographe (Vevo LAZR® by Visualsonics), nous avons pu montrer que l'initiation tumorale (basée sur le volume tumoral minimal détectable à l'échographe qui est aux alentours de 30mm³) montrait une certaine hétérogénéité, sur plus d'une dizaine de souris (Figure 1B). En effet, alors que les premières tumeurs sont détectées à l'échographe à la 13^{ème} semaine, d'autres ne sont détectées qu'à la 21^{ème} semaine. Cependant, la majorité des tumeurs sont détectables à l'échographe entre la 14^{ème} et la 18^{ème} semaine (Figure 1B).

En collaboration avec une anatomopathologiste vétérinaire (Sara Belluco, Ecole Vétérinaire de Lyon), nous avons pu évaluer précisément les caractéristiques histologiques des tumeurs aux 4 stades que nous avons précédemment définis, à la fois chez les femelles

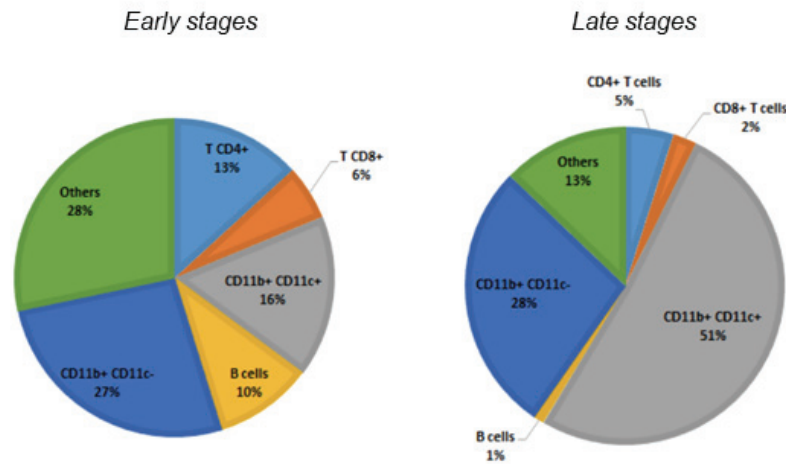
BALB/c MMTV-NeuT (« NeuT⁺ ») et chez les femelles BALB/c de phénotype de sauvage (« NeuT⁻ ») comme souris contrôles. Nous avons ainsi pu identifier 3 statuts histologiques sains, présents chez les souris NeuT⁻ et NeuT⁺ (surtout aux stades précoces S0 et S1), à savoir le statut « canalaire (ductal en anglais) » (canaux des glandes mammaires) qui fini par former des alvéoles laissant ainsi place au statut « alvéolaire » (alvéoles des glandes mammaires) et les hyperplasies canalaire d'ordre développemental (développement physiologique de la glande mammaires) (Figure 1C). En parallèle, nous avons pu observer 3 statuts histologiques propres aux souris NeuT⁺, à savoir les **hyperplasies alvéolaires avec dysplasies** (essentiellement au stade S1); les **carcinomes alvéolaires *in situ*** (stade intermédiaire) et les **carcinomes alvéolaires invasifs** (stade avancé) (Figure 1C). Il est important de noter que le stade carcinome *in situ* est très peu représenté (moins de 10% par tumeur). De plus, on remarque une certaine hétérogénéité histologique au stade S1, avec des tumeurs majoritairement constituées d'hyperplasies alvéolaires avec dysplasie et d'autres avec une majorité de carcinome invasif (Figure 1C). Cette différence de statut histologique entre tumeurs de même stade corrobore avec l'hétérogénéité d'initiation tumorale observée par échographie (Figure 1B).

Nous avons ensuite caractérisé l'infiltrat immunitaire des tumeurs NeuT⁺ aux différents stades, ce qui à notre connaissance n'a jamais encore été réalisé dans ce modèle murin. Nous avons pu observer que les tumeurs NeuT⁺ précoces étaient majoritairement infiltrées par les cellules myéloïdes CD11b⁺ (45-50% des cellules immunitaires CD45⁺ aux stades S0, S1 et S2) (Figure 1D et 1E). Cet infiltrat est même augmenté au stade tardif S3 (70% des cellules immunitaires CD45⁺) (Figure 1D et 1E). De la même manière, nous avons observé une augmentation de l'infiltrat en neutrophiles (annoté « PMNs » et identifiés comme les cellules CD45⁺ CD11b⁺ Ly6C^{intermédiaire} Ly6G^{high}), passant de 1% aux stades précoces S0-S1 contre 5% parmi les cellules immunitaires CD45⁺ au stade S2-S3) (Figure 1F).

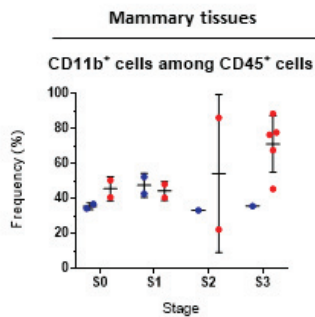


D.

NeuT⁺ tumor immune infiltrate



E.



F.

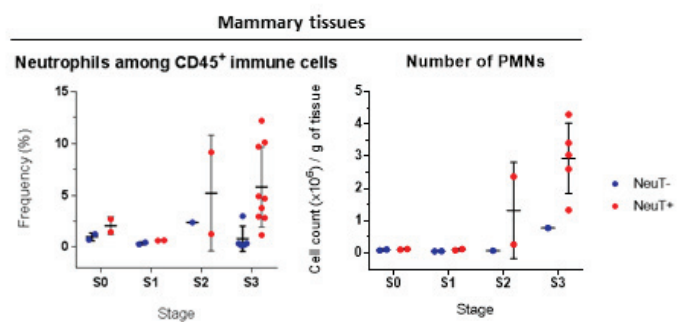


Figure 1. Characterization of the MMTV-NeuT murine model of spontaneous breast tumors.

D. Immune landscape in early (from 5 to 12 weeks of mouse age) and late-stage (from 14 to 25 weeks of mouse age) NeuT⁺ n²/3 tumors. E. Quantification (mean with SD) of the percentage of the percentage of CD11b⁺ cells in NeuT⁺ n²/3 tumors and NeuT⁻ n²/3 mammary glands at the four stages as defined in Figure 1A. F. Quantification (mean with SD) of the percentage of CD11b⁺ Ly6C^{intermediate} Ly6G^{high} neutrophils in NeuT⁺ n²/3 tumors and NeuT⁻ n²/3 mammary glands at the four stages as defined in Figure 1A.

2. Rôle pro-tumoral des neutrophiles au stade tardif de la tumorigenèse mammaire.

Nous avons ensuite évalué si cette infiltration intra-tumorale massive en neutrophiles était associée à un rôle pro-tumoral. Nous avons donc mesuré l'impact de la déplétion des neutrophiles sur la croissance tumorale des souris NeuT⁺. Pour cela, une approche expérimentale par anticorps déplétant anti-Ly6G (clone 1A8) a été envisagée, les neutrophiles exprimant l'antigène spécifique Ly6G. Nous avons dû tout d'abord optimiser notre protocole de déplétion des neutrophiles pour qu'elle soit efficace sur plus d'une semaine, afin d'avoir le temps d'observer un potentiel effet de la déplétion des neutrophiles sur la croissance tumorale. Trois jours après l'injection des anticorps anti-Ly6G, nous avons validé l'efficacité de déplétion des neutrophiles en montrant la disparition de ceux-ci dans le sang, sur la base de la forte expression de CD11b et Ly6C de façon intermédiaire (l'antigène

Ly6G masqué par l'anticorps anti-Ly6G ne pouvant plus être utilisé pour identifier les neutrophiles) (Figure 2A). Nous avons réussi à maintenir une efficacité de déplétion des neutrophiles circulants supérieure à 85% sur au moins 3 semaines. L'initiation tumorale étant hétérogène (Figure 1B), nous avons pris comme « t0 » (point de référence temporelle de départ) les tumeurs dont le volume était compris entre 15 et 30mm³, mesuré par échographe. Puis nous avons évalué l'augmentation de la croissance tumorale (normalisée par rapport au volume tumoral de départ) à 7, 14 et 21 jours après la première injection d'anticorps anti-Ly6G. Ainsi nous avons pu mettre en évidence que l'élimination des neutrophiles diminuait significativement la croissance tumorale dès la fin de la première semaine de traitement (Figure 2B), démontrant que les neutrophiles possèdent des propriétés pro-tumorales au stade tardif de la tumorigenèse mammaire.

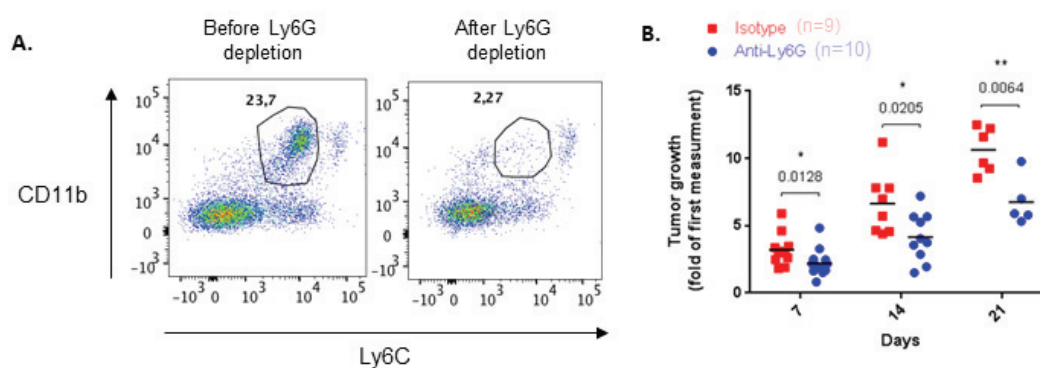


Figure 2. Pro-tumoral role of neutrophils at late-stage of breast tumorigenesis.

A. Check of neutrophil depletion in NeuT⁺ female mouse's blood (drawn from tail vein), was performed 3 days after the last injection anti-Ly6G antibody once a week. Neutrophils were identified as CD11b^{high} Ly6C^{intermediate} cells **B.** Monitoring of tumor growth of NeuT⁺ n°1 tumors monitoring by ultrasound in mice treated with anti-Ly6G antibodies (1A8 clone) or isotype control through 3 weeks of follow-up. Tumor growth was calculated as follow : Tumor volume at week 7, 14 or 21 divided by the tumor volume at the start of the treatment (Isytype of anti-Ly6G antibodies). Treatment began when tumor volume was in-between 15 - 30mm³.

3. Caractérisation phénotypique des TAN à différents stades de la tumorigenèse mammaire.

Nous avons ensuite caractérisé par cytométrie en flux le phénotype des TAN et des neutrophiles d'organes lymphoïdes (comme tissus contrôles) aux différents stades de la tumorigenèse sur la base de marqueurs membranaires identifiés dans la littérature. Nous avons en effet retenue le marqueur « siglec F » exprimé par une sous-population de TAN aux propriétés pro-tumorales dans un modèle murin de cancer du poumon (23) ; le marqueur IA/IE (CMH-II) exprimé par une sous-population de TAN aux activités anti-tumorales chez l'Homme et chez la souris (11) ; et enfin le marqueur PD-L1 exprimé par une sous-population de TAN aux activités immunosuppressives chez l'Homme (11). Pour cela, nous avons tout

d'abord présélectionné la même quantité de neutrophiles CD45⁺ CD11b⁺ Ly6C^{intermédiaire} Ly6G^{high} issus de 3 tissus différents (tumeur, rate et moelle osseuse). Nous avons ensuite concaténé tous les neutrophiles pour réaliser une analyse non-supervisée en t-SNE (*t-distributed stochastic neighbor embedding* : qui est une méthode de réduction dimensionnelle non-linéaire) sur l'ensemble des marqueurs. La visualisation viSNE (*Visualization of t-SNE results* : visualisation des résultats issus de l'analyse en t-SNE) de cette analyse nous a permis de distinguer 3 populations de neutrophiles spécifiques du tissu tumoral par rapport à la rate et à la moelle osseuse (Figure 3A). La population de TAN exprimant le marqueur SiglecF (**TAN siglecF⁺**), les TAN co-exprimants les marqueurs IA/IE et PD-L1 (**TAN IA/IE⁺ PD-L1⁺**) (Figure 3B), et de façon surprenante, une majorité de TAN exprimant le marqueur « EpCAM » (**TAN EpCAM⁺**) initialement utilisé pour identifier le contingent de cellules épithéliales. Alors que les **TAN siglecF⁺** et les **TAN IA/IE⁺ PD-L1⁺** semblent être 2 populations indépendantes, les **TAN EpCAM⁺** semble faire partie des 2 populations précédentes. Nous avons ensuite quantifié la proportion de chacune de ces populations de TAN aux différents stades (S0, S1, S2 et S3) dans la tumeur et dans les glandes mammaires saines d'âges équivalents en guise de contrôle (Figure 3C). Les résultats préliminaires montrent qu'il n'y a pas de variation significative pour les TAN siglecF⁺ mise à part au stade S2 (12,5% dans la tumeur contre 3% dans le tissu sain). Pour la population de TAN IA/IE⁺ PD-L1⁺, nous avons remarqué que celle-ci était fortement augmentée au stade tardif S3 (15% dans la tumeur contre 1% dans le tissu sain). Quant aux TAN EpCAM⁺, de façon très intéressante, nous avons observé qu'elle était fortement augmentée à tous les stades (autour de 60%) avec un pic au stade tardif S3 de l'ordre de 80%, alors qu'ils représentent 10% dans les glandes mammaires saines des souris NeuT⁻. Ces résultats préliminaires suggèrent que les TAN siglecF⁺ et les TAN IA/IE⁺ PD-L1⁺ sont spécifiques des tumeurs avancées alors que les TAN EpCAM⁺ sont présents et en grande quantité dès les stades précoces de la tumorigenèse mammaire.

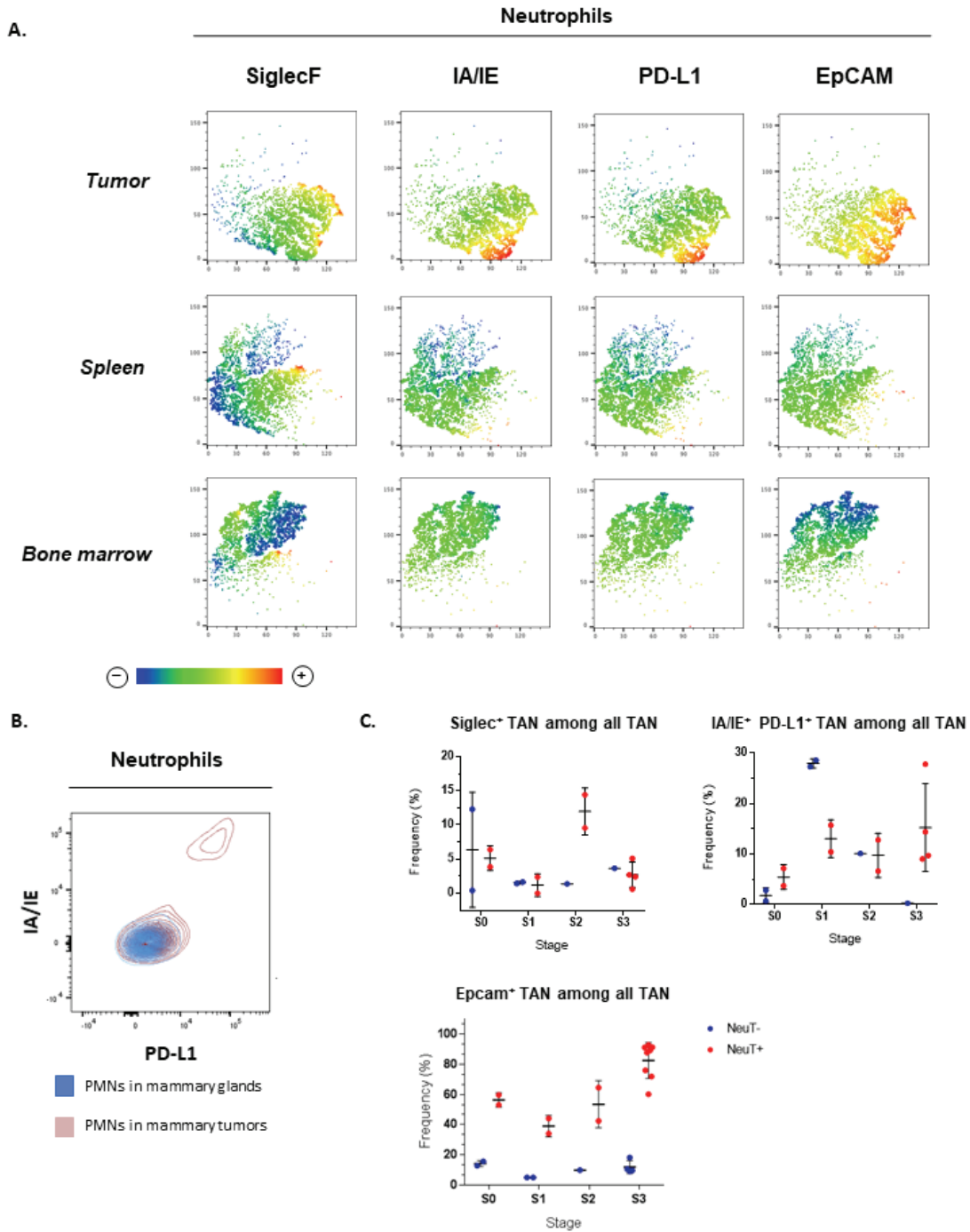


Figure 3. Phenotypic characterization of TAN at different stages of breast tumorigenesis.

A. viSNE of concatenated neutrophils from NeuT⁺ n^o2/3 tumor, spleen and bone marrow of a NeuT⁺ mouse at S3 stage revealing EpCAM, SiglecF, IA/IE and PD-L1 markers. **B.** Co-expression of IA/IE markers on CD11b⁺ Ly6C^{intermediate} Ly6G^{high} TAN from NeuT⁺ n^o2/3 tumors and NeuT⁻ n^o2/3 mammary glands at S3 stage. **C.** Quantification (mean with standard deviation) of the SiglecF⁺ TAN and IA/IE⁺PD-L1⁺ CD11b⁺ Ly6C^{intermediate} Ly6G^{high} TAN frequency and number in NeuT⁺ n^o2/3 tumors and NeuT⁻ n^o2/3 mammary glands at the four stages as defined in Figure 1A.

4. Caractérisation de la nouvelle sous-population de TAN exprimant le marqueur de cellule épithéliale « EpCAM ».

Nous nous sommes alors intéressés plus particulièrement à la sous-population de TAN EpCAM⁺. De par l'expression du marqueur épithélial « EpCAM », nous avons voulu

confirmer qu'il ne s'agissait pas d'un doublet cellulaire d'une cellule épithéliale avec un TAN, même si nous avons préalablement éliminé les doublets (Figure 2A). Nous avons observé que l'expression d'EpCAM à la surface de neutrophiles était moins importante que celle des cellules épithéliales (Figure 4A) excluant donc l'idée qu'il s'agisse d'un doublet.

Nous avons ensuite cherché à savoir si EpCAM était exprimé par d'autres cellules immunitaires. Bien qu'EpCAM soit exprimé par les éosinophiles et d'autres cellules myéloïdes (« TNP » pour triple negative population qui correspondent aux cellules CD11b⁺ Ly6C⁻ Ly6G⁻ SiglecF⁻), nous avons noté que la majorité des cellules EpCAM⁺ étaient des TAN et ce pour tous les stades de la tumorigenèse mammaire (Figure 4B). De façon intéressante, nous avons observé qu'au stade précoce S0, le neutrophile était la cellule immunitaire de type myéloïde qui exprimait le plus le marqueur EpCAM (Figure 4B).

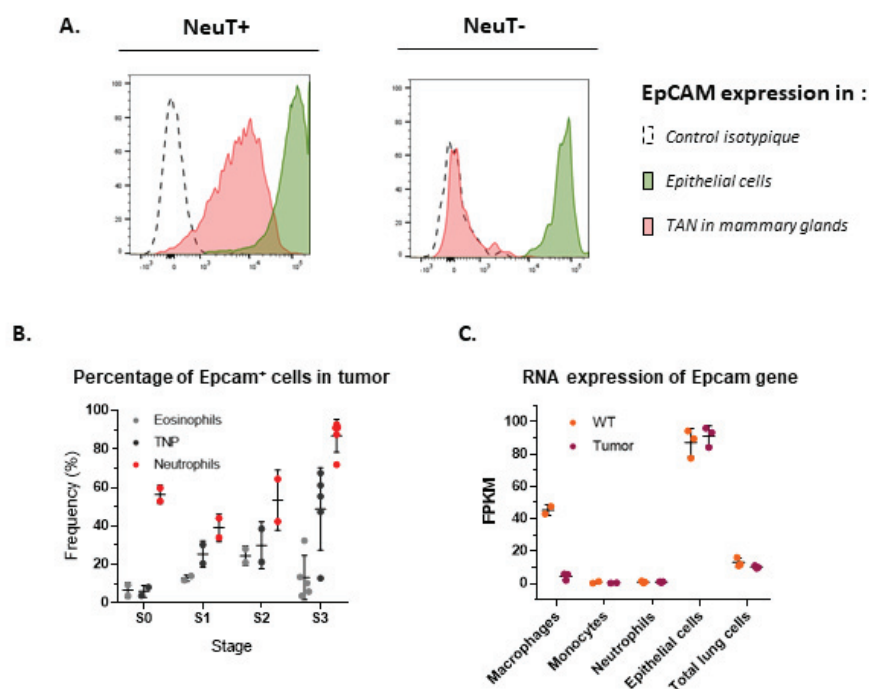


Figure 4. Characterization of a new subset of TAN expressing « Epcam » epithelial cell marker.

A. Histogram representing cell-surface expression of Epcam on CD11b⁺ Ly6C^{intermediate} Ly6G^{high} TAN and Epcam⁺ CD45⁻ epithelial cells at S3 stage. **B.** Quantification of frequency of Epcam⁺ cells in tumor among three different cell types, at the four stages as defined in Figure 1A. Eosinophils was defined as CD11b⁺ Ly6C^{intermediate} Ly6G^{intermediate} SiglecF⁺ cells ; Neutrophils as CD11b⁺ Ly6C^{intermediate} Ly6G^{high} cells ; TNP ("Triple negative population") as CD11b⁺ Ly6C^{intermediate} Ly6G⁻ SiglecF⁻ cells. **C.** RNA expression of Epcam gene in FPKM (Fragments Per Kilobase of transcript per Million) across three purified immune cell types (macrophages, monocytes, neutrophils), epithelial cells from murine lung tumors as well as total lung cells from public transcriptomic data (GSE59831).

Nous avons ensuite voulu savoir si les neutrophiles exprimaient EpCAM de façon endogène, au niveau transcriptomique. Pour cela, nous avons analysé des données transcriptomiques publiques (GSE59831) de plusieurs types cellulaires (incluant les neutrophiles et les cellules épithéliales) issus de tumeurs pulmonaires et de poumons sains de souris. Alors que les cellules épithéliales expriment des niveaux élevés du transcript

EpCAM (aux alentours de 90 FPKM), les neutrophiles quant à eux ont une expression nulle pour ce transcrit qu'ils soient issus de tumeur ou du tissu sain (Figure 4C). Bien qu'il ne s'agisse pas du même modèle murin ou du même type de cancer, ces résultats suggèrent donc que les TAN murins n'expriment pas EpCAM au niveau transcriptionnel. Dans leur intégralité, ces résultats préliminaires permettent de dresser une nouvelle hypothèse. Celle-ci proposerait que l'expression d'EpCAM à la surface des TAN résulterait de la capture de bouts de membranes de cellules tumorales, un phénomène plus communément appelé trogocytose.

DISCUSSION

Outre leurs potentiels rôle dans le sang, les neutrophiles présents au site tumoral (donc les TAN) sont bien admis pour avoir des fonctions pro-tumorales, tout du moins dans les tumeurs avancées (12). Néanmoins dans les tumeurs précoces, les neutrophiles semblent plutôt avoir un rôle anti-tumoral (12). Cette dualité fonctionnelle associée au stade de développement de la tumeur pose la question d'une différence de phénotype entre les TAN de tumeur précoces et ceux de tumeurs tardives. Une meilleure définition des phénotypes des TAN anti-tumoraux et des TAN pro-tumoraux est nécessaire pour le développement de nouvelles immunothérapies anti-cancéreuses basé sur les neutrophiles.

Grâce à une étroite collaboration avec une anatomopathologiste vétérinaire, nous avons pu confirmer dans le modèle murin MMTV-NeuT en fond BALB/c qu'il était possible de distinguer des tumeurs très précoces (hyperplasies alvéolaires avec dysplasies) et des tumeurs avancées (carcinomes alvéolaires invasifs) (Figure 1C). De plus nous avons été capable de détecter par cytométrie en flux la présence de neutrophiles dans ces deux types de tumeurs (Figure 1C). Nous avons donc montré que ce modèle murin était approprié pour étudier les fonctions et les phénotypes des TAN dans les tumeurs précoces et avancées.

Nous avons montré que la déplétion sélective des neutrophiles au stade avancé de la tumorigenèse réduisait de façon significative la croissance tumorale suggérant donc un rôle pro-tumoral des neutrophiles. Bien que nous ayons réussi à maintenir une déplétion des neutrophiles supérieur à 85%, tout du moins dans le sang, sur au moins 3 semaines, cela n'a concerné qu'une faible proportion de souris (moins de 20% des souris traitées par l'anti-Ly6G). La grande majorité des souris se sont montrées résistantes à l'anti-Ly6G dès la fin de la première semaine. Une récente étude a montré qu'il était possible pallier à ce phénomène de résistance à l'anti-Ly6G (438). Les auteurs ont montré que l'injection d'un anticorps de souris IgG2a anti-anticorps de rat favorisait l'action de déplétion de l'anti-Ly6G (anticorps de rat IgG2a). D'un point de vue mécanistique, les auteurs ont montré que l'anticorps anti-anticorps de rat permettait d'induire la mort des neutrophiles non-plus sous la dépendance des macrophages (via l'isotype de rat IgG2a), mais par la voie du complément qui s'avère être plus efficace (via l'isotype de souris IgG2a, l'orthologue de l'isotype de rat IgG2b). Ce protocole nous sera également utile pour évaluer l'impact de la déplétion des neutrophiles au stade précoce de la tumorigenèse. En formulant l'hypothèse que les TAN de tumeurs précoces ont un rôle anti-tumoral, nous nous attendons à observer une accélération de la croissance tumorale sous l'effet de la déplétion.

En parallèle de la caractérisation fonctionnelle des TAN, la caractérisation phénotypique de ceux-ci au cours de la tumorigenèse est tout aussi importante. En s'appuyant de la littérature, nous avons identifié trois marqueurs membranaires nous permettant de distinguer 2 sous-populations de TAN, les neutrophiles siglec F⁺, et les

neutrophiles co-exprimant le CMH-II et PD-L1. Les neutrophiles siglec F⁺ ont été décrits pour favoriser la croissance tumorale des tumeurs pulmonaires chez la souris (23). Nous avons observé que cette population était augmentée à un stade avancé de la tumorigenèse (stade S2) (Figure 3C). Cependant, cette augmentation d'expression ne semble pas perdurer au stade S3 (Figure 3C). Au stade précoce, la population de neutrophiles siglec F⁺ ne semble pas être augmentée (Figure 3C). Nos résultats suggèrent donc que la population de neutrophiles siglec F⁺ pro-tumorale serait spécifique des tumeurs tardives.

Quant aux neutrophiles exprimant le CMH-II, ceux-ci semblent avoir une plus grande capacité à présenter des antigènes aux lymphocytes T et stimuler leur prolifération (439). Chez l'Homme, une sous-population de neutrophiles a été identifiée comme étant capable de présenter des antigènes tumoraux aux lymphocytes T (11). Alors que l'expression du CMH-II par les neutrophiles irait plutôt en faveur d'un rôle anti-tumoral, l'expression de PD-L1 semble au contraire plutôt plaider en faveur d'un rôle pro-tumoral de par son activité suppressive sur la prolifération des lymphocytes T (11). Chez l'Homme, la co-expression CMH-II et de PD-L1 à la surface du neutrophile est plutôt associé à une fonction immunosuppressive (11). Dans notre modèle d'étude, nous avons pu voir que les neutrophiles CMH-II⁺ PD-L1⁺ était surtout enrichie au stade tardif S3 (Figure 3C), suggérant donc que la population CMH-II⁺ PD-L1⁺ puisse être responsable de l'effet pro-tumoral des neutrophiles mis en lumière précédemment (Figure 2B).

Alors que nous avons choisi le marqueur « EpCAM » pour identifier le contingent de cellules épithéliales, nous avons observé de façon tout à fait inattendue une sous-population de neutrophiles exprimant le marqueur de cellules épithéliales « EpCAM » (Figure 3A). Grâce à l'analyse de données transcriptomiques publiques, nous avons pu montrer que les neutrophiles de tumeurs pulmonaires n'exprimaient pas le gène EpCAM (Figure 3A). Nous avons l'intention d'aller mesurer le taux d'expression du transcript EpCAM dans les TAN des souris femelles NeuT⁺ par rapport aux neutrophiles de glandes mammaires saines des souris femelle NeuT⁻. Dans le cas où nous confirmerions qu'il n'y pas d'expression du gène EpCAM au niveau ARN, cela pourrait suggérer que l'expression membranaire d'EpCAM résulte du phénomène de trogocytose des cellules tumorales. Une récente étude a montré que les neutrophiles étaient capables de faire de la trogocytose sur les cellules tumorales *in vitro* et *in vivo* induisant la mort lytique de celles-ci (140). Ce type de mort lytique induite par la trogocytose porte le nom de trogoptose (140). La trogoptose des cellules tumorales par les neutrophiles tel qu'elle est documentée (140) est dépendante d'anticorps et constitue donc un sous-type d'ADCC. La trogoptose opérée par les neutrophiles pourrait donc nécessiter une coopération avec les lymphocytes B/Plasmocytes. Nous aimerions voir dans de futures expériences si la déplétion des lymphocytes B *in vivo* dans les femelle NeuT⁺, par injection d'un anticorps anti-CD20, modifie l'expression d'EpCAM à la surface des neutrophiles. En

parallèle *in vitro*, nous trouverions également intéressant de voir si l'expression d'EpCAM à la surface des neutrophiles peut-être indépendante des anticorps. Pour cela, nous réaliserons une co-culture de cellules épithéliales tumorales (exprimant la protéine fluorescente verte « GFP » fusionnée à la molécule EpCAM) avec des neutrophiles de moelle osseuse n'exprimant pas EpCAM. Si après co-culture les neutrophiles expriment la GFP, cela suggérerait que la trogocytose des cellules tumorales peut se faire indépendamment des anticorps, ce qui à ce jour n'est encore pas documenté.

Jusqu'à présent, la trogocytose opérée par les neutrophiles a été associée à un rôle anti-tumoral de ces derniers. Néanmoins, nous avons observé que la proportion de neutrophiles exprimant d'EpCAM était supérieur au stade le plus avancé (stade S3) par rapport aux autres stades (Figure 3C). Pourtant au stade S3, la tumeur semble pourtant avoir complètement échappée à l'immunosurveillance, ce qui est paradoxale avec l'effet anti-tumoral de la trogocytose par les neutrophiles. Nous serions alors tenté de faire l'hypothèse que la trogocytose puisse au contraire favoriser les fonctions pro-tumorales des neutrophiles. Les membranes plasmiques représente une source important d'acides gras (440). De plus en plus d'évidences montrent que les acides gras ont la capacité à stimuler les fonctions pro-tumorales des neutrophiles, comme l'immunosuppression, *in vivo* et *in vitro* (413, 415). Cependant l'origine de ces acides gras reste inconnue. Dans le cadre de notre hypothèse, il se pourrait qu'ils puissent provenir des membranes plasmiques de cellules tumorales. La tumeur pourrait donc réserver un petit pool de cellules tumorales servant de source d'acides gras pour les TAN après trogocytose afin de stimuler leurs fonctions pro-tumorales. Cette hypothèse permettrait d'expliquer pourquoi les neutrophiles EpCAM⁺ s'accumulent au stade le plus avancé de la tumorigenèse (Figure 3C). Sur le principe de la sélection Darwinienne, la tumeur privilégierait les neutrophiles pro-tumoraux EpCAM⁺ pour sa propre survie/croissance.

Le marqueur « EpCAM » pourrait également constituer un marqueur spécifique des TAN par rapport aux neutrophiles des autres tissus, tout du moins de la rate et de la moelle osseuse (Figure 3A). Cette découverte est particulièrement intéressante puisqu'elle permettrait d'évaluer le taux de contamination en neutrophiles sanguins (Neutrophiles EpCAM⁻) dans la tumeur par rapport aux neutrophiles vraiment infiltrés dans la tumeur que sont les TAN (Neutrophiles EpCAM⁺). Nous avons remarqué en fonction des stades de la tumorigenèse que la proportion des TAN EpCAM⁺ pouvait varier entre 40 et 80% des TAN totaux (Figure 3C). Une tumeur qui présenterait exceptionnellement seulement 20% de TAN EpCAM⁺ pourrait être le signe d'une contamination de neutrophiles du sang n'exprimant pas EpCAM⁻. Ceci est particulièrement pertinent dans le tri de TAN pour le séquençage. Une des étapes critiques est de trier les TAN de la façon la plus pure possible pour ne pas polluer l'information transcriptomique de ceux-ci par des neutrophiles du sang par exemple. Évaluer

en amont la proportion de neutrophiles EpCAM⁺ pourrait donner une information supplémentaire sur le niveau pureté des TAN triés. Mais avant de proposer le marqueur « EpCAM » comme marqueur spécifique des TAN, il faudra valider l'expression de celui-ci à la surface des TAN dans d'autres modèles tumoraux chez la souris mais aussi chez l'Homme.

Nous avons pour objectif prochainement de réaliser une caractérisation non-biaisé des TAN par une approche de RNAseq de ceux-ci au stade précoce et tardif de la tumorigenèse mammaire. Pour cela, nous devons définir un stade précoce le plus enrichi possible en hyperplasie alvéolaire avec dysplasie (statut histologique du développement tumoral le plus précoce) et un stade tardif fortement enrichi en carcinome invasif (statut histologique du développement tumoral le plus avancé). Pour ce dernier, nous avons montré qu'au stade S3, nous étions relativement riche en carcinomes invasifs pour chaque tumeur (Figure 1C). Les tumeurs du stade S3 sont en effet pour chacune d'entre elle, constituées à plus de 90% de carcinomes invasifs. Ce phénotype semble relativement homogène entre les différentes tumeurs analysées (Figure 1C) faisant du stade S3, le stade de référence pour les tumeurs tardives. Contrairement aux tumeurs tardives, la quantité de matériel biologique pour une tumeur précoce est beaucoup trop faible pour avoir suffisamment de neutrophiles pour le séquençage (au moins 1000 neutrophiles). Il nous faudra alors grouper plusieurs tumeurs ensemble pour avoir assez de neutrophiles. Il nous faut cependant s'assurer de la richesse des hyperplasies alvéolaires avec dysplasie par glande mammaire ainsi que de l'homogénéité de ce statut histologique entre plusieurs souris. Bien que le stade S0 soit le plus homogène en terme de pourcentage d'hyperplasies alvéolaires avec dysplasies par tumeur par rapport au stade S1, cette proportion reste relativement faible (en moyenne autour de 25%) (Figure 1C). Alors qu'au stade S1, ce pourcentage est en moyenne plus élevé (autour de 40%) (Figure 1C), faisant de ce stade le stade de référence pour les tumeurs précoces. Nous serons ainsi en mesure de pouvoir comparer le transcriptome des TAN de tumeurs précoces avec les TAN de tumeurs tardives, ce qui pour l'heure n'a encore jamais été réalisé.

Afin de mieux définir les sous-populations de TANs spécifiques des stades précoces et tardifs, nous aimerions également séquençer à l'échelle unicellulaire (scRNAseq) les TAN de tumeurs précoces et de tumeurs tardives. Nous les séquençerions simultanément grâce à une étape de "cell hasing" (CITE-Seq) qui marque les cellules avec des anticorps couplés à des "tags" oligonucléotidiques permettant d'identifier l'échantillon d'origine. Cette approche permet d'éliminer les biais de séquençage et de réduire les coûts. Le séquençage sera effectué en utilisant la technologie 10X Genomics qui est en place sur la plateforme de génomique du CLB. Les analyses d'expression différentielle des gènes entre les clusters (sous-populations) de TANs/neutrophiles présents aux différents stades seront effectuées en

utilisant le pipeline Seurat. Plusieurs approches bioinformatiques (Ingenuity Pathway Analysis, GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) à haut débit: logiciel BubbleGUM (441)) permettront d'identifier des voies de signalisation spécifiquement activées dans les sous-populations de TANs présents aux stades précoces et réprimées aux stades avancés, qui pourraient être de potentielles cibles thérapeutiques. Enfin, nous évaluerons l'impact des signatures de TANs spécifiques de chaque stade, sur la survie globale des patients (TCGA et METABRIC) et sur la réponse/non-réponse aux immunothérapies dans le mélanome métastatique (442, 443).

Une meilleure compréhension des TAN reste fondamentale notamment pour le développement de nouvelles approches d'immunothérapie. Cependant à ce jour, la cause principale de mort des patients atteints de cancer solides reste le développement de métastase (444). Un facteur important qui contribue à favoriser le processus métastatique est l'induction d'une réponse inflammatoire systémique (15, 445). Cette réponse inflammatoire observée dans la circulation sanguine est généralement déclenchée par des facteurs solubles libérés par la tumeur primitive (15, 445). Cette inflammation systémique se caractérise notamment par l'augmentation de la concentration en neutrophiles dans la circulation sanguine (neutrophilie) (15, 445), démontrant qu'une meilleure connaissance des neutrophiles circulants est également fondamentale pour proposer de nouvelles approches thérapeutiques. L'augmentation de la concentration en neutrophile, associé à une diminution de la concentration en lymphocytes (ratio NLR) est connu depuis longtemps pour être associée à un mauvais pronostic des patients atteints de différents types de cancers solides (18). De récentes études effectuées chez des patients atteints de cancer du poumon ont montré que ce mauvais impact pronostic du NLR pouvait être restreint à la concentration des neutrophiles à elle seule. En effet, une concentration sanguine élevée en neutrophiles est associée de manière significative à un mauvais pronostic (19, 20).

Outre l'aspect quantitatif, de nombreuses évidences montrent que l'évolution du cancer est associée à une modification des fonctions des neutrophiles. L'équipe de Fridlender a en effet montré chez la souris que le TGF- β produit par la tumeur pouvait induire à distance la génération de LDN immunosuppresseurs à partir de NDN (94). Les LDN sont connus pour être augmentés dans le sang de patients atteints de cancer par rapport aux donneurs sains (22, 94–97, 319). Cette notion de « priming » (ou pré-activation) des neutrophiles en systémique par la tumeur a été repris quelques années plus tard par l'équipe de Mikael Pittet. Les auteurs ont montré toujours dans un modèle murin que les ostéoblastes de la moelle osseuse préprogrammaient les neutrophiles de la moelle osseuse pour les rendre pro-tumoraux une fois dans la tumeur, sous l'action de facteurs produits par la tumeur primitive (23). Cependant, à l'heure actuelle, on ne sait pas si ce « priming » est suffisant pour rendre les neutrophiles pro-tumoraux, ou si l'ajout d'autres signaux activateurs présents

dans le microenvironnement tumoral est nécessaire. La même équipe a récemment montré dans une étude de scRNAseq (à partir de laquelle nous avons ré-analysé les données rendu publiquement accessibles par l'auteur) chez des patients atteints de cancer du poumon que les différentes sous-populations de neutrophiles identifiées dans le sang et dans la tumeur étaient bien distinctes. Ce qui suggère que les neutrophiles du sang subissent de nouvelles modifications, tout du moins à l'échelle transcriptomique, lorsque ceux-ci se retrouvent dans le microenvironnement tumoral. Par conséquent, nous pouvons faire l'hypothèse que les neutrophiles subissent un premier priming en systémique puis une activation dans la tumeur avant d'exercer leurs fonctionnalités pro-tumorales.

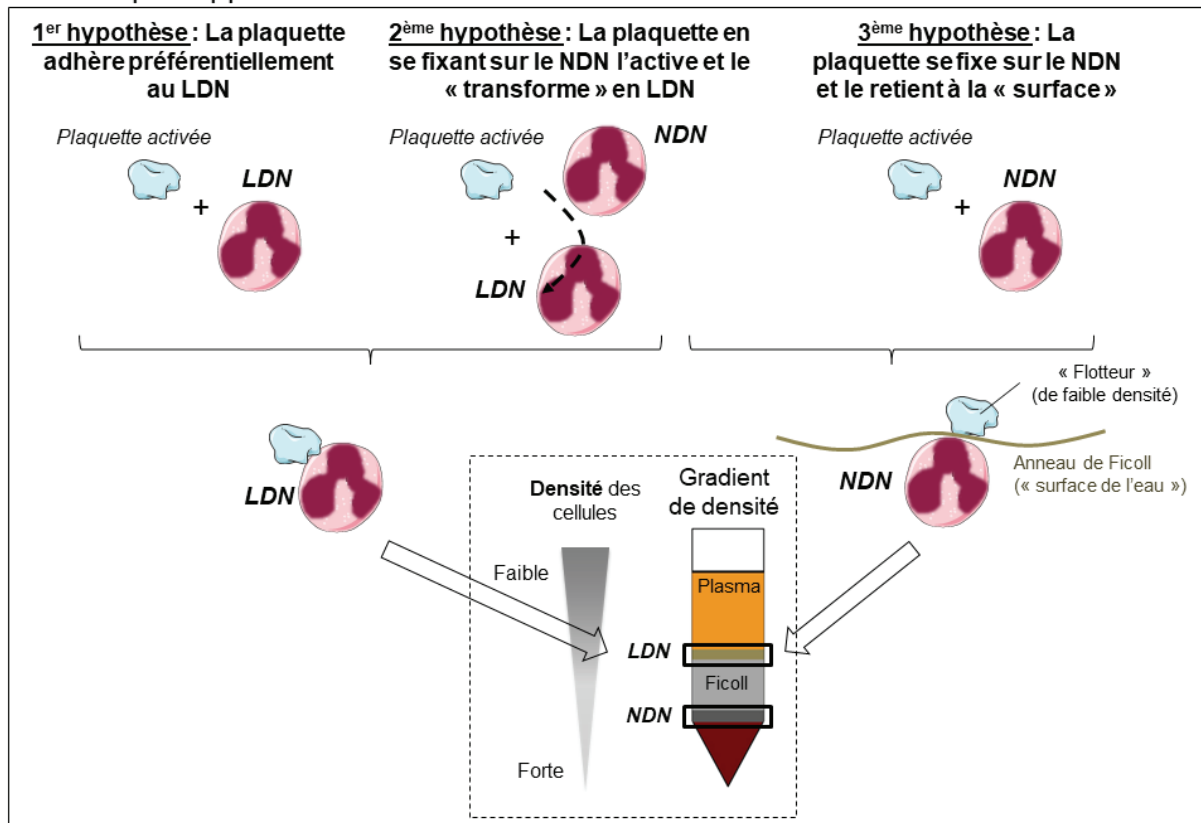
Les plaquettes, élément le plus abondant du sang, tout du moins chez l'Homme, sont connus pour interagir avec les neutrophiles formant les ANP (226, 227, 446). L'échange réciproque de molécules entre ces deux entités témoigne d'une coopération dans la régulation de leurs fonctions physiologiques respectives (223). Cependant, dans certaines conditions pathologiques, les ANP semblent être dérégulés, contribuant ainsi à l'augmentation de la sévérité de la maladie. Les rôles pathologiques des ANP reposent principalement sur l'amplification de la réponse pro-inflammatoire. A notre connaissance, à ce jour, aucune étude ne s'est intéressée au rôle des ANP dans le cancer. Nous nous sommes demandé si les plaquettes en s'associant aux neutrophiles pouvait constituer une source de « priming » des neutrophiles en systémique avant que ceux-ci se retrouvent dans la tumeur pour exercer un rôle délétère. Pour tenter de répondre à cette question, nous nous sommes tout d'abord demandé si les neutrophiles associés aux plaquettes étaient différents par rapport aux neutrophiles non-associés aux plaquettes (ou neutrophiles « libres »). Grâce à la cytométrie d'image, nous avons pu mettre en évidence que les neutrophiles agrégés aux plaquettes étaient différents des neutrophiles libres, sur la base des marqueurs CD15 et CD14. Nous reconnaissons que le nombre de marqueurs utilisés est faible et nous aurons le souci dans de futures expérimentations de rajouter d'autres marqueurs pouvant être modulés au cours de l'activation des neutrophiles comme la sélectine-L (CD62L).

La fréquence des ANP dans le sang de patients est connue pour être augmentée dans plusieurs contextes pathologiques comme la drépanocytose (226), la maladie de Kawasaki (229) ou le psoriasis (232). Cependant, dans le contexte du cancer, tout du moins chez des patients atteints de cancer du poumon, nous avons pu démontrer, pour la première fois, que la proportion d'ANP n'est pas différente par rapport à celle des individus sains. Ceci suggère que qu'il n'y a pas de formation *de novo* d'ANP dans le contexte du cancer. Nous sommes néanmoins conscients que le nombre de patients (n=4) dans notre étude reste relativement faible et nous sommes actuellement en train d'augmenter ce nombre, afin d'assurer une meilleure robustesse de nos résultats.

A première vue, nous avons été surpris de pouvoir détecter des ANP dans des données de scRNAseq ayant subi au préalable une étape de contrôle qualité permettant d'éliminer les doublets cellulaires grâce à l'outil Scrublet (447). Ce dernier identifie des doublets cellulaires sur la base de la simulation de doublets artificiels en mélangeant le transcriptome des cellules d'un cluster A avec celui des cellules d'un cluster B. Lorsque Scrublet trouve une correspondance entre un des doublets simulés et un doublet observé, il annote ce dernier comme doublet donnant la possibilité de l'éliminer. La présence de neutrophiles exprimant des gènes plaquettaires dans ces données de scRNAseq, malgré l'utilisation de Scrublet, confirmerait donc que le transcriptome des ANP est unique et qu'il ne serait pas issu de l'association d'une plaquette libre avec un neutrophile libre. Nous avons en effet identifié 16 gènes uniques aux ANP. Cependant, il n'est pas clair de qui, de la plaquette et/ou du neutrophile, sont issus ces 16 gènes. Pour tenter d'y répondre, nous proposerions grâce un trieur de cellules (FACS Aria) à partir d'une suspension cellulaire, d'isoler les ANP directement sur lame. Après fixation de l'échantillon, nous utiliserons ensuite la technologie nanoString® qui nous permettra de visualiser dans l'espace l'expression de plus de 500 gènes (448). Cette technologie permet de personnaliser son propre panel de gènes. Par conséquent, nous pourrions inclure dans ce panel les 16 gènes de notre signature spécifique de ANP avec des gènes spécifiques des plaquettes (*PPBP*, *PF4* et *NRGN*) et spécifiques des neutrophiles (*CSF3R*, *CXCR2* et *FCGR3B*) pour déterminer par co-localisation de qui de la plaquette et/ou du neutrophile, sont exprimées 16 gènes.

Nous avons également montré que les plaquettes s'agrégeaient préférentiellement aux LDN par rapport aux NDN. Pour confirmer cela, nous proposons comme expérience complémentaire chez l'Homme, une co-culture de plaquettes libres (isolées à partir du plasma de sang total) avec des LDN ou des NDN (isolés par un gradient de densité de type Ficoll) puis de mesurer la formation de nouveaux ANP entre ces deux conditions. Nous proposons **3 hypothèses** qui permettraient d'expliquer pourquoi les plaquettes s'agrégeraient préférentiellement avec les LDN plutôt que les NDN. La première hypothèse serait que les LDN ont de manière intrinsèque une plus grande affinité pour les plaquettes libres. La deuxième serait que des plaquettes activées s'agrégent aux NDN pour les activer, les convertissant ainsi en LDN. La dernière hypothèse serait que la plaquette, de part sa très faible densité, serait attachée à un NDN et jouerait le rôle de « flotteur » retenant ainsi le NDN à la « surface » du Ficoll (au niveau de l'anneau de PBMC).

Figure 15. Hypothèses tentant d'expliquer l'agrégation préférentielle des plaquettes sur les LDN par rapport aux NDN.



Grâce à l'analyse des données publique de scRNAseq de sang de patients atteints de cancer du poumon (24), nous avons pu identifier une signature spécifique des ANP sur la base de 16 gènes, tout du moins chez des patients atteints de cancer du poumon. Nous aimerions valider que cette signature puisse distinguer des ANP dans d'autres jeux de données de scRNAseq de sang de patients pour d'autres types de cancer. Cela nous permettrait donc de savoir si cette signature est dépendante ou pas du type de cancer. Il serait par ailleurs intéressant de savoir si cette signature peut distinguer les ANP dans des données de scRNAseq de donneurs sains (GSE145230) afin de déterminer si les ANP dans le cancer sont différents des ANP d'individus sains.

De façon intéressante, nous avons vu que la signature spécifique des ANP était associée à une mauvaise survie globale des patients atteints de cancer du pancréas. Cette observation nous motive à déterminer si les ANP ou les neutrophiles des ANP sont présents dans les tumeurs du pancréas. Une première façon de s'y prendre consisterait à savoir si notre signature à 16 gènes est capable de discriminer une sous-population particulière de neutrophiles dans des données de scRNAseq de tumeurs du pancréas. De plus, en collaboration avec une anatomopathologiste du Centre Léon Bérard, nous sommes actuellement entrain de constituer une cohorte rétrospective de tumeurs pancréatiques dans lesquelles nous aimerions visualiser dans l'espace l'expression des 16 gènes spécifiques des ANP et des gènes spécifiques des neutrophiles (*CSF3R*, *CXCR2* et *FCGR3B*) et des

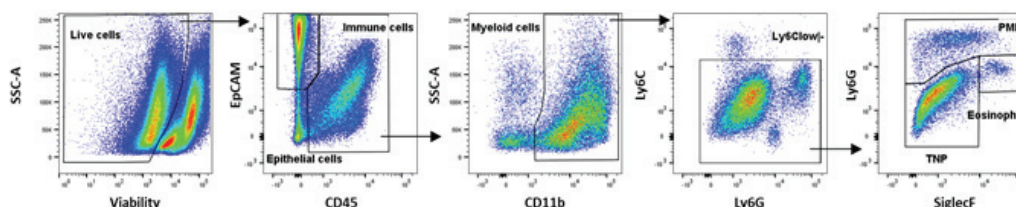
plaquettes (*PPBP*, *PF4* et *NRGN*), grâce à la technologie nanoString® (448). Cela nous permettra de confirmer que ces 16 gènes sont principalement exprimés par les ANP ou au moins par les neutrophiles, dans les tumeurs pancréatiques.

De façon moins attendue, nous avons vu que la signature spécifique des ANP était associée à un moins bon pronostic chez les patients atteints de mélanomes uvéaux. Du fait qu'il s'agisse d'un type de cancer relativement rare, mais tout de même mortel (449), à ce jour à notre connaissance, aucune étude n'a traité du rôle des neutrophiles dans ce type de pathologie. Bien qu'il demeure primordial de valider la présence d'ANP dans les mélanomes uvéaux, un tel rôle semble paradoxal avec le fait que les ANP tiennent leur origine des LDN plutôt documentés pour avoir des activités pro-tumorales (22, 94–97, 319). Cependant, les LDN restent à ce jour un ensemble de neutrophiles très hétérogènes, pour une même condition pathologique (22, 94–96) mais aussi entre différentes maladies. En effet, alors que les LDN sont plutôt anti-inflammatoires dans le cancer de par leur capacité à inhiber la prolifération des lymphocytes T (22, 95–97, 319), dans les maladies auto-immunes comme le SLE, les LDN à l'inverse sont à l'inverse plutôt pro-inflammatoires en stimulant notamment la sécrétion de IFN- γ et de TNF- α par les lymphocytes T CD4⁺ (450). Toujours dans le SLE, l'action pro-inflammatoire des LDN peut aussi s'expliquer par le relargage de NET pouvant directement induire l'apoptose des cellules endothéliales mais aussi stimuler la sécrétion d'IFN- α (451, 452). Nous pouvons donc faire l'hypothèse que dans le mélanome uvéal, les ANP sont constitués de LDN pro-inflammatoires capable d'induire la mort des cellules tumorales.

ANNEXES

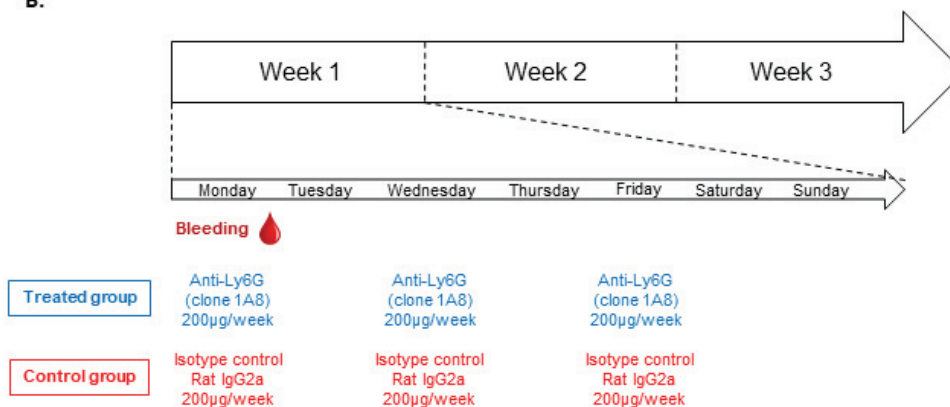
Annexe 1. Caractérisation des neutrophiles au cours de la tumorigénèse de la glande mammaire dans le modèle murin MMTV-NeuT - Matériels et méthodes.

A. Gating strategy



Antigen	Fluorochrome	Reference	Clone
Viability	Zombie Yellow	423104	
CD45	AF700	BLE103128	30-F11
EpCam	PE-Cy7	118216	G8.8
CD11b	BV711	563168	M1/70
Ly6G	FITC	551460	1A8
Ly6C	APC-Cy7	560596	AL-21
SiglecF	PE	552126	E50-440

B.



Annexe 1. Characterization of neutrophils throughout breast tumorigenesis in MMTV-NeuT mice – Materials and methods.

A. Gating strategy allowing the identification of EpCam⁺ epithelial cells ; CD45⁺ immune cells ; CD45⁺ CD11b⁺ Myeloid cells ; CD45⁺ CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{int/low} PMNs (or neutrophils) ; CD45⁺ CD11b⁺ Ly6G^{int} SiglecF⁺ eosinophils ; CD45⁺ CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C^{int/low} SiglecF⁺ Triple negative population (TNP cells). Late-stage MMTV-NeuT tumors was used as an example. Below, the cytometry antibody panel used to identify the previously listed cell types. B. Neutrophil depletion protocol over a period of 3 weeks. Treated group corresponds to mice that were intraperitoneally injected with 200µg neutrophil-depleting antibody anti-Ly6G (clone 1A8 *InVivoPlus* from BioXcell) three times a week. Control group corresponds to mice that were intraperitoneally injected with 200µg Rat IgG2a isotype control (clone 2A3 *InVivoPlus* from BioXcell) three times a week. Tail bleeding was performed every Monday to assess neutrophil depletion efficacy.

Annexe 2. Revue sur les neutrophiles dans le cancer.



Neutrophil Heterogeneity in Cancer: From Biology to Therapies

Pacôme Lecot¹, Matthieu Sarabi¹, Manuela Pereira Abrantes¹, Julie Mussard¹, Leo Koenderman², Christophe Caux¹, Nathalie Bendriss-Vermare¹ and Marie-Cécile Michallet^{1*}

¹ Department of Immunity, Virus, and Inflammation (IVI), Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Centre Léon Bérard, University of Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Lyon, France, ² Department of Respiratory Medicine and Center of Translational Immunology, University Medical Center Utrecht, Utrecht, Netherlands

OPEN ACCESS

Edited by:

Christian Jan Lood,
University of Washington,
United States

Reviewed by:

Sven Brandau,
University of
Duisburg-Essen, Germany
Maria Rosaria Galdiero,
University of Naples Federico II, Italy

*Correspondence:

Marie-Cécile Michallet
marie-cecile.michallet@
lyon.unicancer.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Cancer Immunity and Immunotherapy,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 20 May 2019

Accepted: 28 August 2019

Published: 20 September 2019

Citation:

Lecot P, Sarabi M, Pereira
Abrantes M, Mussard J,
Koenderman L, Caux C,
Bendriss-Vermare N and
Michallet M-C (2019) Neutrophil
Heterogeneity in Cancer: From
Biology to Therapies.
Front. Immunol. 10:2155.
doi: 10.3389/fimmu.2019.02155

Neutrophils have been extensively described in the pathophysiology of autoimmune and infectious diseases. Accumulating evidence also suggests the important role of neutrophils in cancer progression through their interaction with cancer and immune cells in blood and in the tumor microenvironment (TME). Most studies have described neutrophils as key drivers of cancer progression, due to their involvement in various tumor promoting functions including proliferation, aggressiveness, and dissemination, as well as in immune suppression. However, such studies were focusing on late-stages of tumorigenesis, in which chronic inflammation had already developed. The role of tumor-associated neutrophils (TANs) at early stages of tumor development remains poorly described, though recent findings indicate that early-stage TANs may display anti-tumor properties. Beyond their role at tumor site, evidence supported by NLR retrospective studies and functional analyses suggest that blood neutrophils could also actively contribute to tumorigenesis. Hence, it appears that the phenotype and functions of neutrophils vary greatly during tumor progression, highlighting their heterogeneity. The origin of pro- or anti-tumor neutrophils is generally believed to arise following a change in cell state, from resting to activated. Moreover, the fate of neutrophils may also involve distinct differentiation programs yielding various subsets of pro or anti-tumor neutrophils. In this review, we will discuss the current knowledge on neutrophils heterogeneity across different tissues and their impact on tumorigenesis, as well as neutrophil-based therapeutic strategies that have shown promising results in pre-clinical studies, paving the way for the design of neutrophil-based next generation immunotherapy.

Keywords: neutrophil (PMN), cancer, immunotherapy, MDSC (myeloid-derived suppressor cells), G-MDSC (granulocytic MDSC), tumor-associated neutrophils (TANs), subsets

CIRCULATING NEUTROPHILS IN CANCER

Aside from the molecular signals driving cancer, several studies have demonstrated the contribution of the host-driven inflammatory response to tumor progression and/or to treatment outcome (1–4). Neutrophils are key players in the inflammatory response. They are released into the bloodstream after maturation and differentiation from the bone marrow reservoir (5). The production of neutrophils has been estimated to range from 1 to 2×10^{11} cells per day at steady state in a healthy adult. Neutrophils represent 50–70% of all circulating leucocytes in humans, while they account for 10–25% in mice (6).

Neutrophil Count to Lymphocyte Count Ratio (NLR)

Circulating neutrophil counts are systematically monitored by oncologists during cancer management, owing to chemotherapy-induced neutropenia, which makes patients more vulnerable to life-threatening infections (7, 8). Availability of blood cell counts from retrospective analyses has led to numerous reviews and meta-analyses investigating the prognostic value of the neutrophil count (or preferably neutrophil-to-lymphocyte ratio, also called NLR) in both localized or metastatic contexts (9–12). Hence, over the past decade, literature on NLR has grown steadily. For instance, it is now well-acknowledged that NLR elevation is strongly associated with poor median progression-free survival (mPFS) and median overall survival (mOS) regardless of tumor type, stage of the disease or treatment (9). Interestingly, among metastatic patients, NLR has a prognostic value before chemotherapy and after subsequent lines of treatment in more advanced disease management (11). Optimal NLR cut-off values used to determine increased risk of mortality vary greatly (between 1.9 and 9.21) across studies (12). If we consider NLR as a continuous variable, each of its incremental increases in standard deviation is associated with a 35% increase in the risk of mortality. Moreover, patient follow-up duration influences NLR, as illustrated by the fact that the largest differences observed across patient prognostic groups occur within the first 12 months of follow-up (11). Beside confirming the baseline prognostic value of NLR, its early decrease following only one cycle of chemotherapy appears to be of good prognosis in multiple pathologies: (i) colorectal cancer (13, 14); (ii) mesothelioma; (iii) triple-negative breast cancer (15); (iv) docetaxel-treated patients bearing lung, prostate, head and neck or breast cancers (16); (v) advanced pancreatic adenocarcinoma; and (vi) in peripheral T-cell lymphomas (17).

Conversely, other retrospective studies did not confirm the predictive value of NLR across different randomized chemotherapy arms in colorectal cancer (18), or in advanced biliary tract carcinomas, in which low NLR values during chemotherapy were not associated with significant improvement in survival (only high NLR baseline values that decreased under chemotherapy predicted a significant better mOS) (19). NLR pretreatment values were not predictive of outcome in prostate cancer patients treated with docetaxel (20).

Variation in NLR values during targeted therapy seems to be an interesting biomarker of response in metastatic renal cell carcinoma patients (19). Templeton et al. reported a retrospective analysis of 1,199 patients treated with targeted therapies (bevacizumab, axitinib, sorafenib, sunitinib, temsirolimus) from the metastatic renal cell carcinoma database consortium and highlighted the predictive value of NLR variation between baseline (before targeted therapy commenced) and at 6 weeks (± 2 weeks). They used a validation cohort of 4,350 patients from a prospective clinical trial. Compared to no change, a decrease in NLR exceeding 25% was associated with a significant improvement in the response rate, mPFS and mOS, while an increase was predictive of poor outcome. Of note, the highest response rates were observed in groups with low baseline NLR

values that remained low at 6 weeks, though a good response rate was also reported in groups with an NLR superior to 3 which declined below 2.25 after the administration of targeted therapy (21). Similar observations were described in non-small cell lung carcinomas treated with gefitinib or erlotinib (22–24), advanced gastro-intestinal stromal tumors (25), advanced soft-tissue sarcoma treated with pazopanib (26), and hepatocellular carcinomas treated with sorafenib (27, 28).

The emergence of anti-CTLA4 and anti-PD(L)1 immunotherapies provides new hope in cancer management. However, due to an overall response rate below 40% (29, 30) and to treatment costs, stratification of patients to identify the best candidate for immunotherapy has become a challenge. Readily available total blood count has enabled the evaluation of NLR in patients receiving immunotherapy, such as in advanced melanoma in which NLR in pretreated patients was identified as an independent marker of response (31–33), even when NLR was recorded during treatment (34). Similarly, in metastatic non-small cell lung carcinomas under anti-PD-1 therapy (30, 35), higher baseline NLR values were associated with a lower response rate (36). In patients with various advanced solid tumors candidates to phase I trials combining PD-1/PD-L1 inhibitors, a low NLR was correlated with response to treatment and improved OS, but not with increased immune toxicity (37).

Cancer-associated systemic inflammation often characterized by a high NLR, associated with a poor prognosis, was thought to occur only at late stages of tumorigenesis (38, 39). Evidence also suggests that NLR may increase at early-stage (stage I and stage II, separately) before treatment, and retains its poor prognostic significance in various cancer types including colon cancer (40), tongue cancer (41), breast cancer (42), and liver cancer (43). Early systemic modifications may therefore occur at early-stages of tumorigenesis.

Discrepancies across studies may be due to the level of heterogeneity of the populations studied (e.g., primary tumor, stage of disease, patient features: medical history or concomitant medication), limitations of retrospective reports, wide variation in NLR cut-off values, as well as in the dynamic assessment of NLR during treatment, and/or a lack of specificity of NLR (neutrophil count gathering immature neutrophils that might be released in the context of inflammation and expected circulating mature neutrophils). Interestingly, studies assessing the prognostic and/or predictive values of NLR in a wide variety of conditions (disease, stages, histology, treatment...) argue in favor of its utility. This correlation of NLR with clinical outcome suggests that changes in NLR may be linked with broader modifications beyond the tumor microenvironment. Hence, beyond being a relevant clinical biomarker, increase in NLR with disease progression highlights the importance of considering the systemic environment and not simply the tumor for a deeper understanding of biological mechanisms underlying cancer progression. It is possible that the tumor itself secretes factors into the bloodstream, which thereby act on bone marrow to skew hematopoiesis toward granulocytic lineages. Tumor may also release danger/damaged-associated molecules (DAMP) that might be a target for infiltrating neutrophils. Hence, the means by

which an increase in NLR promotes cancer progression remains to be elucidated.

T-Cell Suppressive Circulating Neutrophils

Beyond their increase in the peripheral blood of cancer patients, which was associated with a poor prognosis, subsets of circulating neutrophils were reported to display tumor-promoting functions, inferring a causative role in cancer progression rather than just a consequence of the disease. The most-extensively described tumor-promoting function of circulating neutrophils remains their ability to suppress T-cell proliferation and/or activation *in vitro*. These T-cell suppressive neutrophils are classically termed granulocytic myeloid-derived suppressor cells (G-MDSCs) for both humans and mice. G-MDSCs were documented to expand in tumor-bearing hosts compared to healthy subjects (44, 45). In cancer patients, G-MDSCs are CD11b⁺ CD14⁻ CD66b⁺ CD15^{hi} expressing-cells that are enriched in the low-density neutrophils (LDNs) fraction present within the peripheral blood mononuclear cell (PBMCs) ring, unlike normal density neutrophils (NDNs), which are found in the granulocyte pellet of ficolled blood (46–49). In mice, G-MDSC correspond to CD11b⁺ Ly6C^{int} Ly6G^{hi}-expressing cells present within the spleen or the tumor (45, 50, 51), and only few studies refer mouse G-MDSCs to LDNs (44). Although LDNs are the best described neutrophil subset(s) in the blood of cancer patients, there is currently no clear LDN-specific biomarker(s). The scavenger receptor Lox1 was recently reported to be expressed by a subset of LDNs (48). Moreover, those LDNs contained both mature and immature neutrophils (44, 49). These findings suggest that LDNs remain a heterogeneous population of circulating neutrophils that need to be further characterized.

Recent studies conducted in human subjects, revealed new subsets of T-cell suppressive circulating neutrophils based on their stage of maturity. Activated mature neutrophils defined as CD11c^{bright} CD62L^{dim} CD11b^{bright} CD16^{bright} cells in healthy volunteers challenged with LPS systemically (52) and CD66b⁺ CD11b^{bright} CD16^{bright} mature LDNs in cancer patients (49) were reported to suppress T-cell proliferation. Both studies show that mature neutrophils inhibit interferon gamma production (IFN γ) by activated T-cells (49, 52). High level of CD66b⁺ CD11b^{bright} CD16^{bright} mature LDNs strongly correlated with adverse outcome in head and neck cancer (49). Interestingly, Evrard et al. demonstrated in a murine model of pancreatic cancer that the concentration of blood Ly6G^{high} CD101⁻ immature neutrophils was significantly greater in mice with a high tumor burden compared to the low tumor burden group, whereas this was not the case for mature neutrophils (53). In the same line, another group showed that the adoptive transfer of unipotent, committed human CD66b⁺ CD117⁺ neutrophil progenitor (hNeP) in immune deficient NSG-M3 mice accelerated osteosarcoma tumor growth compared with the transfer of committed monocyte progenitors (54). Surprisingly in this study, *in vitro* co-culture of either hNeP or mature bone marrow neutrophils with T-cells, activated the latter based on the upregulation of CD69, rather than inhibiting T-cell activation compared to control (54). The precise mechanisms by which

immature circulating neutrophils contribute to tumor growth remain unknown.

The suppression of T-cell proliferation by circulating neutrophils has been attributed to the release of different molecules. Reactive oxygen species (ROS) and Arginase 1 are the two most extensively described neutrophil-derived T-cell suppressive factors (46–48, 52, 55). In humans, both factors require a CD18/Mac-1 immunological synapse between neutrophils and T-cells to display suppressive functions (52, 55). Circulating neutrophils appear to suppress T-cell proliferation via reversible cell cycle arrest rather than induction of apoptosis, as the addition of l-arginine or inhibition of arginase in neutrophil/T-cell co-cultures restored T-cell proliferation in G-CSF-treated healthy donors (55) and cancer patients, respectively (49).

Circulating Tumor Cell-Escorting Neutrophils

An emerging tumor-promoting function of circulating neutrophils has recently been unveiled. Neutrophils were shown to entrap circulating tumor cells (CTCs) at metastatic sites to facilitate their extravasation thus contributing to metastasis (56–60). Recent data showed that mouse neutrophils interacted with CTCs to promote their proliferation within the bloodstream and subsequently foster metastasis (61). In breast cancer patient blood, a high level of CTC-neutrophil clusters was associated with a higher risk of developing metastases (61).

Taken together, in addition to the NLR, there is a strong rationale for routinely monitoring CTC-neutrophil clusters with the aim of evaluating their prognostic impact and predictive value in cancer patients.

PHENOTYPIC AND FUNCTIONAL HETEROGENEITY OF TUMOR-ASSOCIATED NEUTROPHILS (TANs)

Neutrophils are able to infiltrate tumor tissue and are termed tumor-associated neutrophils (TANs). In mice, TANs express CD11b⁺ Ly6C^{int} Ly6G^{hi}, whereas in humans, they are identified as CD11b⁺ CD14⁻ CD66b⁺ CD15^{hi} cells (50).

Identification and Quantification of TANs in Cancer Patients

The clinical relevance of evaluating pro- and anti-tumor functions of TANs is highly pertinent in cancer patients, since TAN infiltration was reported to predict either poor (62–66) or good prognosis (67–69). Conditions that differ between good and poor prognostic TANs will be discussed below. Although the methods of analysis of survival across studies were similar, identification of quantification methods of TANs infiltrating human tumors varied greatly. Hematoxylin & Eosin (H&E) staining remains a good approach to quantify TAN infiltration based on the unique segmented-nucleus morphology of neutrophils. Scanned-tumor slides stained with H&E are accessible from TCGA public database and have already been

used for TAN quantification (70). However, this approach may under-estimate the potential infiltration of immature neutrophils since the banded-nucleus morphology of immature neutrophils is less distinguishable from other immune cells.

TAN infiltration can be also quantified through immunostaining, using antibodies against markers of neutrophils, such as CD66b and CD15. Neutrophils and eosinophils share numerous markers as they are closely related ontologically speaking, and very few studies took this confounding effect into account. Evidence showed that CD66b is expressed at the same level between eosinophils and neutrophils in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis (71). For CD15 (Sialyl-Lewis X), although expressed on both eosinophils and neutrophils, data showed that it is 10–100 times higher on neutrophils than eosinophils (72). CD15 would therefore be more reliable to distinguish neutrophils from eosinophils, although the search for differentially expressed markers between these two cell types is strongly needed. Some studies also used myeloperoxidase (MPO), neutrophil elastase, CXCR2, or CD33 to identify TANs in human tumors. However, such markers are not specific to TANs and are shared by other immune cells (45, 73–76) or even tumor cells, such as CXCR2.

Bioinformatics approaches inferring the fractions of tumor-infiltrating immune cells from bulk tumor RNAseq data have recently emerged (77). The most classical approach for quantifying neutrophil infiltrate relies on single marker genes specific to neutrophils, such as CSF3R. Different groups have used this approach to classify tumors based on CSF3R expression (78, 79). Other approaches using multiple gene signatures have come to light. Although signatures slightly differ from one another study, algorithms processing these signatures vary greatly. For instance, single sample Gene Set Enrichment Analysis (ssGSEA) was recently used for the stratification of lung cancer patients based on the gene signature of a newly identified pro-tumor neutrophil population. CIBERSORT was used for quantifying neutrophil infiltrate in human tumor based on a signature composed of genes highly expressed in blood neutrophils compared to other blood leukocytes (80, 81).

Pro-tumor TANs

In both murine and human diseases, TANs are mostly described for their ability to promote tumor progression through different mechanisms, such as tumor cell proliferation. Mouse Gr1⁺ myeloid cells secrete interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RA), which were shown to antagonize the anti-tumor effects of cellular senescence in a murine model of PTEN^{-/-} prostate cancer (82). Neutrophil elastase (NE), a protease secreted by neutrophils, accesses the endosomal compartment of tumor cells. There, it degrades the insulin receptor substrate 1 (IRS-1) which increases the interaction between PI3K and PDGFR, thereby promoting their proliferation in a LSL-K-ras model of murine lung adenocarcinoma and in human lung adenocarcinoma cell lines (83). Interestingly, the authors identified in human lung adenocarcinoma an inverse correlation between NE and IRS-1. Neutrophil-derived leukotrienes were also reported to selectively expand the subset of cancer cells that retained high tumorigenic potential (84). Accumulating evidence supports an important

role for neutrophil extracellular traps (NETs), composed of DNA, that are associated with proteins such as NE and foster cancer progression. Mechanistically, neutrophils secrete HMGB1 during NETosis, thereby activating the TLR9 signaling pathways in cancer cells to promote their adhesion, proliferation, migration, and invasion (59). A more recent study reported that NET-derived DNA could act as a scaffold for the neutrophil DNA-associated NE and MMP9 proteins during laminin-111 (matrix protein) remodeling which activated downstream integrin $\alpha3\beta1$ signaling in disseminated, dormant cancer cells converting them into aggressive lung metastatic cancer cells (85). In addition to their role in tumor cell proliferation, NET-derived molecules such as Cathepsin G (CG) and NE were reported to promote invasion and migration of breast cancer cells (86). Indeed, NETs were observed by intravital imaging *in vivo* in the murine 4T1-derived lung metastasis model. This finding was transferable to humans as they identified the deposition of NETs in triple-negative breast tumors. Recent evidence also implicates neutrophils in the induction of the epithelial to mesenchymal transition (EMT) by sustaining the expression of the EMT transcription factor Snail in cancer cells (87) or via the secretion of the tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP-1) (88), which thereby facilitates metastatic progression. Evidence also suggest that neutrophils could favor angiogenesis and support tumor growth as neutrophil depletion was associated with a decreased number of developed vessels and a lower tumor weight (89). Pro-tumor TANs supporting angiogenesis, were reported to express high level of the proangiogenic factors VEGF and MMP9 in a mouse model of melanoma (89) and in liver tumorigenesis in zebrafish (90). Other groups support the fact that VEGF is highly expressed by pro-tumor TANs and may thus actively promote angiogenesis in mice (91, 92). Evidence in humans showed that fMLF-activated neutrophils induced sprouting of capillary-like structures via VEGF in an *in vitro* angiogenesis assay (93). Another group showed that human neutrophils could promote angiogenesis through NETs (94). In human gastric cancer, tumor cells were showed to make neutrophils produce MMP9, which significantly promoted angiogenic tube formation (95). Further studies in humans will be required to support the idea that proangiogenic neutrophils could promote tumor progression. In contrast, new evidence showed that TANs could foster cancer progression by altering angiogenesis instead, increasing hypoxia which in turn stabilizes the Snail EMT transcription factor, but also contributes to inhibit anti-tumor adaptive immunity (87). Moreover, evidence showed that neutrophils could impair angiogenesis by secreting antiangiogenic factors such as the isoform of VEGF-A, namely, VEGF-A_{165b} (96, 97).

TANs can also promote tumor progression by interacting with immune cells. TANs were mainly described for their ability to dampen T-cell-mediated anti-tumor immunity. In mice, depending on the tumor model, different TAN-derived soluble factors were reported to suppress proliferation and IFN γ production of intra-tumor CD8⁺ T-cells, such as ROS (91) or nitric oxide (NO) produced by inducible nitric oxide synthase (iNOS) (98). The soluble enzyme arginase 1 derived from tumor-infiltrating myeloid cells was also suggested to mediate T-cell suppression (99). A recent single cell transcriptomic study across

human and mouse lung tumor-infiltrating immune cells showed that arginase 1 was mostly expressed by TANs and tumor-associated macrophages (TAMs) (100, 101). Unlike human blood neutrophils, evidence in mice showed that TANs do not secrete arginase 1 but rather seem to retain it in the cytoplasm to deplete L-arginine intracellularly (99, 102). Other TAN-soluble factors were reported to induce T-cell apoptosis via the secretion of tumor necrosis factor alpha (TNF α) and NO (103). Lately, Fas-Ligand (Fas-L) was shown to be expressed at the cell surface of TANs, leading to T-cell apoptosis in tumors resistant to T-cell based immunotherapies (104).

Anti-tumor TANs

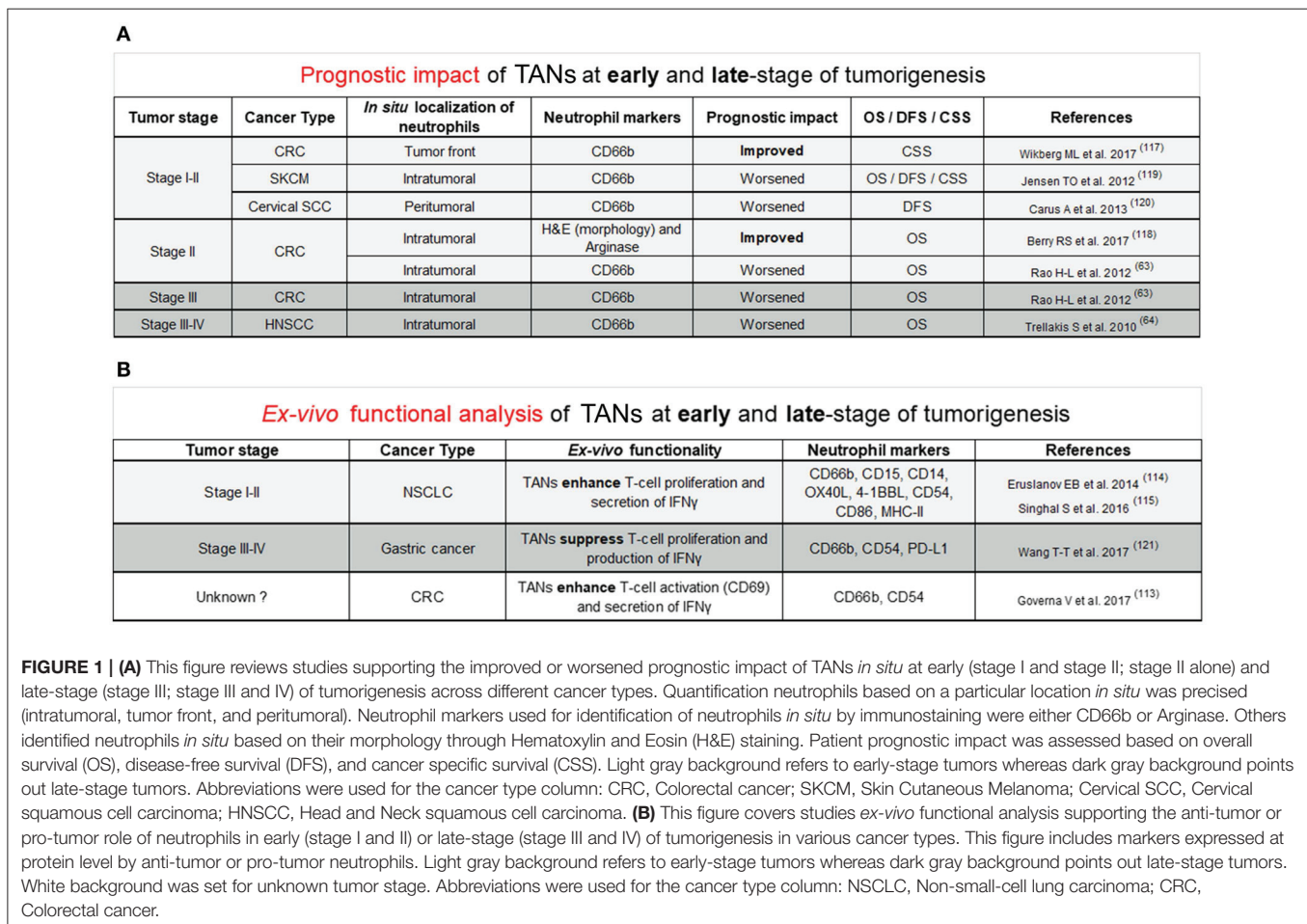
Though largely believed to be pro-tumor, accumulating evidence suggests that TANs also play a role in anti-tumor immunity. Indeed, TANs appear to induce direct tumor cell apoptosis by secreting cytotoxic molecules such as ROS (91, 105). Neutrophil-derived extracellular DNA (NETs) were also reported to induce tumor cell death (106). Another intriguing anti-tumor property of TANs was recently identified. TANs were found to promote the detachment of tumor cells from the basement membrane at an early stage of mouse uterine carcinogenesis, a process known as tumor cell sloughing leading to tumor cell death (78). Accumulating evidence suggests that neutrophils may kill antibody-opsonized cancer cells via antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC), which involves Fc receptors (107–110). Recently, an original mechanism of ADCC, a process termed trogoptosis, was described (111). Indeed, neutrophils establish a synapse with cancer cells, which strongly depends on neutrophil CD11b/CD18 integrins, allowing neutrophils to ingest a fraction of the antibody-opsonized plasma membrane of cancer cells (trogocytosis). A mechanical disruption of the plasma membrane concomitantly occurs, leading to a lytic/necrotic form of cell death. In sharp contrast with the other ADCC-related cytotoxic mechanisms mostly described in NK cells, trogoptosis is independent of granule exocytosis and of the phagocyte NADPH oxidase. Lastly and more importantly, intravital imaging demonstrated that trogoptosis occurs *in vivo* in mice (111).

Another anti-tumor role for TANs in mice and humans was uncovered with their implication in the recruitment and activation of intra-tumor CD4⁺ and cytotoxic CD8⁺ T cells (91, 112). A recent study conducted in mice genetically deficient for Tollip, an innate immunity signaling adaptor molecule inhibiting the TLR signaling pathway and potentially other pathways, led to the upregulation of STAT5 and STAT1. This in turn upregulated the co-stimulatory CD80 and downregulated the immune checkpoint PD-L1, specifically in TANs (112). These molecules are both important for T-cell proliferation, IFN γ and granzyme B production. Adoptive transfer of Tollip-deficient neutrophils slowed down colitis-associated cancer progression, thus highlighting a role for Tollip in modulating TAN-mediated cancer immune surveillance (112). In human colorectal cancer, CD66b⁺ TANs stimulate proliferation and induce secretion of IFN γ from CD8⁺ T cells *in vitro* (113). Moreover, CD66b⁺ TANs frequently co-localize with CD8⁺ T-cells in tumor tissue (113). At an early stage of human lung tumors, TANs were put forward as T-cell antigen presenting cells (APCs), with a high

capacity to stimulate T-cell proliferation and IFN γ production (114, 115). A recent study conducted in a murine sarcoma model showed that TANs acting in concert with macrophages, were essential for unconventional $\alpha\beta$ T cell type 1 polarization to display anti-tumor potential *in vivo* by secreting IFN γ (79).

TAN Subsets

With such functional heterogeneity of neutrophils, one could hypothesize that different subsets of TANs may be involved. Previous studies on blood and bone marrow neutrophils led to the discovery of new cell-surface markers to distinguish mature from immature neutrophils. Recent evidence showed that both mature and immature neutrophils can infiltrate mouse and human tumors, and were either reported to promote or prevent tumorigenesis (53, 54, 115, 116). Density could also discriminate a subset of blood neutrophils, known as LDNs, isolated by density gradient centrifugation. This method is suitable for blood samples, though its application to tumor samples may not be possible, which remains to be investigated. The search for cell-surface biomarkers of LDNs is thus needed to evaluate the relevance of LDNs in tumors. The previously identified Lox1 marker specific to a subset of LDNs was validated *in situ* in melanoma, colon, head and neck, and non-small cell lung cancer (48). But it remains to be verified if lox1 is not intracellularly expressed by all neutrophils. Characterization of TAN subsets based on cell-surface antigens remains limited to a dozen markers, making the comparison of neutrophil subsets across tissues difficult. Therefore, it remains therefore unclear whether immature blood neutrophils are identical to immature TANs. To further characterize subsets of TANs, transcriptomic profiling of neutrophils is strongly required. A recent single cell transcriptomic study performed in lung cancer patients showed distinct subsets of TANs and blood neutrophils with few overlaps between tissues (101). Whether such a difference can be attributed to differences in processing or isolation of neutrophils between tumor tissues and blood, or whether it is a true biological difference between tissues, remains to be addressed in future investigations. This study demonstrated that different subsets of TANs may co-exist in the same tumor, some being preferentially enriched, while certain TAN subsets seem to be found exclusively either in healthy or tumor tissue (101). The authors also sequenced at the single-cell level TANs from murine lung tumors (101). Unbiased comparison between mouse and human TANs showed conserved subsets allowing scientists to test the functional relevance of distinct subsets in tumor progression and response to therapies in murine models, and eventually apply finding to cancer patients. The work of Zilionis et al. unveiled TAN heterogeneity in the lung tumor context and it remains to be determined whether the same applies other tumor types. Another major ongoing issue is TAN ontogeny, and future investigations are needed to decipher whether TAN subsets correspond to transitional cell states referring to the concept of polarization or whether they are terminally-differentiated distinct cell types, and if TANs present in the tumor microenvironment are derived from circulating G-MDSCs.



TANs in Early vs. Later-Stage Tumors

Evidence in mice supports this idea that the pro- and anti-tumor role of neutrophils may be strongly linked to tumor stage. Mice with genetic deficiency of G-CSF-R displayed an accelerated tumor initiation at early-stage in a spontaneous murine model of uterine carcinogenesis (78) and 3-methylcholanthrene (3-MCA)-induced sarcomagenesis (79), attesting an anti-tumor role at early-stage of tumorigenesis. In contrast, antibody-mediated neutrophil depletion in established tumors at late-stage, led to decreased tumor growth, supporting a pro-tumor role at late-stage (84, 98).

In humans, evidence for pro- and anti-tumor functions of TANs arose from retrospective studies assessing the prognostic value of tumors highly infiltrated with neutrophils (Figure 1A). The prognostic impact of TANs remains controversial as they are associated with either a better or worse outcome. Such discrepancies can be explained by the cancer type, the *in situ* location (peritumoral, intratumoral, or stromal) of neutrophils but also by differences in staining methods such as haematoxylin/eosin (HE), neutrophil elastase (NE), Arginase, MPO, CD66b, or CD15 surface markers. New evidence suggest that the tumor stage may also explain such

differences (Figure 1A). In colorectal cancer (CRC) patients, the good prognostic impact of TANs is described in early-stage colorectal tumors, especially stage I-II tumors combined (117), or stage II alone (118). Only one study in CRC patients showed that a high intratumoral infiltration of TANs was associated with a worse overall survival (63). The worse prognostic impact of TANs in early-stage tumors was reported in melanoma (119) and cervical squamous cell carcinoma (120). In late-stage tumors, especially in CRC and head and neck squamous cell carcinoma, the prognostic impact of TANs is generally poor (63, 64). To our knowledge, there is no study reporting a good prognostic significance of TANs in late-stage tumors.

Other evidence supporting the link between anti- or pro-tumor function of TANs with the tumor stage came from *ex vivo* functional analysis of TANs (Figure 1B). In gastric cancer patients, TANs isolated from fresh tumors co-cultured with purified autologous peripheral blood CD3⁺ T cells displayed higher immunosuppressive function than neutrophils from healthy adjacent tissue (121). In this study, T-cell suppression is partially explained by PD-L1 expression on TANs since PD-L1 blocking antibodies reverse T-cell proliferation (121). Interestingly, the authors showed that PD-L1⁺ TANs were

significantly higher in advanced (stages III–IV) vs. early-stage tumors (stage I–II), suggesting that pro-tumor PD-L1⁺ neutrophils only emerge at a later-stage of gastric tumorigenesis. Further investigations will be needed to confirm the predominance of pro-tumor TANs in late-stage gastric tumors compared to early-stage tumors. In sharp contrast, in lung cancer patients, TANs, not peripheral blood neutrophils, from early-stage tumors (stages I–II), were reported to enhance the proliferation of autologous T-cells stimulated with anti-CD3/CD28 antibodies (114, 115), suggesting an anti-tumoral function. Nevertheless, the improved prognostic impact of TANs in early-stage lung tumors remains to be assessed. In CRC, co-culture of human TANs from colorectal tumors with autologous CD8 T-cells resulted in an increased expression of the CD69 T cell activation marker and a higher release of IFN γ in culture supernatant (113). However, it remains to be determined if these CD8 T-cell-stimulatory TANs are enriched in early-stage colorectal tumors as compared to late-stage tumors. In line with the CD8 T-stimulatory anti-tumor role of neutrophils in CRC, the majority of studies on favorable outcome of TANs in early-stage tumors are in CRC (Figure 1A). Thus, it cannot be excluded that not tumor stage but rather tumor type (and possibly involvement of microbiota), is responsible for this observation, in CRC. Human undifferentiated pleomorphic sarcomas (UPS) recently emerged as another type of cancer in which dense neutrophil infiltrate was found to be associated with better prognosis, regardless of tumor stage (79). The search for cancer type-specific features, especially in CRC and UPS will be the object of future investigations to potentially identify new factors important for the stimulation of anti-tumor neutrophils.

ORIGIN OF PRO- AND ANTI-TUMOR NEUTROPHILS

Having reviewed the heterogeneity of pro- and anti-tumor neutrophils in cancer, it is necessary to discuss their origin.

Neutrophil Activation

The anti- or pro-tumor properties of neutrophils often result from the activation of neutrophils. Neutrophil-derived NETs were previously described to have both pro (85) and anti-tumor properties (106). *In vitro*, NETs can be generated upon acute stimulation of neutrophils with lipopolysaccharide (LPS), Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (fMLF formerly termed fMLP) (83, 106, 122) in both human and mice. Whereas, PMA or fMLF was sufficient to induce NETs (122). Mechanistically, LPS-stimulated platelets via TLR4 which in turn led to the activation of neutrophils thus leading to NETosis. Other platelet activators such as thrombin were found to be equally efficient in producing NETs in presence of platelets (123). The mechanism by which activated-platelets promote NETosis is still not clear and will require further investigations. Cancer cell-derived soluble molecules such as G-CSF were also suggested to induce NETs (86). The engagement of the Fc-alpha receptor (Fc α RI/CD89) (124) or Fc-gamma receptor (Fc γ RIIIB/CD16) (125) was also

reported to induce NETs. Neutrophil-derived NET formation is not restricted to *in vitro* stimulation, as it can be reproduced in mouse blood following acute systemic sepsis (58) and in mouse lung tumor after chronic nasal instillation of LPS (84). Neutrophils were also described to display T-cell suppressive functions. Both mouse and human neutrophils acutely stimulated by high doses of IFN γ , up-regulate T-cell suppressing ligands such as PD-L1 which in turn decrease T-cell proliferation (115, 126). The acute induction of endoplasmic reticulum (ER) stress upon thapsigargin (THG) stimulation in human circulating neutrophils was reported to convert these cells into T-cell suppressive G-MDSCs, notably by inhibiting T-cell proliferation (48). Interestingly, in contrast to THG treatment, fMLF and PMA-stimulated neutrophils did not block T-cell proliferation. Instead, PMA-stimulated neutrophils appear to have T-cell suppressive effects by inhibiting the production of T-cell derived IFN γ (127). Activation of the complement receptor 3 (MAC-1/CD11b) signaling pathway also seems important for the induction of T-cell suppressive neutrophils (128).

The engagement of Fc-receptors on neutrophils constitutes another way of activating neutrophils and was reported to lead to killing of antibody-opsonized cancer cells by ADCC *in vitro* (109, 111) and *in vivo* (111). Interestingly, neutrophils were shown to induced ADCC more efficiently with IgA antibodies in comparison to IgG antibodies (107, 108, 110). Using hFc α RI transgenic mice, IgA anti-EGFR antibodies were proven to mediate tumor cell killing *in vivo* (129). Recent evidences support the idea that ADCC could occur *in vivo* as revealed by intravital imaging (111). Taken together, direct acute or chronic stimulation of neutrophils seems to be sufficient to transform naïve neutrophils into pro- or anti-tumor neutrophils. Collectively, neutrophil activation may in turn lead to a variety of pro- and anti-tumor function depending on type, dose of activator, time of stimulation, and tumor model.

Neutrophil Differentiation

By definition, differentiation implies the development of a given progenitor toward several different mature cells with distinct cell fates. Depending on environmental cues, neutrophil progenitors were reported to differentiate into different subsets of neutrophils with either pro- or anti-tumor functions (115, 130, 131).

Mounting evidence indicates that IFN γ and GM-CSF, two cytokines abundantly present in early-stage human lung tumors, are essential for the differentiation of CD11b⁺ CD15^{hi} CD66b⁺ CD16^{int/low} CD10⁻ bone marrow neutrophil progenitors into anti-tumor CD10⁺ mature MHC-II⁺ antigen presenting neutrophils, known as “APC-like hybrid neutrophils” (114, 115). Surprisingly, besides expressing APC markers, this TAN subset was shown to express markers of monocytes such as CD14. Both IFN γ and GM-CSF downregulate the expression of the Ikaros transcription factor, known to negatively regulate the development of monocytes/macrophages which may explain the acquisition of CD14 (132, 133). Interestingly, the Ikaros inhibitor, lenalidomide, synergizes with IFN γ and GM-CSF to generate APC-like hybrid neutrophils, but is unable to do so alone, suggesting that other pathways activated by IFN γ and GM-CSF are necessary for this differentiation, though

these latter remain to be unraveled. Moreover, the authors showed that APC-like hybrid neutrophils could also be generated from CD11b⁺ CD15^{hi} CD66b⁺ CD16^{int/low} CD10⁻ low-density immature peripheral blood neutrophils from G-CSF-treated healthy donors (115). Since neutrophil progenitors may also circulate in the bloodstream of cancer patients (54, 55), it is therefore possible that circulating neutrophil progenitors are recruited at the tumor site to differentiate into APC-like hybrid TANs. Neutrophil progenitors used for the generation of APC-like hybrid neutrophils were isolated from bone marrow of cancer patients or from peripheral blood of G-CSF-treated healthy donors (115). It therefore remains unclear whether systemic priming of neutrophil progenitors by tumor-secreted factors, including G-CSF is a prerequisite for their differentiation into APC-like hybrid neutrophils upon exposure to IFN γ and GM-CSF at tumor site.

Recent evidence supports the concept that neutrophils need to be primed systemically to differentiate into pro-tumor TANs. A recent study in mice showed that the differentiation of bone marrow-derived hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) into pro-tumor SiglecF⁺ TANs (130) required bone marrow osteoblasts. Indeed, *in vivo* cell fate mapping experiments showed that the differentiation of SiglecF⁺ TANs from bone marrow c-Kit⁺ HSPCs was abrogated in osteoblast-deficient mice, suggesting that the bone marrow is essential for the priming of pro-tumor SiglecF⁺ TANs. Extra-medullary tissues such as the spleen were also necessary for the differentiation of HSPCs into T-cell suppressive TANs (131). Splenectomy was indeed reported to blunt T-cell suppressive functions of TANs and synergistically enhanced anti-PD-L1 therapeutic efficacy. Mechanistically, the spleen of tumor-bearing mice mediates the recruitment of circulating HSPCs through CCL2/CCR2 axis, which then differentiate into T-cell suppressive G-MDSC via splenic stromal-derived GM-CSF. This is in line with previous studies showing that T-cell suppressive G-MDSCs expand in the spleen, which is most often characterized by splenomegaly (134). Collectively, although evidence in mice suggests that the systemic environment such as the bone marrow and the spleen are necessary for the differentiation of neutrophil progenitors to pro-tumor TANs, it is still unclear whether this systemic priming is sufficient for differentiation to pro-tumor TANs or whether it requires additional cues at tumor site for example, remains unknown.

In humans, systemic priming appears to be necessary for the generation of T-cell suppressive neutrophils. Indeed, a study recently showed that mature CD10⁺ neutrophils from G-CSF-treated healthy donors display T-cell suppressive properties *ex vivo*, whereas those from untreated healthy donors did not. Interestingly, CD10⁺ neutrophils from untreated healthy donors treated with G-CSF *in vitro* did not display any suppressive activities (55). This suggests that, in humans, G-CSF alone is not sufficient to induce T-cell properties on neutrophils and thus requires other probably systemic cues.

The tumor may also alter the differentiation of neutrophils for its own benefit, by interfering with their maturation toward an anti-tumor phenotype. This concept was initially demonstrated

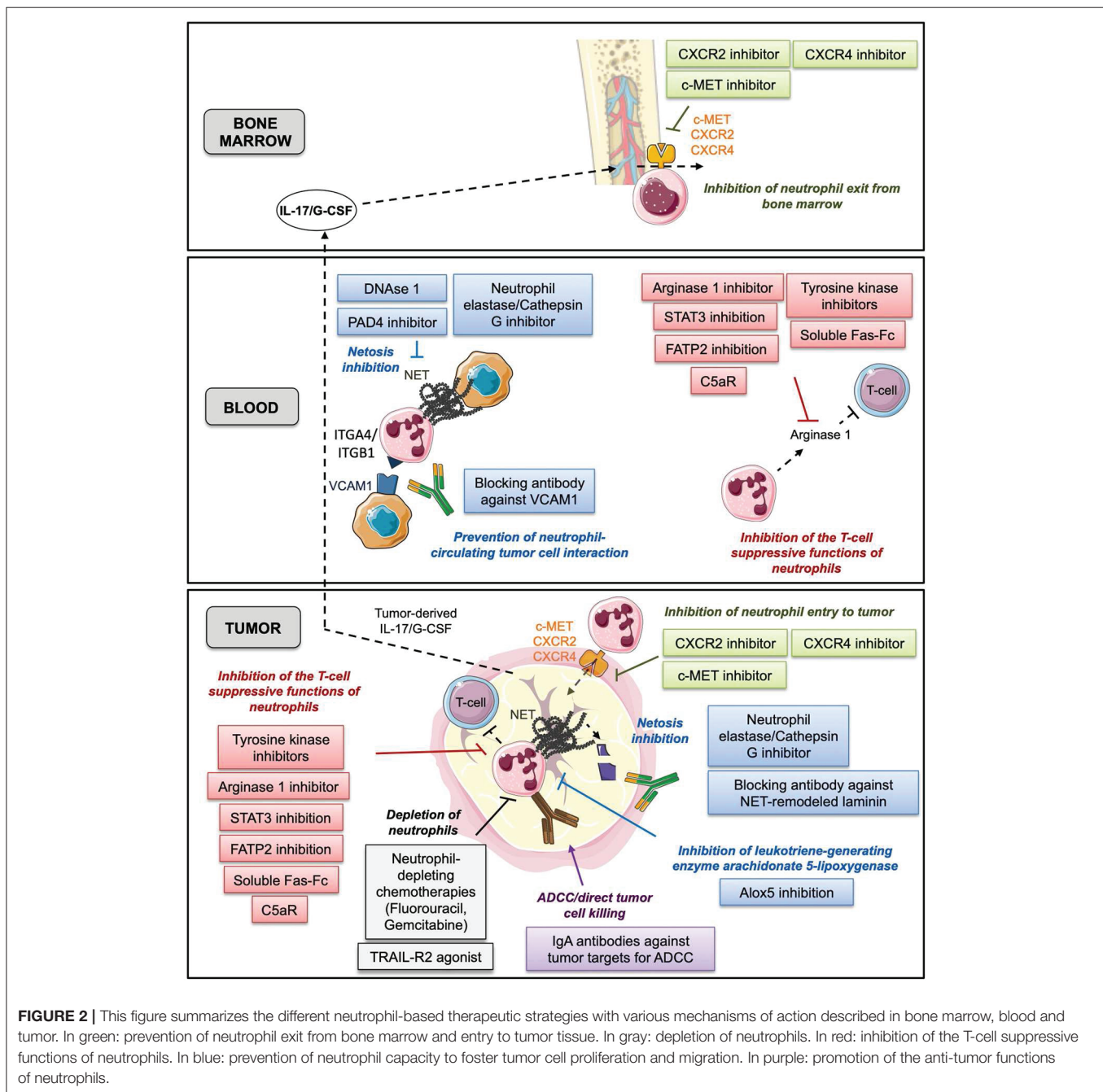
for tumor-infiltrating monocytes. Here, the maturation into anti-tumor macrophages was blocked leading to promotion of tumor growth in a murine model of hepatocellular carcinoma (HCC) (135). Accumulating evidences in humans and mice suggest that immature neutrophils infiltrate tumors, retain their immature phenotype at the tumor site and are correlated with a higher tumor burden (53, 54, 98, 116). Aside from the hypothesis that interfering with neutrophil maturation could alter their differentiation into anti-tumor neutrophils, this data suggest that at least some neutrophil progenitors may also have a naturally occurring T-cell suppressive function *per se*. Indeed, immature bone marrow neutrophils from healthy donors were reported to display spontaneous T-cell suppressive properties, although this remains to be confirmed in further studies (54). The biological characterization of immature TANs and their clinical implication should be the subject of future investigations.

NEUTROPHIL-BASED THERAPEUTIC STRATEGIES

Since neutrophils display various tumor-promoting functions and are predictive of poor patient OS, one potential therapeutic strategy could be the targeting of neutrophils *in vivo*. Pre-clinical studies in the mouse have already reported therapeutic effects of neutrophil depletion using the specific neutrophil-depleting antibody, anti-Ly6G (84, 87, 98, 104). Here, we review the different therapeutic strategies that aimed at targeting neutrophils in cancer (Figure 2).

Prevention of Neutrophil Exit From Bone Marrow and Entry to Tumor Tissue G-CSF/IL-17 Axis Modulation

A number of studies in mice have suggested modulating the level of G-CSF to prevent the expansion of pro-tumor neutrophils. In mice, ablation of G-CSF with anti-G-CSF antibodies was also shown to prevent neutrophil accumulation in bloodstream (61, 98, 136), whereas overexpression of G-CSF induced the expansion of circulating neutrophils and increased metastasis (61, 136, 137). Although G-CSF is being used to stimulate the production of neutrophils in patients who suffer from chemotherapy-induced neutropenia (138), it remains unclear if endogenous G-CSF is responsible for neutrophilia observed in cancer patients. Few studies reported a higher level of serum G-CSF in patients with pancreatic cancer (139), colorectal cancer (140) and non-small cell lung cancer (141), as compared with healthy subjects. None of these studies showed an association between high serum G-CSF concentration and neutrophilia. Only few case report studies reported a link between a high endogenous serum G-CSF level and an increase of white blood cell count consisted primarily of neutrophils (142–144). Taken together, the role of endogenous serum G-CSF as a dominant driver of neutrophilia in cancer patients remains weak. Furthermore, endogenous serum G-CSF levels has not been linked to poorer prognosis to date. Noteworthy, exogenous therapeutic G-CSF does not seem either to worsen survival of cancer patients treated with chemotherapy (145, 146).



Interleukin-17 (IL-17) recently emerged as an upstream regulator of G-CSF and subsequently of neutrophil production *in vivo* (98, 147, 148). In a murine model of lung metastasis, neutralization of IL-17 significantly reduced the level of G-CSF and prevented the systemic expansion of blood neutrophils. Interestingly, studies report an increase of IL-17 in the blood of patients with liver cancer (149), non-small cell lung cancer (148, 150, 151). High level of serum IL-17 was even associated with a worse prognostic for non-small cell lung cancer patients (150, 151). Nevertheless, the link between level of serum IL-17 and neutrophilia remains to be investigated in future studies.

CXCR2/CXCR4 Inhibition

CXCR2 is known to be important for neutrophil migration, controlling their egress from the bone marrow to the bloodstream and their recruitment to sites of inflammation (152–155). Neutrophils acquire CXCR2 to exit bone marrow (153, 154). The genetic or pharmacological inhibition of CXCR2 was reported to decrease primary lung tumor growth (156, 157) and suppress pancreatic cancer metastasis in mice (157). In both studies, specific depletion of Ly6G⁺ neutrophils recapitulated the therapeutic effect of CXCR2 inhibition. CXCR2 inhibition was followed by an increase in circulating neutrophils due to their

inability to home (156, 157). Although some evidence indicates that CXCR2 inhibition could prevent recruitment of CD11b⁺ Gr1⁺ myeloid cells in PTEN^{-/-} prostate tumors (82), it remains unclear whether Ly6G⁺ neutrophil infiltration at the tumor site is impaired. Since therapeutic effects of CXCR2 inhibition may also be explained by its direct action on tumor cells (158–160), future studies are needed to determine the contribution of neutrophils to CXCR2 inhibition-related therapeutic effects. This would provide a rationale for using CXCR2 as a potent inhibitor of neutrophil recruitment.

CXCR4 was reported to act antagonistically with CXCR2 for bone marrow exit of neutrophils (153, 154, 161). Neutrophils lose CXCR4 to egress from the bone marrow to be released in the circulation (154, 161). However, CXCR4 acquisition seems important for infiltration of neutrophils into the tumor, at least in a preclinical model of colorectal cancer. Hence, blockade of CXCR4 using the FDA-approved agent Plerixafor (AMD3100) inhibited anti-VEGFR2 therapy-induced tumor infiltration of neutrophils and Ly6C^{low} monocytes (162). Increasing number of studies report the therapeutic effects of inhibiting CXCL12/CXCR4 axis by targeting cancer and stromal cells from the tumor microenvironment (163). Very few studies looked at the effects of CXCR4 blockade on tumor-infiltrating immunosuppressive myeloid cells including neutrophils and it remains the object of future investigations. Taken together CXCR4 inhibition appears to be an interesting strategy when used in combination with chemotherapy. This by preventing neutrophils from entering into the tumor while mobilizing bone marrow neutrophils which could compensate chemotherapy-induced neutropenia classically managed by G-CSF injection. Hence, several pre-clinical studies showed the additive therapeutic effects of CXCR4 inhibition with chemotherapies (164–166).

C-Met Inhibition

Capmatinib, an inhibitor of the tyrosine-protein kinase MET (c-MET), was first developed to treat cancer patients with alterations affecting the c-MET pathway in cancer cells due to activating mutations, overexpression, gene amplification, and translocations (167). Interestingly, capmatinib potentiated therapeutic effects of adoptive T-cell transfer and checkpoint immunotherapies in several mouse models of cancer by preventing the reactive mobilization and recruitment of T-cell suppressive neutrophils to tumors and draining lymph nodes (126). Importantly, the therapeutic effect was restricted to c-MET signaling in neutrophils as the genetic ablation of c-MET kinase activity specifically in neutrophils could reproduce the same effect. Moreover, tumor cell lines were insensitive to capmatinib *in vitro* and *in vivo*, excluding any tumor cell-intrinsic c-MET dependency in this study. Another study showed that capmatinib also prevented the recruitment of anti-tumor TANs (168) in different tumor models. Whereas, cancer cell lines knocked down for c-MET had a slower tumor growth rate in mice, the addition of capmatinib countered the therapeutic effect of c-MET knockdown, suggesting that TME-expressing c-MET were involved in the anti-tumor response. TANs appeared to express c-MET which is essential for their recruitment at the tumor site

and thereby activation of their anti-tumor function. These studies therefore argue in favor of evaluating the expression of c-MET in both tumor cells and neutrophils in cancer patients who receive capmatinib treatment.

Depletion of Neutrophils

TRAIL-R2 Agonist Antibody

An agonistic antibody of the TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor 2, known as TRAIL-R2, was proposed to induce cell death of mouse G-MDSC *in vitro* and to potentiate the effect of CTLA-4 immune checkpoint blockade *in vivo*. A recent first-in human clinical trial evaluated the clinical impact of targeting TRAIL-R2. In cancer patients with elevated levels of LDNs before treatment, the TRAIL-R2 agonist antibody selectively depleted LDNs without impacting the number of other peripheral blood myeloid and lymphoid cells, nor showing dose-limiting toxicities (169). However, the selective depletion of LDNs could not be sustained up to 28 days after the start of the treatment. Due to short-term treatment and the small number of patients in the cohort, further studies will be needed to conclude on the selective depletion of LDNs upon TRAIL-R2 agonist antibody treatment.

Chemotherapies

Aside from their potential cytotoxic effects on tumor cells, studies in mice revealed that some chemotherapies may also have side effects on immune cells, including neutrophils. Indeed, fluorouracil (5FU) was reported to have anti-tumor effects *in vivo* in mice and was associated with depletion of splenic and tumor G-MDSCs and monocytic MDSCs (M-MDSCs) (170). In this study, the therapeutic efficacy of 5FU regarding tumor immunity was suggested to most likely be restricted to M-MDSC-depletion since 5FU did not deplete any other immune cell type, nor induce immunogenic tumor cell death. Nevertheless, the same group reported several years later that 5FU and Gemcitabine could also drive M-MDSC-derived IL-1b secretion that induce the release of CD4 T-cell-derived IL-17, which in turn blunts the anticancer efficacy of these chemotherapeutic agents. However, gemcitabine and 5FU were shown to exert higher anti-tumor effects when tumors were established in Nlrp3^{-/-} or Casp1^{-/-} mice or wild-type mice treated with the IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) (171). Therefore, the depleting effect of 5FU on MDSCs, including G-MDSCs, still remains a matter of debate and requires further investigation.

Taken together, studies aiming at evaluating the neutrophil-depleting effects of already-approved therapies remain contrasted. These discrepancies are likely due to differences in doses, timing of administration, location of neutrophil sampling, time of neutrophils detection, as well as mouse and tumor models (172, 173). Future investigations should therefore take into account these parameters to identify in which settings these potential neutrophil-depleting therapies could be the most beneficial. Since neutrophils are constantly monitored during cancer treatment to prevent neutropenia and therefore avoid opportunistic infections, depletion of neutrophils must be restricted to the tumor site (TANs), or only to subsets of neutrophils with tumor-promoting function. To support the rationale that currently-used chemotherapies may offer

additional therapeutic effects by targeting TANs, it will be important to determine whether a higher infiltration of TANs prior to the administration of neutrophil-depleting treatments is associated with a better survival. Interestingly, evidence in stage III colorectal cancer patients all treated with 5FU after surgical removal, showed that a high density of intratumoral TANs before treatment was associated with a longer disease-free survival (68). TAN infiltrate may therefore help identify patients who will likely benefit from 5FU chemotherapy.

Inhibition of the T-Cell Suppressive Functions of Neutrophils

Arginase 1 Inhibitor

L-arginine is an important amino acid that serves as a building block for protein synthesis and as a precursor for multiple intra-cellular metabolites (174). L-arginine is known to be particularly important for T-cell proliferation and survival (175). Moreover, increased intracellular L-arginine in T-cells was shown to favor their differentiation to central memory-like T-cells with enhanced anti-tumor properties (176). L-arginine is mainly catabolized by arginase 1, which is secreted by subsets of myeloid cells, including neutrophils under specific conditions in humans (46, 55). Several reports demonstrated *in vitro* that neutrophil-derived arginase 1 suppresses T-cell proliferation (55), which was rescued by the addition of an arginase 1 inhibitor. The therapeutic effect of the arginase 1 inhibitor on tumor growth was also observed in a pre-clinical mouse model of lung cancer (99, 177). However, the tumor-promoting role of arginase 1 remains controversial as L-arginine also favors tumor cell proliferation and survival. *In vitro*, recombinant human arginase 1 induces cell cycle arrest and apoptosis of human tumor cell lines (178–182). Bioengineered PEGylated arginase 1 for which the half-life was extended through PEGylation, was shown to exert anti-tumor effects in xenograft mouse models (179, 181, 183, 184). Recent evidence suggests that the bioengineered human PEGylated arginase 1 (AEB1102) exerts additive anti-tumor effects when combined to anti-PD-1 or anti-PD-L1 in melanoma, small cell lung cancer (SCLC), and sarcoma patient-derived xenografts (183, 184). Collectively these results demonstrate that disrupting the physiological balance of L-arginine may either inhibit or promote tumor progression depending on T-cell and tumor cell susceptibility to arginine starvation. The synergistic therapeutic efficacy of either recombinant arginase 1 or arginase 1 inhibitor in combination with various chemotherapies or Pembrolizumab (anti-PD-1) is currently being tested in phase 1/2 clinical trials (NCT03371979; NCT02903914; NCT03361228; NCT03314935).

Tyrosine Kinase Inhibitors

In mice, splenic HSPCs were shown to contribute to the T-cell suppressive function of TANs (131) in a murine model of HCC. Low-dose of sorafenib, a c-Kit inhibitor, was associated with increased apoptosis of splenic HSPCs and reduced immunosuppressive function of TANs. Sorafenib synergizes with PD-L1 blockade. The authors showed that the therapeutic effect of sorafenib could be largely attributed to splenic HSPCs depletion as the adoptive transfer of splenic HSPCs following sorafenib treatment abrogated its effects. In contrast, sorafenib

promoted expansion of tumor-promoting TANs in the HCC mouse model and therefore limit sorafenib therapeutic efficacy (185). This finding was translatable in HCC patients, since TAN infiltration was higher in patients previously treated with sorafenib prior to liver resection, compared to untreated patients.

Another tyrosine kinase inhibitor, called sunitinib, has also shown promising results in depleting pro-tumor neutrophils. In renal cell carcinoma (RCC) patients, the elevated percentage of the T-cell suppressive CD15⁺ CD14⁻ LDNs among PBMCs declined in response to sunitinib treatment. *In vitro*, sunitinib induced the death of CD15⁺ CD14⁻ LDNs in a dose-dependent manner (186). Studies in mice showed that sunitinib depleted T-cell suppressive splenic neutrophils, whereas it failed to deplete T-cell suppressive TANs (187, 188). Intra-tumor GM-CSF promotes STAT5 signaling pathway activation, which largely explains the resistance of TANs to sunitinib-induced cell death. In contrast, another group showed that sunitinib depletes tumor-associated Gr1⁺ MDSC and synergizes with a cancer vaccine to enhance antigen-specific immune responses and tumor eradication (189). However, these authors did not specify which MDSC subset (granulocytic or monocytic myeloid cells) was targeted by sunitinib.

C5aR Blockade

The C5a receptor (C5aR, CD88) becomes fairly well known for its role in immunosuppressive activity of myeloid cells. Lung cancer cells were found to produce C5a which could bind to C5aR expressed by myeloid cells to increase their immunosuppressive functions (190). Concentration of C5a in peripheral blood of lung cancer patients was significantly higher as compared to healthy donors. A recent pre-clinical study showed additional therapeutic effects of C5a pharmacologic inhibition in combination with PD-1 blockade unleashing anti-tumor CD8 T-cell response in a model of lung cancer (191). In this latter study, the C5a inhibitor named NOX-D21 is an l-aptamer that tightly binds to C5a and inhibits the interaction with its receptors. Another group recently reported in a pre-clinical model of squamous cell carcinoma, that the targeting of C5aR1 essentially in macrophages with a peptide antagonist (PMX-53) improved efficacy of paclitaxel chemotherapy and was associated with CD8 T cell response (192). A blocking antibody against C5aR (IPH5401) was recently developed and entered phase 1 clinical trial in combination with PD-L1 blockade for lung cancer patients (NSCLC) and head and neck patients (HCC) (NCT03665129). Recent evidence suggests that not only macrophages but also neutrophils express high level of C5aR (193). Moreover, the authors showed that IPH5401 selectively inhibited C5a-induced activation and migration of human blood neutrophils, suggesting that neutrophils may account as therapeutic target of C5aR blocking antibody.

STAT3 Inhibition

STAT3 transcription factor is well known to be important for the tumor-promoting activities of myeloid cells such as immunosuppression (194–197) or tumor angiogenesis (198). Clinical trials using small molecule inhibitors targeting STAT3 showed limited therapeutic effects and broad side effects (199). Other approach attempting to inhibit STAT3 signaling

pathway by using STAT3 siRNA are currently evaluated in clinical trials (199). The mechanisms by which STAT3 inhibition dampens the immunosuppressive function of neutrophils are not clear. Recent evidences suggest that STAT3 activation leads to the expression of the fatty acid translocase CD36 that in turn increases the uptake of lipids and the oxidative metabolism, and subsequently the immunosuppressive function of myeloid cells (200, 201). Further studies will be needed to evaluate the impact of targeting STAT3 in tumor-promoting neutrophils.

FATP2 Inhibition

Recent evidences suggest that lipid metabolism could contribute to the pathological activation of G-MDSC (201, 202). Human TANs and peripheral blood G-MDSC also upregulate the expression of several lipid transporters such as CD36, Msr1, Ldlr, or Lox1, as compared to neutrophils from healthy donors. Addition of very low-density lipoproteins increased the T-cell suppressive function of MDSC *in vitro* (201). Genetic depletion of the fatty acid translocase CD36 in tumor-bearing mice delayed tumor growth *in vivo* (201). More recent *in vivo* evidence showed that genetic deletion of the SLC27A2 gene (also known as FATP2) encoding the very long-chain acyl-CoA synthetase, specifically in neutrophils using the S100a8-cre mice, abrogated tumor growth in different tumor models (202). FATP2^{-/-} TANs had decreased T-cell suppressive activity as compared to WT TANs (202). The authors further showed that the selective FATP2 inhibitor lipofermata delayed tumor growth in different preclinical mouse models and synergized with either anti-CTLA4 or anti-CSF1R antibody. Human TANs were found to have a higher intracellular lipid content as compared to blood neutrophils from matched cancer patients (202). Future investigations on human samples will be needed to evaluate the clinical relevance of targeting FATP2 in cancer patients.

Soluble Fas-Fc

A pre-clinical mouse study recently reported that neutrophils upregulate Fas-L which in turn triggers apoptosis of tumor-infiltrating lymphocytes, thereby causing resistance to immunotherapies based on checkpoint blockade, cancer vaccines or adoptive T-cell therapy (104). In this study, soluble Fas-Fc neutralized Fas-L *in vivo*, rendering tumors sensitive to T-cell-based immunotherapies. Future studies are required to determine whether high infiltration of Fas-L positive TANs at baseline is associated with unresponsiveness to immunotherapies.

Prevention of Neutrophil Capacity to Foster Tumor Cell Proliferation and Migration

Inhibition of Netosis

A preclinical study showed that NETs promote the development and progression of liver metastases after surgical stress. Patients undergoing curative liver resection for metastatic colorectal cancer, that were characterized by an increased postoperative NET formation, had a >4-fold reduction in disease-free survival (59). Accelerated development and

progression of metastatic disease was demonstrated in a murine model that recapitulated NET formation after surgical stress. Local treatment with DNase 1 or inhibition of the enzyme peptidylarginine deaminase (PAD4), which is essential for NET formation, abolished tumor progression after surgery (59). There are current limitations for the use of the PAD4 inhibitor to prevent NET *in vivo* due to its short-half-life (86). Similar to the PAD4 inhibitor, the short half-life of NE and cathepsin G inhibitors prevents their use *in vivo* for cancer treatment (86). Recently, NET-associated proteases, NE and matrix metalloproteinase 9, were shown to sequentially cleave laminin (85). This proteolytically remodeled laminin induced proliferation of dormant cancer cells by activating integrin $\alpha 3 \beta 1$ signaling, and antibodies against NET-remodeled laminin 111 prevented the awakening of dormant cancer cells (85). Engineering of monoclonal antibodies against human NET-remodeled laminin would help determine if such mechanisms occur in humans and whether they are correlated with patient prognosis.

Arachidonate 5-Lipoxygenase (Alox5) Inhibition

Evidences showed that neutrophil-derived leukotriene support breast cancer metastasis by selectively expanding cancer cells that retain high metastatic potential (84). Pharmacologic inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase (Alox5) by zileuton (203) could inhibit the pro-metastatic activity of neutrophils. The authors showed that both leukotriene receptor Leukotriene B4 receptor 2 (BLT2) and Cysteinyl leukotriene receptor 2 (CysLT2) were expressed in human breast tumor and matched lymph node metastases. Future investigation will be needed to determine the therapeutic potential of such targets.

Blockade of Neutrophil-Circulating Tumor Cell Interaction

Accumulating evidence indicates that neutrophils interact with circulating tumor cells to promote their proliferation and favor their extravasation to metastatic sites (58, 61, 204). Either NETs or VCAM1 adhesion molecules seem to be important in the interaction between neutrophils and circulating tumor cells. DNase 1 treatment or VCAM1-deficient tumor cells prevented such interaction and impaired metastasis.

Promotion of the Anti-tumor Functions of Neutrophils

Antigen-Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC)

Mounting evidence strongly supports the concept of targeting Fc-Receptors on neutrophils in anti-tumor immunotherapy. Although they express IgA-Fc-Receptor (CD89) and IgG-Fc-Receptors (CD16; CD32; CD64), evidence showed that neutrophils are more effective at mediating ADCC through IgA antibodies than IgG antibodies *in vitro* (107, 108, 110). Numerous pre-clinical studies conducted in CD89 transgenic mice confirmed its superior ability to induce neutrophil-dependent tumor cell killing for different tumor-associated antigens, such as HER2/neu (on breast carcinoma), EpCAM

(colon carcinoma), EGFR (epithelial carcinoma and renal cell carcinoma), HLA class II (B-cell lymphoma), CD30 (T- and B-cell lymphoma), and CD20 (B-cell lymphoma) (205). Due to its shorter half-life as compared to other serum isotopes, the engineering of IgA antibodies could be a promising therapeutic option to increase effectiveness of currently given monoclonal antibody-based immunotherapies.

CONCLUSION AND PERSPECTIVES

Although immunotherapies held great promise for oncology, only a small percentage of cancer patients showed benefits from these treatments. The search for new therapeutic targets is thus critically needed. Current immunotherapies mostly rely on the adaptive immune system, involving adaptive immune checkpoints such as CTLA-4, PD-1, and PD-L1. Recent pre-clinical studies suggest that innate immunity could offer new therapeutic opportunities. Inhibition of the innate immune checkpoints Tyro3, Axl, and Merck tyrosine kinase receptors, mostly expressed by TAMs, displayed additional therapeutic effects when combined to the anti-PD-1 monoclonal antibody in a murine model of triple-negative breast cancer (206). Accumulating evidence suggests that neutrophils may be ideal targets for future therapeutic strategies. Several groups reported that the selective depletion of neutrophils could delay tumor growth. Ongoing pre-clinical investigations aim at evaluating the potential synergistic effect of neutrophil depletion with currently approved immunotherapies. In cancer patients, accumulating evidence from retrospective studies supports a rationale for eliminating neutrophils. Indeed, several approved cancer drugs were shown to deplete neutrophils and were associated with a better survival. Nonetheless, we cannot rule-out off-target therapeutic effects of these drugs. Moreover, blood neutrophil count is routinely used as a read-out of cancer treatment-related toxicities, since neutrophils are important in the immune response upon bacterial infection. Further studies are therefore needed to identify pro-tumor neutrophil-associated targets non-overlapping with antibacterial neutrophils, to enhance therapeutic efficacy of immunotherapies while minimizing side effects.

While the elimination of neutrophils seems to provide therapeutic effects in established tumor models, emerging evidence favors an anti-tumor role for neutrophils in early-stage tumors in mice (78, 114, 115). Evidence from retrospective studies and *ex vivo* functional analyses also support the concept of an anti-tumor role for neutrophils in early-stage human tumors. Although challenging, access to early-stage tumors will be original and fundamental to gain new insights into potentially novel yet undiscovered phenotypes and functions of TANs. With such diverse roles, the ideal targeting of neutrophils in oncology would be to promote the enrichment of anti-tumor neutrophils while depleting pro-tumor ones without altering antibacterial neutrophils.

The current dogma in cancer immunotherapy mainly relies on restoring anti-tumor T-cell response. However, a high tumor

infiltration by anti-tumor lymphocytes is not sufficient to eradicate all tumor clones during the course of metastasis as for example in colorectal cancer patients, shedding light on tumor-intrinsic and tumor-extrinsic mechanisms of escape that remain to be discovered (207). Resistance to CD8 T cell-induced tumor cell death by ferroptosis can be one possible tumor cell-intrinsic mechanism of escape (194). Neutrophils can kill tumor cells in a non-apoptotic mechanism by a process called trogoptosis, distinct from ferroptosis by its lytic/necrotic form (208) of cell death that may release DAMP and tumor (neo) antigens from the killed cancer cells (111). Neutrophils could therefore improve cytotoxic T cell response to eliminate resistant tumor clones.

Beyond their role at tumor site, neutrophils seem to promote tumor progression by acting systemically as exemplified by the ability of blood neutrophils to escort circulating tumor cells within the bloodstream and facilitate their extravasation to metastatic site (56–61). Moreover, the T-cell suppressive activity of circulating neutrophils is restricted to *in vitro* studies. It remains to be known if such neutrophil-mediated T-cell suppression occurs in blood *in vivo*. Growing evidences also highlight the importance of distant microenvironment away from tumor bed such as the bone marrow and the spleen to educate pro-tumor TANs (130, 131). Future studies should therefore consider the importance of the different microenvironments outside of the tumor bed, regarding the origin and function of neutrophils in cancer, for the benefits of patients.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

PL, MS, MP, and JM wrote the original draft of manuscript. PL performed original figures and overall the supervision of writing. LK, CC, NB-V, and M-CM revised and edited the manuscript.

FUNDING

Our work was supported by grant from INCa-Fondation ARC-Ligue contre le cancer PAIR SEIN n° 2014-093, by grants INCa PLBio n° 2017-158, by grants Ligue contre le cancer CCAURA by grant FRM n° SPF20160936218, French Government PhD Fellowship (2016-2019), and 1-year extension Ph.D. Fellowship from Ligue Nationale contre le cancer (2019/2020). We also want to thank the Plan Cancer (INCa-ITMO Cancer), the LABEX DEVweCAN (ANR-10-LABX-0061) of the University of Lyon and the RHU MyPROBE (ANR-17-RHUS-0008), both within the program Investissements d'Avenir organized by the French National Research Agency (ANR), and the LYRICAN (grant INCa-DGOS-Inserm_12563).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Brigitte Manship, our scientific writer for final proofreading and Vincent Alcazer for careful reading of the manuscript and helpful comments and suggestions.

REFERENCES

- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. (2011) 144:646–74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013
- Balkwill F, Mantovani A. Cancer and inflammation: implications for pharmacology and therapeutics. *Clin Pharmacol Ther.* (2010) 87:401–6. doi: 10.1038/clpt.2009.312
- Diakos CI, Charles KA, McMillan DC, Clarke SJ. Cancer-related inflammation and treatment effectiveness. *Lancet Oncol.* (2014) 15:e493–503. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70263-3
- Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol.* (2012) 12:253–68. doi: 10.1038/nri3175
- Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity.* (2010) 33:657–70. doi: 10.1016/j.immuni.2010.11.011
- Mestas J, Hughes CCW. Of Mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol.* (2004) 172:2731–8. doi: 10.4049/jimmunol.172.5.2731
- Li Y, Klippel Z, Shih X, Wang H, Reiner M, Page JH. Trajectory of absolute neutrophil counts in patients treated with pegfilgrastim on the day of chemotherapy versus the day after chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol.* (2016) 77:703–12. doi: 10.1007/s00280-016-2970-5
- Klastersky J, de Naurois J, Rolston K, Rapoport B, Maschmeyer G, Aapro M, et al. Management of febrile neutropenia: ESMO clinical practice guidelines. *Ann Oncol.* (2016) 27:v111–8. doi: 10.1093/annonc/mdw325
- Templeton AJ, McNamara MG, Šeruga B, Vera-Badillo FE, Aneja P, Ocaña A, et al. Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* (2014) 106:dju124. doi: 10.1093/jnci/dju124
- Paramanathan A, Saxena A, Morris DL. A systematic review and meta-analysis on the impact of pre-operative neutrophil lymphocyte ratio on long term outcomes after curative intent resection of solid tumours. *Surg Oncol.* (2014) 23:31–9. doi: 10.1016/j.suronc.2013.12.001
- Vano Y-A, Oudard S, By M-A, Têtu P, Thibault C, Aboudagga H, et al. Optimal cut-off for neutrophil-to-lymphocyte ratio: Fact or Fantasy? A prospective cohort study in metastatic cancer patients. *PLoS ONE.* (2018) 13:e0195042. doi: 10.1371/journal.pone.0195042
- Nakamura Y, Watanabe R, Katagiri M, Saida Y, Katada N, Watanabe M, et al. Neutrophil/lymphocyte ratio has a prognostic value for patients with terminal cancer. *World J Surg Oncol.* (2016) 14:148. doi: 10.1186/s12957-016-0904-7
- Chua W, Charles KA, Baracos VE, Clarke SJ. Neutrophil/lymphocyte ratio predicts chemotherapy outcomes in patients with advanced colorectal cancer. *Br J Cancer.* (2011) 104:1288–95. doi: 10.1038/bjc.2011.100
- Michael M, Goldstein D, Clarke SJ, Milner AD, Beale P, Friedlander M, et al. Prognostic factors predictive of response and survival to a modified FOLFOX regimen: importance of an increased neutrophil count. *Clin Colorectal Cancer.* (2006) 6:297–304. doi: 10.3816/CCC.2006.n.048
- Chae S, Kang KM, Kim HJ, Kang E, Park SY, Kim JH, et al. Neutrophil-lymphocyte ratio predicts response to chemotherapy in triple-negative breast cancer. *Curr Oncol Tor Ont.* (2018) 25:e113–9. doi: 10.3747/co.25.3888
- Chua W, Clarke SJ, Charles KA. Systemic inflammation and prediction of chemotherapy outcomes in patients receiving docetaxel for advanced cancer. *Support Care Cancer.* (2012) 20:1869–74. doi: 10.1007/s00520-011-1289-3
- Kaito S, Kanemasa Y, Sasaki Y, Okuya T, Yamaguchi T, Funasaka C, et al. A new prognostic score comprising lactate dehydrogenase, albumin and neutrophil to lymphocyte ratio to predict sensitivity to first-line chemotherapy in patients with peripheral T-cell lymphomas. *Int J Hematol.* (2018) 107:451–9. doi: 10.1007/s12185-017-2362-6
- Dell'Aquila E, Cremolini C, Zeppola T, Lonardi S, Bergamo F, Masi G, et al. Prognostic and predictive role of neutrophil/lymphocytes ratio in metastatic colorectal cancer: a retrospective analysis of the TRIBE study by GONO. *Ann Oncol.* (2018) 29:924–30. doi: 10.1093/annonc/mdy004
- Cho K-M, Park H, Oh D-Y, Kim T-Y, Lee K-H, Han S-W, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio, platelet-to-lymphocyte ratio, and their dynamic changes during chemotherapy is useful to predict a more accurate prognosis of advanced biliary tract cancer. *Oncotarget.* (2017) 8:2329–41. doi: 10.18632/oncotarget.13731
- Sümbül AT, Sezer A, Abali H, Köse F, Gültepe I, Mertsoylu H, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts PSA response, but not outcomes in patients with castration-resistant prostate cancer treated with docetaxel. *Int Urol Nephrol.* (2014) 46:1531–5. doi: 10.1007/s11255-014-0664-7
- Templeton AJ, Knox JJ, Lin X, Simantov R, Xie W, Lawrence N, et al. Change in neutrophil-to-lymphocyte ratio in response to targeted therapy for metastatic renal cell carcinoma as a prognosticator and biomarker of efficacy. *Eur Urol.* (2016) 70:358–64. doi: 10.1016/j.eururo.2016.02.033
- Lin G-N, Peng J-W, Liu P-P, Liu D-Y, Xiao J-J, Chen X-Q. Elevated neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts poor outcome in patients with advanced non-small-cell lung cancer receiving first-line gefitinib or erlotinib treatment. *Asia Pac J Clin Oncol.* (2017) 13:e189–94. doi: 10.1111/ajco.12273
- Meriggi F, Codignola C, Beretta GD, Ceresoli GL, Caprioli A, Scartozzi M, et al. Significance of neutrophil-to-lymphocyte ratio in Western advanced EGFR-mutated non-small cell lung cancer receiving a targeted therapy. *Tumori.* (2017) 103:443–8. doi: 10.5301/tj.5000632
- Zhang Y, Feng Y-C, Zhu H-G, Xiong T-C, Hou Y-S, Song J, et al. The peripheral blood neutrophil-to-lymphocyte ratio is a prognostic predictor for survival of EGFR-mutant nonsmall cell lung cancer patients treated with EGFR-TKIs. *Medicine.* (2018) 97:e11648. doi: 10.1097/MD.00000000000011648
- Rutkowski P, Teterycz P, Klimczak A, Bylina E, Szamotulska K, Lugowska I. Blood neutrophil-to-lymphocyte ratio is associated with prognosis in advanced gastrointestinal stromal tumors treated with imatinib. *Tumori.* (2018) 104:415–22. doi: 10.1177/0300891618765543
- Kobayashi H, Okuma T, Oka H, Hirai T, Ohki T, Ikegami M, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio after pazopanib treatment predicts response in patients with advanced soft-tissue sarcoma. *Int J Clin Oncol.* (2018) 23:368–74. doi: 10.1007/s10147-017-1199-6
- Wei K, Wang M, Zhang W, Mu H, Song TQ. Neutrophil-lymphocyte ratio as a predictor of outcomes for patients with hepatocellular carcinoma undergoing TAE combined with Sorafenib. *Med Oncol Northwood Lond Engl.* (2014) 31:969. doi: 10.1007/s12032-014-0969-5
- da Fonseca LG, Barroso-Sousa R, Bento A da SA, Blanco BP, Valente GL, Pfliffer TER, et al. Pre-treatment neutrophil-to-lymphocyte ratio affects survival in patients with advanced hepatocellular carcinoma treated with sorafenib. *Med Oncol Northwood Lond Engl.* (2014) 31:264. doi: 10.1007/s12032-014-0264-5
- Robert C, Long GV, Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med.* (2015) 372:320–30. doi: 10.1056/NEJMoa1412082
- Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* (2015) 373:1627–39. doi: 10.1056/NEJMoa1507643
- Ferrucci PF, Gandini S, Battaglia A, Alfieri S, Di Giacomo AM, Giannarelli D, et al. Baseline neutrophil-to-lymphocyte ratio is associated with outcome of ipilimumab-treated metastatic melanoma patients. *Br J Cancer.* (2015) 112:1904–10. doi: 10.1038/bjc.2015.180
- Capone M, Giannarelli D, Mallardo D, Madonna G, Festino L, Grimaldi AM, et al. Baseline neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) and derived NLR could predict overall survival in patients with advanced melanoma treated with nivolumab. *J Immunother Cancer.* (2018) 6:74. doi: 10.1186/s40425-018-0383-1
- Buder-Bakhaya K, Hassel JC. Biomarkers for clinical benefit of immune checkpoint inhibitor treatment-A review from the melanoma perspective and beyond. *Front Immunol.* (2018) 9:1474. doi: 10.3389/fimmu.2018.01474
- Cassidy MR, Wolchok RE, Zheng J, Panageas KS, Wolchok JD, Coit D, et al. Neutrophil to lymphocyte ratio is associated with outcome during ipilimumab treatment. *EBioMedicine.* (2017) 18:56–61. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.03.029
- Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crinò L, Eberhardt WEE, Poddubskaya E, et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced squamous-cell non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* (2015) 373:123–35. doi: 10.1056/NEJMoa1504627
- Diem S, Schmid S, Krapf M, Flatz L, Born D, Jochum W, et al. Neutrophil-to-Lymphocyte ratio (NLR) and Platelet-to-Lymphocyte ratio (PLR) as prognostic markers in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) treated with nivolumab. *Lung Cancer Amst Neth.* (2017) 111:176–81. doi: 10.1016/j.lungcan.2017.07.024

37. Ameratunga M, Chénard-Poirier M, Moreno Candilejo I, Pedregal M, Lui A, Dolling D, et al. Neutrophil-lymphocyte ratio kinetics in patients with advanced solid tumours on phase I trials of PD-1/PD-L1 inhibitors. *Eur J Cancer*. (2018) 89:56–63. doi: 10.1016/j.ejca.2017.11.012
38. Schernberg A, Mezquita L, Boros A, Botticella A, Caramella C, Besse B, et al. Neutrophilia as prognostic biomarker in locally advanced stage III lung cancer. *PLoS ONE*. (2018) 13:e0204490. doi: 10.1371/journal.pone.0204490
39. Ma J, Kuzman J, Ray A, Lawson BO, Khong B, Xuan S, et al. Neutrophil-to-lymphocyte Ratio (NLR) as a predictor for recurrence in patients with stage III melanoma. *Sci Rep*. (2018) 8:4044. doi: 10.1038/s41598-018-22425-3
40. Li Z, Zhao R, Cui Y, Zhou Y, Wu X. The dynamic change of neutrophil to lymphocyte ratio can predict clinical outcome in stage I–III colon cancer. *Sci Rep*. (2018) 8:9453. doi: 10.1038/s41598-018-27896-y
41. Wu C-N, Chuang H-C, Lin Y-T, Fang F-M, Li S-H, Chien C-Y. Prognosis of neutrophil-to-lymphocyte ratio in clinical early-stage tongue (cT1/T2N0) cancer. *Oncol Targets Ther*. (2017) 10:3917–24. doi: 10.2147/OTT.S140800
42. Orditura M, Galizia G, Diana A, Saccone C, Cobellis L, Ventriglia J, et al. Neutrophil to lymphocyte ratio (NLR) for prediction of distant metastasis-free survival (DMFS) in early breast cancer: a propensity score-matched analysis. *ESMO Open*. (2016) 1:e000038. doi: 10.1136/esmoopen-2016-000038
43. Chu MO, Shen C-H, Chang T-S, Xu H-W, Yen C-W, Lu S-N, et al. Pretreatment inflammation-based markers predict survival outcomes in patients with early stage hepatocellular carcinoma after radiofrequency ablation. *Sci Rep*. (2018) 8:16611. doi: 10.1038/s41598-018-34543-z
44. Sagiv JY, Michaeli J, Assi S, Mishalian I, Kisos H, Levy L, et al. Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer. *Cell Rep*. (2015) 10:562–73. doi: 10.1016/j.celrep.2014.12.039
45. Bronte V, Brandau S, Chen S-H, Colombo MP, Frey AB, Greten TF, et al. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat Commun*. (2016) 7:12150. doi: 10.1038/ncomms12150
46. Rodriguez PC, Ernstoff MS, Hernandez C, Atkins M, Zabaleta J, Sierra R, et al. Arginase I-producing myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma are a subpopulation of activated granulocytes. *Cancer Res*. (2009) 69:1553–60. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1921
47. Brandau S, Trellakis S, Bruderek K, Schmaltz D, Steller G, Elian M, et al. Myeloid-derived suppressor cells in the peripheral blood of cancer patients contain a subset of immature neutrophils with impaired migratory properties. *J Leukoc Biol*. (2011) 89:311–7. doi: 10.1189/jlb.0310162
48. Condamine T, Dominguez GA, Youn J-I, Kossenkov AV, Mony S, Alicea-Torres K, et al. Lectin-type oxidized LDL receptor-1 distinguishes population of human polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in cancer patients. *Sci Immunol*. (2016) 1:aaf8943. doi: 10.1126/sciimmunol.aaf8943
49. Lang S, Bruderek K, Kaspar C, Höing B, Kanaan O, Dominas N, et al. Clinical relevance and suppressive capacity of human myeloid-derived suppressor cell subsets. *Clin Cancer Res*. (2018) 24:4834–44. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-3726
50. Gabrilovich DI. Myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Immunol Res*. (2017) 5:3–8. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-16-0297
51. Ouzounova M, Lee E, Piranlioglu R, El Andaloussi A, Kolhe R, Demirci MF, et al. Monocytic and granulocytic myeloid derived suppressor cells differentially regulate spatiotemporal tumour plasticity during metastatic cascade. *Nat Commun*. (2017) 8:14979. doi: 10.1038/ncomms14979
52. Pillay J, Kamp VM, Hoffen E van, Visser T, Tak T, Lammers J-W, et al. A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J Clin Invest*. (2012) 122:327–36. doi: 10.1172/JCI57990
53. Evrard M, Kwok IWH, Chong SZ, Teng KWW, Becht E, Chen J, et al. Developmental analysis of bone marrow neutrophils reveals populations specialized in expansion, trafficking, and effector functions. *Immunity*. (2018) 48:364–79.e8. doi: 10.1016/j.immuni.2018.02.002
54. Zhu YP, Padgett L, Dinh HQ, Marcovecchio P, Blatchley A, Wu R, et al. Identification of an early unipotent neutrophil progenitor with pro-tumoral activity in mouse and human bone marrow. *Cell Rep*. (2018) 24:2329–41.e8. doi: 10.1016/j.celrep.2018.07.097
55. Marini O, Costa S, Bevilacqua D, Calzetti F, Tamassia N, Spina C, et al. Mature CD10⁺ and immature CD10[−] neutrophils present in G-CSF-treated donors display opposite effects on T cells. *Blood*. (2017) 129:1343–56. doi: 10.1182/blood-2016-04-713206
56. Huh SJ, Liang S, Sharma A, Dong C, Robertson GP. Transiently entrapped circulating tumor cells interact with neutrophils to facilitate lung metastasis development. *Cancer Res*. (2010) 70:6071–82. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4442
57. Spicer JD, McDonald B, Cools-Lartigue JJ, Chow SC, Giannias B, Kubes P, et al. Neutrophils promote liver metastasis via Mac-1-mediated interactions with circulating tumor cells. *Cancer Res*. (2012) 72:3919–27. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2393
58. Cools-Lartigue J, Spicer J, McDonald B, Gowing S, Chow S, Giannias B, et al. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *J Clin Invest*. (2013) 123:67484. doi: 10.1172/JCI67484
59. Tohme S, Yazdani HO, Al-Khafaji AB, Chidi AP, Loughran P, Mowen K, et al. Neutrophil extracellular traps promote the development and progression of liver metastases after surgical stress. *Cancer Res*. (2016) 76:1367–80. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1591
60. Chen MB, Hajal C, Benjamin DC, Yu C, Azizgolshani H, Hynes RO, et al. Inflamed neutrophils sequestered at entrapped tumor cells via chemotactic confinement promote tumor cell extravasation. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2018) 115:7022–7. doi: 10.1073/pnas.1715932115
61. Szczerba BM, Castro-Giner F, Vetter M, Krol I, Gkountela S, Landin J, et al. Neutrophils escort circulating tumour cells to enable cell cycle progression. *Nature*. (2019) 566:553–7. doi: 10.1038/s41586-019-0915-y
62. Jensen HK, Donskov F, Marcussen N, Nordmark M, Lundbeck F, von der Maase H. Presence of intratumoral neutrophils is an independent prognostic factor in localized renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. (2009) 27:4709–17. doi: 10.1200/JCO.2008.18.9498
63. Rao H-L, Chen J-W, Li M, Xiao Y-B, Fu J, Zeng Y-X, et al. Increased intratumoral neutrophil in colorectal carcinomas correlates closely with malignant phenotype and predicts patients' adverse prognosis. *PLoS ONE*. (2012) 7:e30806. doi: 10.1371/journal.pone.0030806
64. Trellakis S, Bruderek K, Dumitru CA, Gholaman H, Gu X, Bankfalvi A, et al. Polymorphonuclear granulocytes in human head and neck cancer: enhanced inflammatory activity, modulation by cancer cells and expansion in advanced disease. *Int J Cancer*. (2011) 129:2183–93. doi: 10.1002/ijc.25892
65. Matsumoto Y, Mabuchi S, Kozasa K, Kuroda H, Sasano T, Yokoi E, et al. The significance of tumor-associated neutrophil density in uterine cervical cancer treated with definitive radiotherapy. *Gynecol Oncol*. (2017) 145:469–75. doi: 10.1016/j.ygyno.2017.02.009
66. Galdiero MR, Varricchi G, Loffredo S, Bellevicene C, Lansione T, Ferrara AL, et al. Potential involvement of neutrophils in human thyroid cancer. *PLoS ONE*. (2018) 13:e0199740. doi: 10.1371/journal.pone.0199740
67. Caruso RA, Bellocco R, Pagano M, Bertoli G, Rigoli L, Inferriera C. Prognostic value of intratumoral neutrophils in advanced gastric carcinoma in a high-risk area in northern Italy. *Mod Pathol*. (2002) 15:831–7. doi: 10.1097/01.MP.0000020391.98998.6B
68. Galdiero MR, Bianchi P, Grizzi F, Di Caro G, Basso G, Ponzetta A, et al. Occurrence and significance of tumor-associated neutrophils in patients with colorectal cancer. *Int J Cancer*. (2016) 139:446–56. doi: 10.1002/ijc.30076
69. Droezer RA, Hirt C, Eppenberger-Castori S, Zlobec I, Viehl CT, Frey DM, et al. High myeloperoxidase positive cell infiltration in colorectal cancer is an independent favorable prognostic factor. *PLoS ONE*. (2013) 8:e64814. doi: 10.1371/journal.pone.0064814
70. Li B, Severson E, Pignon J-C, Zhao H, Li T, Novak J, et al. Comprehensive analyses of tumor immunity: implications for cancer immunotherapy. *Genome Biol*. (2016) 17:174. doi: 10.1186/s13059-016-1028-7
71. Torsteinsdóttir I, Arvidson NG, Hällgren R, Håkansson L. Enhanced expression of integrins and CD66b on peripheral blood neutrophils and eosinophils in patients with rheumatoid arthritis, and the effect of glucocorticoids. *Scand J Immunol*. (1999) 50:433–9. doi: 10.1046/j.1365-3083.1999.00602.x
72. Bochner BS, Sterbinsky SA, Bickel CA, Werfel S, Wein M, Newman W. Differences between human eosinophils and neutrophils in the function and expression of sialic acid-containing counterligands for E-selectin. *J Immunol*. (1994) 152:774–82.

73. Dollery CM, Owen CA, Sukhova GK, Krettek A, Shapiro SD, Libby P. Neutrophil elastase in human atherosclerotic plaques: production by macrophages. *Circulation*. (2003) 107:2829–36. doi: 10.1161/01.CIR.0000072792.65250.4A
74. Shepherd J, Hilderbrand SA, Waterman P, Heinecke JW, Weissleder R, Libby P. A fluorescent probe for the detection of myeloperoxidase activity in atherosclerosis-associated macrophages. *Chem Biol*. (2007) 14:1221–31. doi: 10.1016/j.chembiol.2007.10.005
75. Li L, Xu L, Yan J, Zhen Z-J, Ji Y, Liu C-Q, et al. CXCR2–CXCL1 axis is correlated with neutrophil infiltration and predicts a poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*. (2015) 34:129. doi: 10.1186/s13046-015-0247-1
76. Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, Laghi L, Allavena P. Tumor-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat Rev Clin Oncol*. (2017) 14:399–416. doi: 10.1038/nrclinonc.2016.217
77. Finotello F, Trajanoski Z. Quantifying tumor-infiltrating immune cells from transcriptomics data. *Cancer Immunol Immunother*. (2018) 67:1031–40. doi: 10.1007/s00262-018-2150-z
78. Blaisdell A, Crequer A, Columbus D, Daikoku T, Mittal K, Dey SK, et al. Neutrophils oppose uterine epithelial carcinogenesis via debridement of hypoxic tumor cells. *Cancer Cell*. (2015) 28:785–99. doi: 10.1016/j.ccell.2015.11.005
79. Ponzetta A, Carriero R, Carnevale S, Barbagallo M, Molgora M, Perucchini C, et al. Neutrophils driving unconventional T cells mediate resistance against murine sarcomas and selected human tumors. *Cell*. (2019) 178:346–60. doi: 10.1016/j.cell.2019.05.047
80. Newman AM, Liu CL, Green MR, Gentles AJ, Feng W, Xu Y, et al. Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles. *Nat Methods*. (2015) 12:453–7. doi: 10.1038/nmeth.3337
81. Gentles AJ, Newman AM, Liu CL, Bratman SV, Feng W, Kim D, et al. The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat Med*. (2015) 21:938–45. doi: 10.1038/nm.3909
82. Di Mitri D, Toso A, Chen JJ, Sarti M, Pinton S, Jost TR, et al. Tumour-infiltrating Gr-1+ myeloid cells antagonize senescence in cancer. *Nature*. (2014) 515:134–7. doi: 10.1038/nature13638
83. Houghton AM, Rzymkiewicz DM, Ji H, Gregory AD, Egea EE, Metz HE, et al. Neutrophil elastase-mediated degradation of IRS-1 accelerates lung tumor growth. *Nat Med*. (2010) 16:219–23. doi: 10.1038/nm.2084
84. Wculek SK, Malanchi I. Neutrophils support lung colonization of metastasis-initiating breast cancer cells. *Nature*. (2015) 528:413–7. doi: 10.1038/nature16140
85. Albregues J, Shields MA, Ng D, Park CG, Ambrico A, Poindexter ME, et al. Neutrophil extracellular traps produced during inflammation awaken dormant cancer cells in mice. *Science*. (2018) 361:eao4227. doi: 10.1126/science.aao4227
86. Park J, Wysocki RW, Amoozgar Z, Maiorino L, Fein MR, Jorns J, et al. Cancer cells induce metastasis-supporting neutrophil extracellular DNA traps. *Sci Transl Med*. (2016) 8:361ra138. doi: 10.1126/scitranslmed.aag1711
87. Faget J, Groeneveld S, Boivin G, Sankar M, Zangger N, Garcia M, et al. Neutrophils and snail orchestrate the establishment of a pro-tumor microenvironment in lung cancer. *Cell Rep*. (2017) 21:3190–204. doi: 10.1016/j.celrep.2017.11.052
88. Wang Y, Chen J, Yang L, Li J, Wu W, Huang M, et al. Tumor-contacted neutrophils promote metastasis by a CD90-TIMP-1 juxtacrine-paracrine loop. *Clin Cancer Res*. (2019) 25:1957–69. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-2544
89. Jablonska J, Leschner S, Westphal K, Lienenklaus S, Weiss S. Neutrophils responsive to endogenous IFN-beta regulate tumor angiogenesis and growth in a mouse tumor model. *J Clin Invest*. (2010) 120:1151–64. doi: 10.1172/JCI37223
90. Huo X, Li H, Li Z, Yan C, Agrawal I, Mathavan S, et al. Transcriptomic profiles of tumor-associated neutrophils reveal prominent roles in enhancing angiogenesis in liver tumorigenesis in zebrafish. *Sci Rep*. (2019) 9:1509. doi: 10.1038/s41598-018-36605-8
91. Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, et al. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell*. (2009) 16:183–94. doi: 10.1016/j.ccr.2009.06.017
92. Shaul ME, Levy L, Sun J, Mishalian I, Singhal S, Kapoor V, et al. Tumor-associated neutrophils display a distinct N1 profile following TGFβ modulation: a transcriptomics analysis of pro- vs. antitumor TANs. *Oncimmunology*. (2016) 5:e1232221. doi: 10.1080/2162402X.2016.1232221
93. Schrufer R, Lutze N, Schymeinsky J, Walzog B. Human neutrophils promote angiogenesis by a paracrine feedforward mechanism involving endothelial interleukin-8. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. (2005) 288:H1186–92. doi: 10.1152/ajpheart.00237.2004
94. Aldabbous L, Abdul-Salam V, McKinnon T, Duluc L, Pepke-Zaba J, Southwood M, et al. Neutrophil extracellular traps promote angiogenesis: evidence from vascular pathology in pulmonary hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. (2016) 36:2078–87. doi: 10.1161/ATVBAHA.116.307634
95. Li T-J, Jiang Y-M, Hu Y-F, Huang L, Yu J, Zhao L-Y, et al. Interleukin-17-producing neutrophils link inflammatory stimuli to disease progression by promoting angiogenesis in gastric cancer. *Clin Cancer Res*. (2017) 23:1575–85. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0617
96. Kikuchi R, Nakamura K, MacLauchlan S, Ngo DT-M, Shimizu I, Fuster JJ, et al. An anti-angiogenic isoform of VEGF-A contributes to impaired vascularization in peripheral artery disease. *Nat Med*. (2014) 20:1464–71. doi: 10.1038/nm.3703
97. Loffredo S, Borriello F, Iannone R, Ferrara AL, Galdiero MR, Gigantino V, et al. Group V secreted phospholipase A2 induces the release of proangiogenic and antiangiogenic factors by human neutrophils. *Front Immunol*. (2017) 8:443. doi: 10.3389/fimmu.2017.00443
98. Coffelt SB, Kersten K, Doornebal CW, Weiden J, Vrijland K, Hau C-S, et al. IL-17-producing γδ T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature*. (2015) 522:345–8. doi: 10.1038/nature14282
99. Rodriguez PC, Quiceno DG, Zabaleta J, Ortiz B, Zea AH, Piazuelo MB, et al. Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. *Cancer Res*. (2004) 64:5839–49. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0465
100. Arlauckas SP, Garren SB, Garris CS, Kohler RH, Oh J, Pittet MJ, et al. Arg1 expression defines immunosuppressive subsets of tumor-associated macrophages. *Theranostics*. (2018) 8:5842–54. doi: 10.7150/thno.26888
101. Zilionis R, Engblom C, Pfirschke C, Savova V, Zemmour D, Saaticioglu HD, et al. Single-cell transcriptomics of human and mouse lung cancers reveals conserved myeloid populations across individuals and species. *Immunity*. (2019) 50:1317–34. doi: 10.1016/j.immuni.2019.03.009
102. Raber P, Ochoa AC, Rodriguez PC. Metabolism of L-arginine by myeloid-derived suppressor cells in cancer: mechanisms of T cell suppression and therapeutic perspectives. *Immunol Invest*. (2012) 41:614–34. doi: 10.3109/08820139.2012.680634
103. Michaeli J, Shaul ME, Mishalian I, Hovav A-H, Levy L, Zolotriov L, et al. Tumor-associated neutrophils induce apoptosis of non-activated CD8 T-cells in a TNFα and NO-dependent mechanism, promoting a tumor-supportive environment. *Oncimmunology*. (2017) 6:e1356965. doi: 10.1080/2162402X.2017.1356965
104. Zhu J, Tenbossche CGP de, Cané S, Colau D, Baren N van, Lurquin C, et al. Resistance to cancer immunotherapy mediated by apoptosis of tumor-infiltrating lymphocytes. *Nat Commun*. (2017) 8:1404. doi: 10.1038/s41467-017-00784-1
105. Takeshima T, Pop LM, Laine A, Iyengar P, Vitetta ES, Hannan R. Key role for neutrophils in radiation-induced antitumor immune responses: potentiation with G-CSF. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2016) 113:11300–5. doi: 10.1073/pnas.1613187113
106. Arelaki S, Arampatzioglou A, Kambas K, Papagoras C, Miltiades P, Angelidou I, et al. Gradient infiltration of neutrophil extracellular traps in colon cancer and evidence for their involvement in tumour growth. *PLoS ONE*. (2016) 11:e0154484. doi: 10.1371/journal.pone.0154484
107. Valerius T, Stockmeyer B, van Spriell AB, Graziano RF, van den Herik-Oudijk IE, Repp R, et al. FcαRI (CD89) as a novel trigger molecule for bispecific antibody therapy. *Blood*. (1997) 90:4485–92.
108. Dechant M, Vidarsson G, Stockmeyer B, Repp R, Glennie MJ, Gramatzki M, et al. Chimeric IgA antibodies against HLA class II effectively trigger lymphoma cell killing. *Blood*. (2002) 100:4574–80. doi: 10.1182/blood-2002-03-0687
109. Otten MA, Rudolph E, Dechant M, Tuk CW, Reijmers RM, Beelen RHJ, et al. Immature neutrophils mediate tumor cell

- killing via IgA but not IgG Fc receptors. *J Immunol.* (2005) 174:5472–80. doi: 10.4049/jimmunol.174.9.5472
110. Lohse S, Brunke C, Derer S, Peipp M, Boross P, Kellner C, et al. Characterization of a mutated IgA2 antibody of the m(1) allotype against the epidermal growth factor receptor for the recruitment of monocytes and macrophages. *J Biol Chem.* (2012) 287:25139–50. doi: 10.1074/jbc.M112.353060
 111. Matlung HL, Babes L, Zhao XW, van Houdt M, Treffers LW, van Rees DJ, et al. Neutrophils kill antibody-opsonized cancer cells by trogoptosis. *Cell Rep.* (2018) 23:3946–59.e6. doi: 10.1016/j.celrep.2018.05.082
 112. Zhang Y, Lee C, Geng S, Li L. Enhanced tumor immune surveillance through neutrophil reprogramming due to Tollip deficiency. *JCI Insight.* (2019) 4:122939. doi: 10.1172/jci.insight.122939
 113. Governa V, Trella E, Mele V, Tornillo L, Amicarella F, Cremonesi E, et al. The interplay between neutrophils and CD8⁺ T cells improves survival in human colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* (2017) 23:3847–58. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2047
 114. Eruslanov EB, Bhojnagarwala PS, Quatromoni JG, Stephen TL, Ranganathan A, Deshpande C, et al. Tumor-associated neutrophils stimulate T cell responses in early-stage human lung cancer. *J Clin Invest.* (2014) 124:5466–80. doi: 10.1172/JCI77053
 115. Singhal S, Bhojnagarwala PS, O'Brien S, Moon EK, Garfall AL, Rao AS, et al. Origin and role of a subset of tumor-associated neutrophils with antigen-presenting cell features in early-stage human lung cancer. *Cancer Cell.* (2016) 30:120–35. doi: 10.1016/j.ccell.2016.06.001
 116. Khanh DT, Mekata E, Mukaiho K, Sugihara H, Shimizu T, Shiomi H, et al. Prognostic role of CD10⁺ myeloid cells in association with tumor budding at the invasion front of colorectal cancer. *Cancer Sci.* (2011) 102:1724–33. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.01987.x
 117. Wikberg ML, Ling A, Li X, Öberg Å, Edin S, Palmqvist R. Neutrophil infiltration is a favorable prognostic factor in early stages of colon cancer. *Hum Pathol.* (2017) 68:193–202. doi: 10.1016/j.humpath.2017.08.028
 118. Berry RS, Xiong M-J, Greenbaum A, Mortaji P, Nofchissey RA, Schultz F, et al. High levels of tumor-associated neutrophils are associated with improved overall survival in patients with stage II colorectal cancer. *PLoS ONE.* (2017) 12:e0188799. doi: 10.1371/journal.pone.0188799
 119. Jensen TO, Schmidt H, Møller HJ, Donskov F, Høyer M, Sjøegren P, et al. Intratumoral neutrophils and plasmacytoid dendritic cells indicate poor prognosis and are associated with pSTAT3 expression in AJCC stage I/II melanoma. *Cancer.* (2012) 118:2476–85. doi: 10.1002/cncr.26511
 120. Carus A, Ladekarl M, Hager H, Nedergaard BS, Donskov F. Tumour-associated CD66b⁺ neutrophil count is an independent prognostic factor for recurrence in localised cervical cancer. *Br J Cancer.* (2013) 108:2116–22. doi: 10.1038/bjc.2013.167
 121. Wang T-T, Zhao Y-L, Peng L-S, Chen N, Chen W, Lv Y-P, et al. Tumour-activated neutrophils in gastric cancer foster immune suppression and disease progression through GM-CSF-PD-L1 pathway. *Gut.* (2017) 66:1900–11. doi: 10.1136/gutjnl-2016-313075
 122. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med.* (2007) 13:463–9. doi: 10.1038/nm1565
 123. Caudrillier A, Kessenbrock K, Gilliss BM, Nguyen JX, Marques MB, Monestier M, et al. Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. *J Clin Invest.* (2012) 122:2661–71. doi: 10.1172/JCI61303
 124. Aleyd E, Hout MWM van, Ganzevles SH, Hoeben KA, Everts V, Bakema JE, et al. IgA enhances NETosis and release of neutrophil extracellular traps by polymorphonuclear cells via Fcα receptor I. *J Immunol.* (2014) 192:2374–83. doi: 10.4049/jimmunol.1300261
 125. Behnen M, Leschczyk C, Möller S, Batel T, Klinger M, Solbach W, et al. Immobilized immune complexes induce neutrophil extracellular trap release by human neutrophil granulocytes via FcγRIIIB and Mac-1. *J Immunol.* (2014) 193:1954–65. doi: 10.4049/jimmunol.1400478
 126. Glodde N, Bald T, van den Boorn-Konijnenberg D, Nakamura K, O'Donnell JS, Szczepanski S, et al. Reactive neutrophil responses dependent on the receptor tyrosine kinase c-MET limit cancer immunotherapy. *Immunity.* (2017) 47:789–802.e9. doi: 10.1016/j.immuni.2017.09.012
 127. Schmielau J, Finn OJ. Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of T-cell function in advanced cancer patients. *Cancer Res.* (2001) 61:4756–60.
 128. Singel KL, Emmons TR, Khan ANH, Mayor PC, Shen S, Wong JT, et al. Mature neutrophils suppress T cell immunity in ovarian cancer microenvironment. *JCI Insight.* (2019) 4:122311. doi: 10.1172/jci.insight.122311
 129. Boross P, Lohse S, Nederend M, Jansen JHM, Tetering G van, Dechant M, et al. IgA EGFR antibodies mediate tumour killing *in vivo*. *EMBO Mol Med.* (2013) 5:1213–26. doi: 10.1002/emmm.201201929
 130. Engblom C, Pfirschke C, Zilionis R, Da Silva Martins J, Bos SA, Courties G, et al. Osteoblasts remotely supply lung tumors with cancer-promoting SiglecFhigh neutrophils. *Science.* (2017) 358:eaa5081. doi: 10.1126/science.aal5081
 131. Wu C, Ning H, Liu M, Lin J, Luo S, Zhu W, et al. Spleen mediates a distinct hematopoietic progenitor response supporting tumor-promoting myelopoiesis. *J Clin Invest.* (2018) 128:3425–38. doi: 10.1172/JCI97973
 132. Dumortier A, Kirstetter P, Kastner P, Chan S. Ikaros regulates neutrophil differentiation. *Blood.* (2003) 101:2219–26. doi: 10.1182/blood-2002-05-1336
 133. Papanthanasou P, Perkins AC, Cobb BS, Ferrini R, Sridharan R, Hoyne GF, et al. Widespread failure of hematolymphoid differentiation caused by a recessive niche-filling allele of the Ikaros transcription factor. *Immunity.* (2003) 19:131–44. doi: 10.1016/S1074-7613(03)00168-7
 134. Bronte V, Pittet MJ. The spleen in local and systemic regulation of immunity. *Immunity.* (2013) 39:806–18. doi: 10.1016/j.immuni.2013.10.010
 135. Eggert T, Wolter K, Ji J, Ma C, Yevsa T, Klotz S, et al. Distinct functions of senescence-associated immune responses in liver tumor surveillance and tumor progression. *Cancer Cell.* (2016) 30:533–47. doi: 10.1016/j.ccell.2016.09.003
 136. Waight JD, Hu Q, Miller A, Liu S, Abrams SI. Tumor-derived G-CSF facilitates neoplastic growth through a granulocytic myeloid-derived suppressor cell-dependent mechanism. *PLoS ONE.* (2011) 6:e27690. doi: 10.1371/journal.pone.0027690
 137. Kowanetz M, Wu X, Lee J, Tan M, Hagenbeek T, Qu X, et al. Granulocyte-colony stimulating factor promotes lung metastasis through mobilization of Ly6G+Ly6C+ granulocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2010) 107:21248–55. doi: 10.1073/pnas.1015855107
 138. Bendall LJ, Bradstock KF. G-CSF: from granulopoietic stimulant to bone marrow stem cell mobilizing agent. *Cytokine Growth Factor Rev.* (2014) 25:355–67. doi: 10.1016/j.cytogfr.2014.07.011
 139. Groblewska M, Mroczko B, Wereszczynska-Siemiatkowska U, Mysłiwiec P, Kedra B, Szmikowski M. Serum levels of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) in pancreatic cancer patients. *Clin Chem Lab Med.* (2007) 45:30–4. doi: 10.1515/CCLM.2007.025
 140. Mroczko B, Szmikowski M, Okulczyk B. Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) and macrophagecolony stimulating factor (M-CSF) in colorectal cancer patients. *Clin Chem Lab Med.* (2002) 40:351–5. doi: 10.1515/CCLM.2002.056
 141. Mroczko B, Szmikowski M, Niklinski J. Granulocyte-Colony stimulating factor and macrophage-colony stimulating factor in patients with non-small-cell lung cancer. *Clin Chem Lab Med.* (2001) 39:374–9. doi: 10.1515/CCLM.2001.059
 142. Nishimura K, Higashino M, Hara T, Oka T. Bladder cancer producing granulocyte colony-stimulating factor: a case report. *Int J Urol.* (1996) 3:152–4. doi: 10.1111/j.1442-2042.1996.tb00502.x
 143. Asano T, Morimoto S, Kitami Y, Miyauchi T, Sakai K, Takagi K. [Bladder cancer producing granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF): a case report]. *Hinyokika Kyo.* (2002) 48:495–8.
 144. Nasu K, Inoue C, Takai N, Kashima K, Miyakawa I. Squamous cell carcinoma of the cervix producing granulocyte colony-stimulating factor. *Obstet Gynecol.* (2004) 104:1086–8. doi: 10.1097/01.AOG.0000141552.87313.c8
 145. Yeo B, Redfern AD, Mouchemore KA, Hamilton JA, Anderson RL. The dark side of granulocyte-colony stimulating factor: a supportive therapy with potential to promote tumour progression. *Clin Exp Metastasis.* (2018) 35:255–67. doi: 10.1007/s10585-018-9917-7
 146. Papaldo P, Lopez M, Cortesi E, Cammilluzzi E, Antimi M, Terzoli E, et al. Addition of either lonidamine or granulocyte colony-stimulating factor

- does not improve survival in early breast cancer patients treated with high-dose epirubicin and cyclophosphamide. *J Clin Oncol.* (2003) 21:3462–8. doi: 10.1200/JCO.2003.03.034
147. Panopoulos AD, Watowich SS. Granulocyte colony-stimulating factor: molecular mechanisms of action during steady state and “emergency” hematopoiesis. *Cytokine.* (2008) 42:277–88. doi: 10.1016/j.cyto.2008.03.002
 148. Akbay EA, Koyama S, Liu Y, Dries R, Bufe LE, Silkes M, et al. Interleukin-17A promotes lung tumor progression through neutrophil attraction to tumor sites and mediating resistance to PD-1 blockade. *J Thorac Oncol.* (2017) 12:1268–79. doi: 10.1016/j.jtho.2017.04.017
 149. Wu J, Du J, Liu L, Li Q, Rong W, Wang L, et al. Elevated pretherapy serum IL17 in primary hepatocellular carcinoma patients correlate to increased risk of early recurrence after curative hepatectomy. *PLoS ONE.* (2012) 7:e50035. doi: 10.1371/journal.pone.0050035
 150. Xu C, Hao K, Yu L, Zhang X. Serum interleukin-17 as a diagnostic and prognostic marker for non-small cell lung cancer. *Biomarkers.* (2014) 19:287–90. doi: 10.3109/1354750X.2014.908954
 151. Pan B, Che D, Cao J, Shen J, Jin S, Zhou Y, et al. Interleukin-17 levels correlate with poor prognosis and vascular endothelial growth factor concentration in the serum of patients with non-small cell lung cancer. *Biomarkers.* (2015) 20:232–9. doi: 10.3109/1354750X.2015.1068853
 152. Cacalano G, Lee J, Kikly K, Ryan AM, Pitts-Meek S, Hultgren B, et al. Neutrophil and B cell expansion in mice that lack the murine IL-8 receptor homolog. *Science.* (1994) 265:682–4. doi: 10.1126/science.8036519
 153. Martin C, Burdon PCE, Bridger G, Gutierrez-Ramos JC, Williams TJ, Rankin SM. Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence. *Immunity.* (2003) 19:583–93. doi: 10.1016/S1074-7613(03)00263-2
 154. Eash KJ, Greenbaum AM, Gopalan PK, Link DC. CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *J Clin Invest.* (2010) 120:2423–31. doi: 10.1172/JCI41649
 155. Devi S, Wang Y, Chew WK, Lima R, A-González N, Mattar CNZ, et al. Neutrophil mobilization via plerixafor-mediated CXCR4 inhibition arises from lung demargination and blockade of neutrophil homing to the bone marrow. *J Exp Med.* (2013) 210:2321–36. doi: 10.1084/jem.20130056
 156. Gong L, Cumpian AM, Caetano MS, Ochoa CE, De la Garza MM, Lapid DJ, et al. Promoting effect of neutrophils on lung tumorigenesis is mediated by CXCR2 and neutrophil elastase. *Mol Cancer.* (2013) 12:154. doi: 10.1186/1476-4598-12-154
 157. Steele CW, Karim SA, Leach JDG, Bailey P, Upstill-Goddard R, Rishi L, et al. CXCR2 inhibition profoundly suppresses metastases and augments immunotherapy in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell.* (2016) 29:832–45. doi: 10.1016/j.ccell.2016.04.014
 158. Luppi F, Longo AM, de Boer WI, Rabe KF, Hiemstra PS. Interleukin-8 stimulates cell proliferation in non-small cell lung cancer through epidermal growth factor receptor transactivation. *Lung Cancer Amst Neth.* (2007) 56:25–33. doi: 10.1016/j.lungcan.2006.11.014
 159. Saintigny P, Massarelli E, Lin S, Ahn Y-H, Chen Y, Goswami S, et al. CXCR2 expression in tumor cells is a poor prognostic factor and promotes invasion and metastasis in lung adenocarcinoma. *Cancer Res.* (2013) 73:571–82. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0263
 160. Zhu YM, Webster SJ, Flower D, Woll PJ. Interleukin-8/CXCL8 is a growth factor for human lung cancer cells. *Br J Cancer.* (2004) 91:1970–6. doi: 10.1038/sj.bjc.6602227
 161. Eash KJ, Means JM, White DW, Link DC. CXCR4 is a key regulator of neutrophil release from the bone marrow under basal and stress granulopoiesis conditions. *Blood.* (2009) 113:4711–9. doi: 10.1182/blood-2008-09-177287
 162. Jung K, Heishi T, Incio J, Huang Y, Beech EY, Pinter M, et al. Targeting CXCR4-dependent immunosuppressive Ly6Clow monocytes improves antiangiogenic therapy in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2017) 114:10455–60. doi: 10.1073/pnas.1710754114
 163. Xue L, Mao X, Ren L, Chu X. Inhibition of CXCL12/CXCR4 axis as a potential targeted therapy of advanced gastric carcinoma. *Cancer Med.* (2017) 6:1424–36. doi: 10.1002/cam4.1085
 164. Redjal N, Chan JA, Segal RA, Kung AL. CXCR4 inhibition synergizes with cytotoxic chemotherapy in gliomas. *Clin Cancer Res.* (2006) 12:6765–71. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1372
 165. Taromi S, Kayser G, Catusse J, von Elverfeldt D, Reichardt W, Braun F, et al. CXCR4 antagonists suppress small cell lung cancer progression. *Oncotarget.* (2016) 7:85185–95. doi: 10.18632/oncotarget.13238
 166. Domanska UM, Timmer-Bosscha H, Nagengast WB, Oude Munnink TH, Kruizinga RC, Ananias HJK, et al. CXCR4 inhibition with AMD3100 sensitizes prostate cancer to docetaxel chemotherapy. *Neoplasia.* (2012) 14:709–18. doi: 10.1593/neo.12324
 167. Baltschukat S, Engstler BS, Huang A, Hao H-X, Tam A, Wang HQ, et al. Capmatinib (INC280) is active against models of non-small cell lung cancer and other cancer types with defined mechanisms of MET activation. *Clin Cancer Res.* (2019) 25:3164–75. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-2814
 168. Finisguerra V, Di Conza G, Di Matteo M, Serneels J, Costa S, Thompson AAR, et al. MET is required for the recruitment of anti-tumoural neutrophils. *Nature.* (2015) 522:349–53. doi: 10.1038/nature14407
 169. Dominguez GA, Condamine T, Mony S, Hashimoto A, Wang F, Liu Q, et al. Selective targeting of myeloid-derived suppressor cells in cancer patients using DS-8273a, an agonistic TRAIL-R2 antibody. *Clin Cancer Res.* (2016) 23:2942–50. doi: 10.1158/1538-7445.AM2017-CT095
 170. Vincent J, Mignot G, Chalmin F, Ladoire S, Bruchard M, Chevriaux A, et al. 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. *Cancer Res.* (2010) 70:3052–61. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3690
 171. Bruchard M, Mignot G, Derangère V, Chalmin F, Chevriaux A, Végran F, 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. doi: 10.1038/nm.2999
 172. Wang Z, Till B, Gao Q. Chemotherapeutic agent-mediated elimination of myeloid-derived suppressor cells. *Oncoimmunology.* (2017) 6:e1331807. doi: 10.1080/2162402X.2017.1331807
 173. Fleming V, Hu X, Weber R, Nagibin V, Groth C, Altevogt P, et al. Targeting myeloid-derived suppressor cells to bypass tumor-induced immunosuppression. *Front Immunol.* (2018) 9:398. doi: 10.3389/fimmu.2018.00398
 174. Patil MD, Bhaumik J, Babykutty S, Banerjee UC, Fukumura D. Arginine dependence of tumor cells: targeting a chink in cancer’s armor. *Oncogene.* (2016) 35:4957–72. doi: 10.1038/onc.2016.37
 175. García-Navas R, Munder M, Mollinedo F. Depletion of L-arginine induces autophagy as a cytoprotective response to endoplasmic reticulum stress in human T lymphocytes. *Autophagy.* (2012) 8:1557–76. doi: 10.4161/auto.21315
 176. Geiger R, Rieckmann JC, Wolf T, Basso C, Feng Y, Fuhrer T, et al. L-arginine modulates T cell metabolism and enhances survival and anti-tumor activity. *Cell.* (2016) 167:829–42.e13. doi: 10.1016/j.cell.2016.09.031
 177. Steggerda SM, Bennett MK, Chen J, Emberley E, Huang T, Janes JR, et al. Inhibition of arginase by CB-1158 blocks myeloid cell-mediated immune suppression in the tumor microenvironment. *J Immunother Cancer.* (2017) 5:101. doi: 10.1186/s40425-017-0308-4
 178. Lam TL, Wong GKY, Chong HC, Cheng PNM, Choi SC, Chow TL, et al. Recombinant human arginase inhibits proliferation of human hepatocellular carcinoma by inducing cell cycle arrest. *Cancer Lett.* (2009) 277:91–100. doi: 10.1016/j.canlet.2008.11.031
 179. Lam T-L, Wong GKY, Chow H-Y, Chong H-C, Chow T-L, Kwok S-Y, et al. Recombinant human arginase inhibits the *in vitro* and *in vivo* proliferation of human melanoma by inducing cell cycle arrest and apoptosis. *Pigment Cell Melanoma Res.* (2011) 24:366–76. doi: 10.1111/j.1755-148X.2010.00798.x
 180. Chow AKM, Ng L, Sing Li H, Cheng CW, Lam CSC, Yau TCC, et al. Anti-tumor efficacy of a recombinant human arginase in human hepatocellular carcinoma. *Curr Cancer Drug Targets.* (2012) 12:1233–43. doi: 10.2174/156800912803988002
 181. Li L, Wang Y, Chen J, Cheng B, Hu J, Zhou Y, et al. An engineered arginase FC protein inhibits tumor growth *in vitro* and *in vivo*. *Evid Based Complement Alternat Med.* (2013) 2013:423129. doi: 10.1155/2013/423129
 182. Wang X, Shi X, Li Y, Fan J, Zeng X, Xian Z, et al. Blocking autophagy enhanced cytotoxicity induced by recombinant human arginase in triple-negative breast cancer cells. *Cell Death Dis.* (2014) 5:e1563. doi: 10.1038/cddis.2014.503
 183. Agnello G, Alters SE, Lowe DG, Rowlinson SW. Abstract 3964: reducing systemic arginine with arginase (AEB1102) therapy does not suppress the

- immune response induced by anti-PD-1 and anti-PD-L1, and exerts an additive anti-tumor and synergistic survival benefit. *Cancer Res.* (2017) 77:3964. doi: 10.1158/1538-7445.AM2017-3964
184. Agnello G, Badeaux MD, Enzler D, Priddy L, Wiggins JF, Daige CL, et al. Abstract 869: depletion of blood arginine with pegzilarginase (AEB1102) in combination with anti-PD-L1 increases tumor infiltration by immune cells and enhances antitumor activity. *Cancer Res.* (2018) 78:869. doi: 10.1158/1538-7445.AM2018-869
185. Zhou S-L, Zhou Z-J, Hu Z-Q, Huang X-W, Wang Z, Chen E-B, et al. Tumor-associated neutrophils recruit macrophages and T-regulatory cells to promote progression of hepatocellular carcinoma and resistance to sorafenib. *Gastroenterology.* (2016) 150:1646–58.e17. doi: 10.1053/j.gastro.2016.02.040
186. Ko JS, Zea AH, Rini BI, Ireland JL, Elson P, Cohen P, et al. Sunitinib mediates reversal of myeloid-derived suppressor cell accumulation in renal cell carcinoma patients. *Clin Cancer Res.* (2009) 15:2148–57. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1332
187. Ko JS, Rayman P, Ireland J, Swaidani S, Li G, Bunting KD, et al. Direct and differential suppression of myeloid-derived suppressor cell subsets by sunitinib is compartmentally constrained. *Cancer Res.* (2010) 70:3526–36. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3278
188. Finke J, Ko J, Rini B, Rayman P, Ireland J, Cohen P. MDSC as a mechanism of tumor escape from sunitinib mediated anti-angiogenic therapy. *Int Immunopharmacol.* (2011) 11:853–8. doi: 10.1016/j.intimp.2011.01.030
189. Draghiciu O, Nijman HW, Hoogeboom BN, Meijerhof T, Daemen T. Sunitinib depletes myeloid-derived suppressor cells and synergizes with a cancer vaccine to enhance antigen-specific immune responses and tumor eradication. *Oncimmunology.* (2015) 4:e989764. doi: 10.4161/2162402X.2014.989764
190. Corrales L, Ajona D, Rafail S, Lasarte JJ, Riezu-Boj JI, Lambris JD, et al. Anaphylatoxin C5a creates a favorable microenvironment for lung cancer progression. *J Immunol.* (2012) 189:4674–83. doi: 10.4049/jimmunol.1201654
191. Ajona D, Ortiz-Espinosa S, Moreno H, Lozano T, Pajares MJ, Agorreta J, et al. A combined PD-1/C5a blockade synergistically protects against lung cancer growth and metastasis. *Cancer Discov.* (2017) 7:694–703. doi: 10.1158/2159-8290.CD-16-1184
192. Medler TR, Murugan D, Horton W, Kumar S, Cotecchini T, Forsyth AM, et al. Complement C5a fosters squamous carcinogenesis and limits T cell response to chemotherapy. *Cancer Cell.* (2018) 34:561–78.e6. doi: 10.1016/j.ccell.2018.09.003
193. Demaria O, Rubio L, Belaid N, Habib G, Bonnafous C, Zerbib R, et al. Characterization of anti-C5aR antibodies for specific Poster # B184 targeting of myeloid cells and neutrophils in the TME.1. In: *Third CRI-CIMT-EATI-AACR International Cancer Immunotherapy Conference.* Frankfurt (2017).
194. Kortylewski M, Kujawski M, Wang T, Wei S, Zhang S, Pilon-Thomas S, et al. Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity. *Nat Med.* (2005) 11:1314–21. doi: 10.1038/nm1325
195. Rosborough BR, Mathews LR, Matta BM, Liu Q, Raich-Regué D, Thomson AW, et al. Cutting edge: Flt3 ligand mediates STAT3-independent expansion but STAT3-dependent activation of myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol.* (2014) 192:3470–3. doi: 10.4049/jimmunol.1300058
196. Zhou J, Qu Z, Sun F, Han L, Li L, Yan S, et al. Myeloid STAT3 promotes lung tumorigenesis by transforming tumor immunosurveillance into tumor-promoting inflammation. *Cancer Immunol Res.* (2017) 5:257–68. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-16-0073
197. Su Y-L, Banerjee S, White SV, Kortylewski M. STAT3 in tumor-associated myeloid cells: multitasking to disrupt immunity. *Int J Mol Sci.* (2018) 19:E1803. doi: 10.3390/ijms19061803
198. Kujawski M, Kortylewski M, Lee H, Herrmann A, Kay H, Yu H. Stat3 mediates myeloid cell-dependent tumor angiogenesis in mice. *J Clin Invest.* (2008) 118:3367–77. doi: 10.1172/JCI35213
199. Kortylewski M, Moreira D. Myeloid cells as a target for oligonucleotide therapeutics: turning obstacles into opportunities. *Cancer Immunol Immunother.* (2017) 66:979–88. doi: 10.1007/s00262-017-1966-2
200. Hossain F, Al-Khami AA, Wyczzechowska D, Hernandez C, Zheng L, Reiss K, et al. Inhibition of fatty acid oxidation modulates immunosuppressive functions of myeloid-derived suppressor cells and enhances cancer therapies. *Cancer Immunol Res.* (2015) 3:1236–47. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0036
201. Al-Khami AA, Zheng L, Del Valle L, Hossain F, Wyczzechowska D, Zabaleta J, et al. Exogenous lipid uptake induces metabolic and functional reprogramming of tumor-associated myeloid-derived suppressor cells. *Oncimmunology.* (2017) 6:e1344804. doi: 10.1080/2162402X.2017.1344804
202. Veglia F, Tyurin VA, Blasi M, De Leo A, Kossenkov AV, Donthireddy L, et al. Fatty acid transport protein 2 reprograms neutrophils in cancer. *Nature.* (2019) 569:73–8. doi: 10.1038/s41586-019-1118-2
203. Wenzel SE, Kamada AK. Zileuton: the first 5-lipoxygenase inhibitor for the treatment of asthma. *Ann Pharmacother.* (1996) 30:858–64. doi: 10.1177/106002809603000725
204. Najmeh S, Cools-Lartigue J, Rayes RF, Gowing S, Vourtzoumis P, Bourdeau F, et al. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells via β 1-integrin mediated interactions. *Int J Cancer.* (2017) 140:2321–30. doi: 10.1002/ijc.30635
205. Alelyd E, Heineke MH, van Egmond M. The era of the immunoglobulin A Fc receptor Fc α RI; its function and potential as target in disease. *Immunol Rev.* (2015) 268:123–38. doi: 10.1111/imr.12337
206. Kasikara C, Davra V, Calianese D, Geng K, Spires TE, Quigley M, et al. Pan-TAM tyrosine kinase inhibitor BMS-777607 enhances anti-PD-1 mAb efficacy in a murine model of triple-negative breast cancer. *Cancer Res.* (2019) 79:2669–83. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-2614
207. Angelova M, Mlecnik B, Vasaturo A, Bindea G, Fredriksen T, Lafontaine L, et al. Evolution of metastases in space and time under immune selection. *Cell.* (2018) 175:751–65.e16. doi: 10.1016/j.cell.2018.09.018
208. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell.* (2012) 149:1060–72. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.042

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Lecot, Sarabi, Pereira Abrantes, Mussard, Koenderman, Caux, Bendriss-Vermare and Michallet. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Annexe 3. Revue sur les effets de la senescence dans le cancer.

Keywords: immunosurveillance; inflammation; oncogene; senescence-associated secretory phenotype; tumour progression; tumour suppression

Context-dependent effects of cellular senescence in cancer development

Pacome Lecot¹, Fatouma Alimirah¹, Pierre-Yves Desprez^{1,2}, Judith Campisi^{1,3} and Christopher Wiley^{*1}

¹Buck Institute for Research on Aging, 8001 Redwood Boulevard, Novato, CA 94945, USA; ²California Pacific Medical Center, 475 Brannan Street, San Francisco, CA 94107, USA and ³Lawrence Berkeley National Laboratory, 1 Cyclotron Road, Berkeley, CA 94720, USA

Cellular senescence is an established tumour-suppressive mechanism that prevents the proliferation of premalignant cells. However, several lines of evidence show that senescent cells, which often persist *in vivo*, can also promote tumour progression in addition to other age-related pathologies via the senescence-associated secretory phenotype (SASP). Moreover, new insights suggest the SASP can facilitate tissue repair. Here, we review the beneficial and detrimental roles of senescent cells, highlighting conditions under which the senescence response does and does not promote pathology, particularly cancer. By better understanding the context-dependent effects of cellular senescence, it may be feasible to limit its detrimental properties while preserving its beneficial effects, and develop novel therapeutic strategies to prevent or treat cancer and possibly other age-associated diseases.

Cellular senescence was first identified as an intrinsic process that halts the proliferation of normal cells (Hayflick, 1965; Campisi, 2005). Decades later, it became apparent that the senescence response is a potent tumour-suppressive mechanism that halts the proliferation of premalignant cells (Hayflick, 1965; Campisi, 2005). Mice (and humans) that are deficient in mounting a senescence response are inevitably cancer prone.

In response to the potentially oncogenic signals, cells enter an essentially irreversible senescent state, which is established and maintained by the p53/p21 and p16INK4a/pRB tumour-suppressor pathways (Serrano *et al*, 1997). Ironically, the accumulation of senescent cells over time can also promote tumorigenesis through the secretion of numerous bioactive molecules termed as the senescence-associated secretory phenotype (SASP; Coppe *et al*, 2008) or senescence-messaging secretome (Kuilman and Peeper, 2009) (Figure 1). SASP factors include pro-inflammatory cytokines, chemokines, growth factors and proteases (Kortlever *et al*, 2006; Acosta *et al*, 2008; Wajapeyee *et al*, 2008). Although the SASP can contribute to a pro-carcinogenic microenvironment, recent findings show it can also promote tissue remodelling and wound healing (Demaria *et al*, 2014). Therefore, depending upon the context, it is now clear that cellular senescence and the SASP contribute to myriad physiological functions, both beneficial and deleterious. The goal of this review is to present and discuss these different aspects.

THE 'BRIGHT SIDE' OF SENESCENCE AND THE SASP

As mentioned in the Introduction, senescence was initially considered as a tumour-suppressive mechanism (Hayflick, 1965), and this aspect has been the subject of a substantial amount of literature during the past several decades. However, it is only recently that other beneficial effects of senescent cells have been described, and it is on these novel aspects that we are focusing the first part of our review.

Senescent cells facilitate tissue repair. In addition to stopping proliferation of premalignant cells, some data suggest that senescence has indeed other beneficial effects. In response to acute liver injury, hepatic stellate cells are induced to proliferate and produce extracellular matrices to repair the damage, but then undergo senescence. In mice lacking senescence effectors, hepatic stellate cells continue to proliferate and produce excessive extracellular matrix (ECM) leading to tissue fibrosis. Thus, liver injury induces a senescence response, which limited liver fibrosis; this effect is critically dependent on the matrix metalloproteinases that comprise part of the SASP (Krizhanovskiy *et al*, 2008b). In the presence of chronic liver damage, ablation of a p53-dependent senescence programme in hepatic stellate cells increases liver fibrosis and cirrhosis, and this ablation is associated with reduced

*Correspondence: Dr C Wiley; E-mail: cwiley@buckinstitute.org

Received 29 January 2016; revised 28 March 2016; accepted 1 April 2016; published online 3 May 2016

© 2016 Cancer Research UK. All rights reserved 0007–0920/16



survival and enhanced transformation of adjacent epithelial cells into hepatocellular carcinoma (Lujambio *et al*, 2013).

Although the limitation of hepatic fibrosis is an important consequence of senescence, other models of tissue injury reveal additional roles for senescent cells in response to injury. Indeed, senescent cells and the SASP are also important for optimal wound healing (Jun and Lau, 2010; Demaria *et al*, 2014). In response to cutaneous wounds, fibroblasts and endothelial cells undergo senescence in a matricellular CCN1-dependent manner (Jun and Lau, 2010). This senescence accelerates wound closure by inducing myofibroblast differentiation through the secretion of platelet-derived growth factor AA (PDGF-AA; Demaria *et al*, 2014). Selective elimination of p16INK4a-positive senescent cells using transgenic mice delays wound closure, and topical treatment of senescence-free wounds with recombinant PDGF-AA rescues the delayed wound closure and induces myofibroblast differentiation in the absence of senescence.

Senescent cells recruit immune cells. In addition to its beneficial role in wound healing, senescent cells recruit innate immune cells to kill tumour cells (Ventura *et al*, 2007; Xue *et al*, 2007). In particular, SASP factors recruit natural killer cells to eliminate malignant cells (Iannello *et al*, 2013). In addition, SASP components attract immune cells, which can remove nearby damaged cells (Krizhanovsky *et al*, 2008a). Premalignant but senescent murine hepatocytes secrete chemokines and cytokines that promote immune-mediated clearance (senescence surveillance), which requires an intact CD4⁺ T-cell-mediated adaptive immune response. Impaired immune surveillance of these premalignant senescent hepatocytes fosters the development of hepatocellular carcinomas (Kang *et al*, 2011). Thus, senescence can also suppress tumorigenesis *in vivo* through immune surveillance (Figure 1).

Senescence in development. Finally, senescent cells are also important during embryonic development for fine-tuning the morphogenesis of certain structures (Munoz-Espin *et al*, 2013; Storer *et al*, 2013). Senescence was only partially compensated for by apoptosis, thus attributing a role for senescence during embryonic tissue development. In contrast to damage and injury-induced senescence, embryonic senescence was found to be p21-dependent, but p53- and p16INK4a-independent.

Thus, there is a beneficial role for senescence and the SASP in development and tissue repair—an important ‘bright side’ of senescence that extends beyond tumour suppression (Figure 1). However, evidence continues to mount that the SASP can also be detrimental.

THE ‘DARK SIDE’ OF SENESCENCE AND THE SASP

The SASP is pro-tumorigenic. The SASP can create a pro-tumorigenic microenvironment in several ways. First, SASP factors support tumour cell invasion and metastasis by disrupting and remodelling tissue structure (Coppe *et al*, 2008; Rodier and Campisi, 2011). Senescent cells secrete large amounts of proteases that degrade the ECM, rendering the tissue structure more relaxed and thus facilitating the invasion of cancer cells (Coppe *et al*, 2008). SASP factors also facilitate tumour cell invasion by inducing an epithelial-to-mesenchymal transition in neighbouring cells (Laberge *et al*, 2012a). Specific interleukins that are part of the SASP indeed contribute to connect senescence with an inflammatory phenotype and cancer (Kuilman *et al*, 2008). Very recently, Baker *et al* (2016) demonstrated that the clearance of p16INK4a-positive cells delays tumorigenesis and attenuates age-related deterioration of several organs.

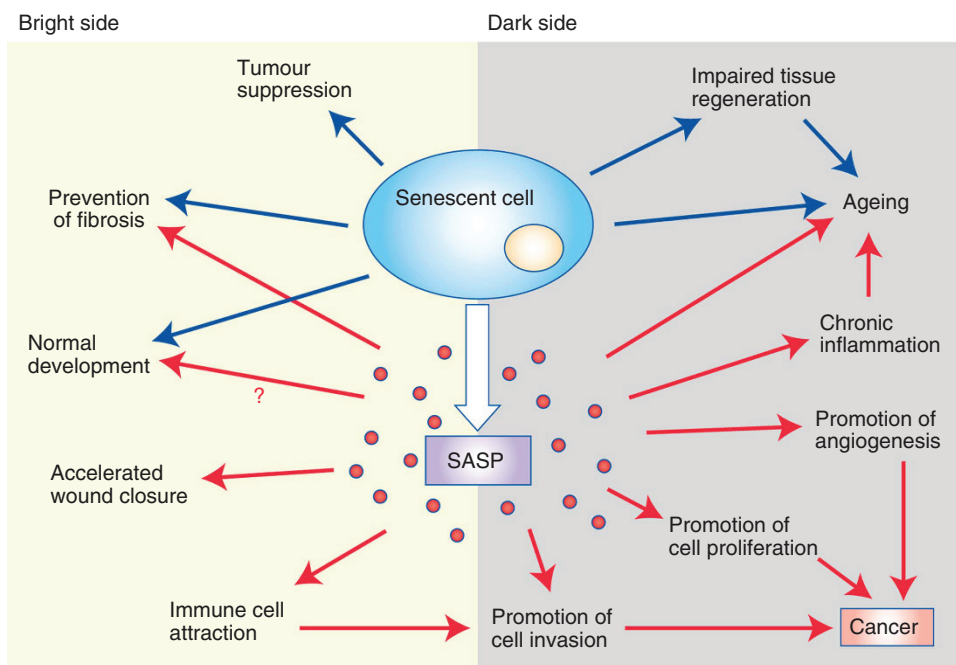


Figure 1. Bright and dark sides of cellular senescence. The bright side (left). Senescence growth arrest prevents tumorigenesis (senescence growth arrest effects = blue arrows). Senescence also limits fibrosis by preventing proliferation of cells that secrete ECM, whereas the SASP includes matrix metalloproteinases that digest fibrotic lesions (SASP effects = red arrows). Certain features of normal embryonic development are promoted by senescent cells, though it is unclear if this is dependent on the SASP. Components of the SASP accelerate wound closure and attract immune cells. The dark side (right). The loss of proliferative potential that accompanies senescence impairs tissue regeneration and promotes aging, whereas the SASP also promotes aging at least in part by inducing a chronic inflammatory state in the tissue microenvironment. The SASP also contains factors that promote angiogenesis, cell proliferation, and cancer cell invasiveness. Furthermore, immune cells attracted by the SASP can disrupt the local microenvironment and promote tumour cell invasion. These final activities result in cancer progression.

Second, senescent cells can directly or indirectly promote tumour vascularisation. Senescent cells secrete a variety of angiogenic factors that promote the proliferation and assembly of endothelial cells for neo-angiogenesis (Davalos *et al*, 2010). Senescent cells can also indirectly promote angiogenesis by recruiting macrophages and stimulating them to adopt a pro-angiogenic M2 phenotype (Kelly *et al*, 2007).

Third, the SASP promotes tumour growth by establishing a microenvironment that is immunosuppressive. Senescent cells secrete cytokines that recruit myeloid-derived suppressor cells that inhibit CD8⁺ T-lymphocyte-mediated killing of tumour cells (Toso *et al*, 2014). By modifying the SASP through STAT3 inhibition, the secretion of several immunosuppressive cytokines is diminished leading to a strong anti-tumour response triggered by CD8⁺ T lymphocytes and tumour regression (Toso *et al*, 2014). These various activities of the SASP (Figure 1) make it an appealing target for novel adjuvant anti-cancer therapies.

Methods to target the detrimental SASP. The SASP can be targeted using several approaches. First, the SASP can be eliminated by directly killing the senescent cells, particularly using genetically modified mice. The selective elimination of p16INK4a-expressing senescent cells by apoptosis delays several age-related pathologies, in a progeroid mouse model (Baker *et al*, 2011; Childs *et al*, 2014), and tumorigenesis (Baker *et al*, 2016). Another recent study showed that hematopoietic cells were rejuvenated following elimination of senescent cells in mice prematurely aged due to total body irradiation (Chang *et al*, 2015). Another way to target the SASP is by decreasing the secretion of SASP factors. One approach is an inhibition of p38MAPK (Freund *et al*, 2011). Diverse stimuli activate this stress-inducible kinase when normal cells undergo senescence, and p38MAPK inhibition by genetic or pharmacological means markedly reduces the secretion of many SASP factors.

From a translation perspective, the SASP can also be targeted in a purely pharmacological approach using specific compounds. For example, treatment of human fibroblasts with glucocorticoids—corticosterone or cortisol—suppresses senescence-associated inflammation without reversing the tumour-suppressive growth arrest, in both oncogene- and radiation-induced senescent cells (Laberge *et al*, 2012b). Similarly, the mTOR inhibitor, rapamycin, blunts the pro-inflammatory phenotype of senescent human fibroblasts by preventing the translation of IL-1 α , which controls the expression of other pro-inflammatory cytokines such as IL-6 (Orjalo *et al*, 2009; Laberge *et al*, 2015). Importantly, rapamycin suppresses the ability of senescent fibroblasts to stimulate prostate tumour growth in mice (Laberge *et al*, 2015). Furthermore, simvastatin, an approved lipid-regulating drug, was recently shown to decrease the SASP of senescent human fibroblasts by inhibiting protein prenylation without affecting the growth arrest (Liu *et al*, 2015). The Rho GTPases Rac1 and Cdc42 are activated in senescent cells, and simvastatin reduces both activities leading to reduced secretion of the major SASP factor IL-6. Notably, the SASP promotes breast cancer cell proliferation, and simvastatin suppresses this proliferation (Liu *et al*, 2015).

On the basis of all the results presented in the last two sections ('bright' vs 'dark' sides), it is increasingly obvious that inhibiting the SASP will need to be judiciously applied in a targeted manner.

CONTEXT-DEPENDENT EFFECTS OF SENESCENCE AND THE SASP

Tissue regeneration/differentiation-dependent effects. In addition to genotoxic stress or oncogene activation, mitochondrial dysfunction, mediated by any of several means, results in a distinct senescent phenotype termed mitochondrial dysfunction-associated senescence (MiDAS; Wiley *et al*, 2016). MiDAS results from

a reduced NAD⁺/NADH ratio, AMPK activation and p53 phosphorylation, which imposes a senescence growth arrest. MiDAS-induced p53 activation suppresses the IL-1 arm of the SASP, leading to a distinct SASP.

In vivo, MiDAS was shown to occur in skin and fat tissues. In culture, the MiDAS SASP inhibits adipogenesis and promotes keratinocyte differentiation (Wiley *et al*, 2016). At young ages, MiDAS-induced keratinocyte differentiation is beneficial and accelerates wound healing, but is detrimental at old ages where senescence depletes epidermal stem cells and reduces wound healing (Velarde *et al*, 2015). These studies support the idea that the pleiotropic effects of senescence are inextricably context dependent.

Notably, pyruvate prevents MiDAS in cells with compromised mitochondrial function by restoring cytosolic NAD⁺/NADH ratios. While these cells are not senescent, they develop a secretory phenotype similar to the SASP observed following genotoxic stress or oncogene activation (Wiley *et al*, 2016). Much like the pro-inflammatory SASP, these secreted factors promote an epithelial-mesenchymal transition and an invasive phenotype in breast cancer cells, whereas the secretion of cells cultured without pyruvate (MiDAS cells) does not (Wiley and Campisi, unpublished data). Thus, some effects of senescence may depend on the availability of extracellular factors, such as pyruvate, in the context of the local tissue microenvironment.

Effects dependent on senescence dynamics. Mounting evidence supports the idea that the timing of the presence of senescent cells influences the effects they and the SASP have *in vivo*. For example, developmental senescence was distinctly transient as senescent cells are cleared by immune cells shortly after their appearance. Similarly, during wound healing, senescent cells are present only transiently (Jun and Lau, 2010; Demaria *et al*, 2014). In contrast, the chronic presence of senescent cells is thought to be responsible for the detrimental effects of senescence (van Deursen, 2014). Ageing of the immune system could further promote the accumulation of senescent cells, thereby reinforcing the deleterious effects of senescence. Thus, the timing of senescence may be as important as the presence of senescent cells in determining whether they have a beneficial or deleterious role in tissue function.

Genetic/metabolic-dependent effects of senescence. The detrimental effects of the SASP may well be due to an increase in the number of senescent cells, which can occur during ageing or in response to environmental stimuli such as chemotherapy or toxic molecules produced by tumour cells. However, the SASP can also change in composition. Epithelial cells induced to senesce by loss of PTEN secrete higher level of the immunosuppressive cytokines CXCL2 and IL-10 than cells that senesce owing to oncogenic mutations in RAS. As a result, more immunosuppressive immune cells infiltrate tumours caused by a loss of PTEN, and consequently these tumours are more invasive than RAS-driven tumours (Toso *et al*, 2014). It is possible the SASP changes in chronically present senescent cells because these cells experience continuous genetic and epigenetic remodelling (van Deursen, 2014). It is also plausible that metabolic alterations determine the quality of the SASP as the intra- and extra-cellular metabolites can modify the SASP (Quijano *et al*, 2012; Wiley *et al*, 2016).

CONCLUSIONS

In order to develop more effective anti-cancer therapies, it might be paramount to understand senescent cells in both their beneficial and pathological contexts, particularly because the SASP can also induce paracrine senescence in normal cells, both in culture and *in vivo* (Acosta *et al*, 2013). Indeed, as this paracrine-induced secondary senescence also possesses its own, weaker secretory

phenotype, these effects could be both tumour-suppressive and tumour-promoting, depending on the context. Although the quality of the SASP can influence cancer progression, modification of the SASP might be a potential therapeutic strategy. Therapies aimed at suppressing the SASP might suppress tumorigenesis (Velarde *et al*, 2013). Depending on the tumour and tissue context, modulation of the SASP must be controlled in terms of quality and quantity of secreted factors, as well as the timing of secretion. A thorough characterisation of the genetics, epigenetics and metabolism of tumour-promoting senescent cells will be needed to efficiently modify the SASP. If modification is ineffective, killing senescent cells is a potential therapeutic alternative. It is plausible that persistent senescent tumour cells escape immunosurveillance via the cleavage of their antigens. In this situation, it would be efficacious to stimulate other immune cells for which the senescence antigen is still recognisable. If the patient's immune status is somehow compromised, activating apoptosis can trigger the killing of senescent cells. However, killing senescent cells risks losing their beneficial effects. Thus, although the early preclinical results are promising, senescence-targeted therapies are currently in their infancy. Future studies will determine which therapies are best used to exploit the context-dependent nature of senescent cells.

CONFLICT OF INTEREST

JC is a founder of Unity Biotechnology, which aims to develop senolytic drugs to treat age-related pathologies. The remaining authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Acosta JC, Banito A, Wuestefeld T, Georgilis A, Janich P, Morton JP, Athineos D, Kang TW, Lasitschka F, Andrusis M, Pascual G, Morris KJ, Khan S, Jin H, Dharmalingam G, Snijders AP, Carroll T, Capper D, Pritchard C, Inman GJ, Longrich T, Sansom OJ, Benitah SA, Zender L, Gil J (2013) A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol* **15**: 978–990.
- Acosta JC, O'Loughlin A, Banito A, Gujjarro MV, Augert A, Raguz S, Furnagalli M, DaCosta M, Brown C, Popov N, Takastu, Yabuta N, Melamed J, d'Adda di Fagnana F, Bernard D, Hernandez E, Gil J (2008) Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell* **133**: 1006–1018.
- Baker DJ, Childs BG, Durik M, Wijers ME, Sieben CJ, Zhong J, Saltness RA, Jeganathan KB, Verzosa GC, Pezeski A, Khazaie K, Miller JD, van Deursen JM (2016) Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* **530**: 184–189.
- Baker DJ, Wijshak T, Tchkonja T, LeBrasseur NK, Childs BG, van de Sluis B, Kirkland JL, van Deursen JM (2011) Clearance of p16(Ink4a)-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* **479**: 232–236.
- Campisi J (2005) Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* **120**: 513–522.
- Chang J, Wang Y, Shao L, Laberge RM, Demaria M, Campisi J, Janakiraman K, Sharpless NE, Ding S, Feng W, Luo Y, Wang X, Aykin-Burns N, Krager K, Ponnappan U, Hauer-Jensen M, Meng A, Zhou D (2015) Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat Med* **22**: 78–83.
- Childs BG, Baker DJ, Kirkland JL, Campisi J, van Deursen JM (2014) Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep* **15**: 1139–1153.
- Coppe JP, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Munoz DP, Goldstein J, Nelson PS, Desprez PY, Campisi J (2008) Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol* **6**: 2853–2868.
- Davalos AR, Coppe JP, Campisi J, Desprez PY (2010) Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* **29**: 273–283.
- Demaria M, Ohtani N, Youssef SA, Rodier F, Toussaint W, Mitchell JR, Laberge RM, Vijg J, Van Steeg H, Dolle ME, Hoeijmakers JH, de Bruin A, Hara E, Campisi J (2014) An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev Cell* **31**: 722–733.
- Freund A, Patil CK, Campisi J (2011) p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *EMBO J* **30**: 1536–1548.
- Hayflick L (1965) The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* **37**: 614–636.
- Iannello A, Thompson TW, Ardolino M, Lowe SW, Rautel DH (2013) p53-dependent chemokine production by senescent tumour cells supports NKG2D-dependent tumor elimination by natural killer cells. *J Exp Med* **210**: 2057–2069.
- Jun JI, Lau LF (2010) The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. *Nat Cell Biol* **12**: 676–685.
- Kang TW, Yevsa T, Woller N, Hoenicke L, Wuestefeld T, Dauch D, Hohmeyer A, Gereke M, Rudalska R, Potapova A, Iken M, Vucur M, Weiss S, Heikenwalder M, Khan S, Gil J, Bruder D, Manns M, Schirmacher P, Tacke F, Ott M, Luedde T, Longrich T, Kubicka S, Zender L (2011) Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature* **479**: 547–551.
- Kelly J, Ali Khan A, Yin J, Ferguson TA, Apte RS (2007) Senescence regulates macrophage activation and angiogenic fate at sites of tissue injury in mice. *J Clin Invest* **117**: 3421–3426.
- Kortlever RM, Higgins PJ, Bernards R (2006) Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. *Nat Cell Biol* **8**: 877–884.
- Krizhanovsky V, Xue W, Zender L, Yon M, Hernandez E, Lowe SW (2008a) Implications of cellular senescence in tissue damage response, tumor suppression, and stem cell biology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **73**: 513–522.
- Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, Hearn S, Simon J, Miething C, Yee H, Zender L, Lowe SW (2008b) Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell* **134**: 657–667.
- Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld LCW, Douma S, van Doorn R, Desmet CJ, Aarden LA, Mooi WJ, Peeper DS (2008) Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell* **133**: 1019–1031.
- Kuilman T, Peeper DS (2009) Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nat Rev Cancer* **9**: 81–94.
- Laberge RM, Awad P, Campisi J, Desprez PY (2012a) Epithelial-mesenchymal transition induced by senescent fibroblasts. *Cancer Microenviron* **5**: 39–44.
- Laberge RM, Sun Y, Orjalo AV, Patil CK, Freund A, Zhou L, Curran SC, Davalos AR, Wilson-Edell KA, Liu S, Limbad C, Demaria M, Li P, Hubbard GB, Ikeno Y, Javors M, Desprez PY, Benz CC, Kapahi P, Nelson PS, Campisi J (2015) MTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation. *Nat Cell Biol* **17**: 1049–1061.
- Laberge RM, Zhou L, Sarantos MR, Rodier F, Freund A, de Keizer PL, Liu S, Demaria M, Cong YS, Kapahi P, Desprez PY, Hughes RE, Campisi J (2012b) Glucocorticoids suppress selected components of the senescence-associated secretory phenotype. *Aging Cell* **11**: 569–578.
- Liu S, Uppal H, Demaria M, Desprez PY, Campisi J, Kapahi P (2015) Simvastatin suppresses breast cancer cell proliferation induced by senescent cells. *Sci Rep* **5**: 17895.
- Lujambio A, Akkari L, Simon J, Grace D, Tschaharganeh DF, Bolden JE, Zhao Z, Thapar V, Joyce JA, Krizhanovsky V, Lowe SW (2013) Non-cell-autonomous tumor suppression by p53. *Cell* **153**: 449–460.
- Munoz-Espin D, Canamero M, Maraver A, Gomez-Lopez G, Contreras J, Murillo-Cuesta S, Rodriguez-Baeza A, Varela-Nieto I, Ruberte J, Collado M, Serrano M (2013) Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell* **155**: 1104–1118.
- 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 USA* **106**: 17031–17036.
- Quijano C, Cao L, Fergusson MM, Romero H, Liu J, Gutkind S, Rovira, Mohney RP, Karoly ED, Finkel T (2012) Oncogene-induced senescence results in marked metabolic and bioenergetic alterations. *Cell Cycle* **11**: 1383–1392.
- Rodier F, Campisi J (2011) Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol* **192**: 547–556.

- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW (1997) Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **88**: 593–602.
- Storer M, Mas A, Robert-Moreno A, Pecoraro M, Ortells MC, Di Giacomo V, Yosef R, Pilpel N, Krizhanovsky V, Sharpe J, Keyes WM (2013) Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell* **155**: 1119–1130.
- Toso A, Revandkar A, Di Mitri D, Guccini I, Proietti M, Sarti M, Pinton S, Zhang J, Kalathur M, Civenni G, Jarrossay D, Montani E, Marini C, Garcia-Escudero R, Scanziani E, Grassi F, Pandolfi PP, Catapano CV, Alimonti A (2014) Enhancing chemotherapy efficacy in Pten-deficient prostate tumors by activating the senescence-associated antitumor immunity. *Cell Rep* **9**: 75–89.
- van Deursen JM (2014) The role of senescent cells in ageing. *Nature* **509**: 439–446.
- Velarde MC, Demaria M, Campisi J (2013) Senescent cells and their secretory phenotype as targets for cancer therapy. *Interdiscip Top Gerontol* **38**: 17–27.
- Velarde MC, Demaria M, Melov S, Campisi J (2015) Pleiotropic age-dependent effects of mitochondrial dysfunction on epidermal stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**: 10407–10412.
- Ventura A, Kirsch DG, McLaughlin ME, Tuveson DA, Grimm J, Lintault L, Newman J, Reczek EE, Weissleder R, Jacks T (2007) Restoration of p53 function leads to tumour regression *in vivo*. *Nature* **445**: 661–665.
- Wajapeyee N, Serra RW, Zhu X, Mahalingam M, Green MR (2008) Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. *Cell* **132**: 363–374.
- Wiley CD, Velarde MC, Lecot P, Liu S, Sarnoski EA, Freund A, Shirakawa K, Lim HW, Davis SS, Ramanathan A, Gerencser AA, Verdin E, Campisi J (2016) Mitochondrial dysfunction induces senescence with a distinct secretory phenotype. *Cell Metab* **23**: 303–314.
- Xue W, Zender L, Miething C, Dickins RA, Hernando E, Krizhanovsky V, Cordon-Cardo C, Lowe SW (2007) Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* **445**: 656–660.



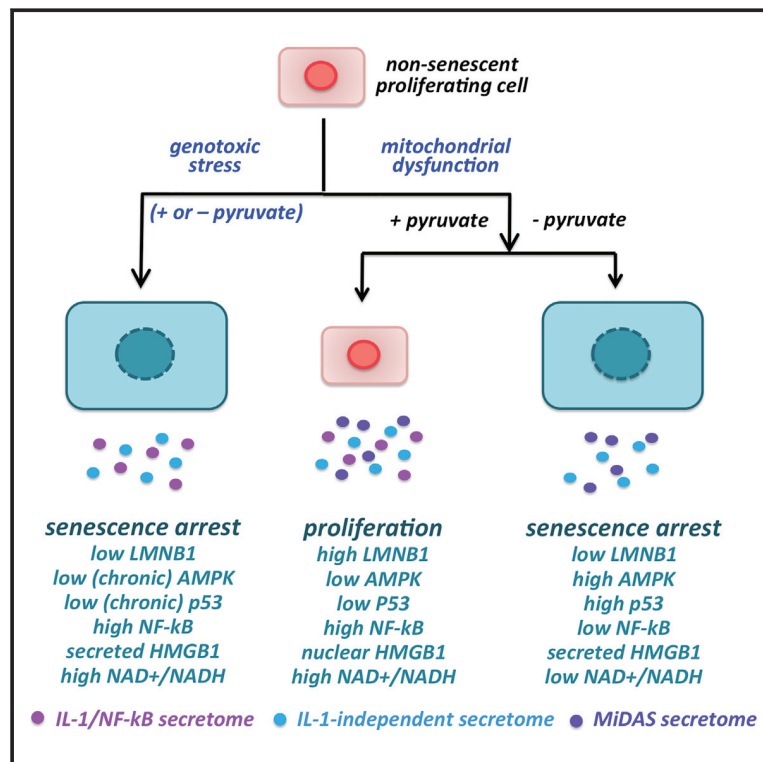
This work is licensed under the Creative Commons Attribution-Non-Commercial-Share Alike 4.0 International License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Annexe 4. Article sur le phénotype sécrétoire particulier des cellules sénescences induites par un dysfonctionnement mitochondrial.

Cell Metabolism

Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype

Graphical Abstract



Authors

Christopher D. Wiley,
 Michael C. Velarde, Pacome Lecot, ...,
 Akos A. Gerencser, Eric Verdin,
 Judith Campisi

Correspondence

jcampisi@buckinstitute.org

In Brief

Wiley et al. show that mitochondrial dysfunction induces a senescence state termed MiDAS, causing a distinct secretion profile and mitotic arrest, which can be rescued with pyruvate. MiDAS is controlled by an NAD-AMPK-p53 pathway and occurs in progeroid mice, providing a basis for how dysfunctional mitochondria drive aging phenotypes.

Highlights

- Dysfunctional mitochondria cause cell senescence and a distinct secretory phenotype
- This secretory phenotype can influence the differentiation of certain cell types
- An NAD-AMPK-p53 pathway controls the secretory and mitotic arrest phenotypes
- Mice with dysfunctional mitochondria and premature aging accumulate senescent cells



Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype

Christopher D. Wiley,¹ Michael C. Velarde,¹ Pacome Lecot,¹ Su Liu,¹ Ethan A. Sarnoski,^{1,2} Adam Freund,¹ Kotaro Shirakawa,³ Hyung W. Lim,³ Sonnet S. Davis,¹ Arvind Ramanathan,¹ Akos A. Gerencser,¹ Eric Verdin,³ and Judith Campisi^{1,4,*}

¹Buck Institute for Research on Aging, 8001 Redwood Boulevard, Novato, CA 94945, USA

²SENS Research Foundation, 110 Pioneer Way, Mountain View, CA 94041, USA

³Gladstone Institutes, University of California San Francisco, 1650 Owens Street, San Francisco, CA 94158, USA

⁴Lawrence Berkeley National Laboratory, 1 Cyclotron Rd., Berkeley, CA 94720, USA

*Correspondence: jcampisi@buckinstitute.org

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2015.11.011>

SUMMARY

Cellular senescence permanently arrests cell proliferation, often accompanied by a multi-faceted senescence-associated secretory phenotype (SASP). Loss of mitochondrial function can drive age-related declines in the function of many post-mitotic tissues, but little is known about how mitochondrial dysfunction affects mitotic tissues. We show here that several manipulations that compromise mitochondrial function in proliferating human cells induce a senescence growth arrest with a modified SASP that lacks the IL-1-dependent inflammatory arm. Cells that underwent mitochondrial dysfunction-associated senescence (MiDAS) had lower NAD⁺/NADH ratios, which caused both the growth arrest and prevented the IL-1-associated SASP through AMPK-mediated p53 activation. Progeroid mice that rapidly accrue mtDNA mutations accumulated senescent cells with a MiDAS SASP in vivo, which suppressed adipogenesis and stimulated keratinocyte differentiation in cell culture. Our data identify a distinct senescence response and provide a mechanism by which mitochondrial dysfunction can drive aging phenotypes.

INTRODUCTION

Age is the largest risk factor for myriad pathologies, ranging from neurodegeneration to cancer. These pathologies likely arise from a loss of tissue homeostasis driven by one or more basic aging process, together with stochastic, genetic, and environmental factors (Vijg and Campisi, 2008). Mitochondria are potential drivers of aging phenotypes. Dysfunctional mitochondria accumulate with age, best documented in tissues comprised largely of post-mitotic cells (e.g., muscle cells and neurons) (Herbst et al., 2007; Lee et al., 2010; Safdar et al., 2010; Wallace, 2010). Less is known about how dysfunctional mitochondria drive aging in mitotically active tissues, despite evidence from murine models that these tissues experience age-related degen-

eration when mitochondria are compromised (Kang et al., 2013; Kujoth et al., 2005; Trifunovic et al., 2004).

One consequence of mitochondrial dysfunction is cellular senescence, a complex stress response by which proliferative cells permanently lose the ability to divide (Braig and Schmitt, 2006; Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007). The senescence response suppresses the development of cancer (Campisi, 2003; Campisi, 2013), but there is mounting evidence that senescent cells can accumulate with age and cause or contribute to aging phenotypes and pathologies. The permanent growth arrest can deplete progenitor or stem cell pools, thereby compromising tissue repair and regeneration (Kuilman et al., 2010; Sousa-Victor et al., 2014; Velarde et al., 2015). Further, senescent cells secrete molecules with potent paracrine effects (Coppé et al., 2006, 2008). This senescence-associated secretory phenotype (SASP) comprises pro-inflammatory cytokines, proteases, and growth and angiogenesis factors (Coppé et al., 2008) that can disrupt tissue microenvironments and compromise tissue structure and function.

Dysfunctional mitochondria can induce cellular senescence in culture (Moiseeva et al., 2009; Wang et al., 2003) and in vivo (Dai et al., 2010; Kang et al., 2013). However, little is known about the mechanisms that mediate this effect. Some studies implicate mitochondrial reactive oxygen species (ROS) as causal (Jiang et al., 2013b; Moiseeva et al., 2009; Passos et al., 2010; Velarde et al., 2012), but other outcomes of mitochondrial dysfunction are also likely. For example, sustained activation of 5' AMP-activated protein kinase (AMPK), a major bioenergetic sensor, is a hallmark of senescence (Moiseeva et al., 2009) and can induce a senescence arrest (Jiang et al., 2013b; Jones et al., 2005; Wang et al., 2003). Unlike the growth arrest and markers such as senescence-associated β -galactosidase (SA- β gal) (Dimri et al., 1995), little is known about how mitochondria affect the SASP.

Because mitochondria oxidize NADH to NAD⁺ (Lehninger et al., 2013), mitochondrial dysfunction can decrease the NAD⁺/NADH ratio. While mitochondria oxidize NADH generated by the tricarboxylic acid (TCA) cycle or fatty acid oxidation, they also oxidize the cytosolic NAD⁺/NADH pool through the α -glycerophosphate and malate-aspartate shuttles (Houtkooper et al., 2010). Inhibition of the latter by depletion of malate dehydrogenase lowers the NAD⁺/NADH ratio and induces a senescence arrest (Lee et al., 2012), suggesting that elevated cytoplasmic



NADH can drive cells into senescence. Notably, NAD⁺ declines with age in several tissues (Braidly et al., 2011; Gomes et al., 2013; Stein and Imai, 2014; Yoshino et al., 2011), linking NAD to both senescence and aging.

In a screen of sirtuins (SIRT)—protein deacetylases, desuccinylases, demalonylases, deacylases, and ADP-ribose transferases (Hirschey, 2011; Jiang et al., 2013a) that are linked to aging (Haigis and Sinclair, 2010; Merksamer et al., 2013)—for ability to regulate senescence, we identified the mitochondrial SIRT3, and to a lesser extent SIRT5, as suppressors of senescence and modulators of the SASP. Other mitochondrial perturbations induced a similar senescent phenotype, which we term mitochondrial dysfunction-associated senescence (MiDAS). We show that MiDAS results from a decreased NAD⁺/NADH ratio, activation of AMPK and subsequently the tumor suppressor p53, which then limits the IL-1 mediated arm of the SASP. Despite lacking IL-1-dependent SASP factors, the MiDAS SASP suppressed adipocyte differentiation and promoted keratinocyte differentiation. These phenotypes occurred in cultured human cells and a murine model of premature aging through mitochondrial dysfunction, thus linking mitochondrial dysfunction and aging through a subset of senescence phenotypes across species and in vivo.

RESULTS

Mitochondrial SIRT3 Suppress Senescent Phenotypes

To determine whether SIRT3 regulate senescence responses, we used lentiviruses to express shRNAs that target each of the seven human SIRT3s in IMR-90 or BJ1 human fibroblasts. Immunoblots confirmed depletion of all seven SIRT3s to different extents (Figures 1A and S1A). Surprisingly, depletion of SIRT3 or SIRT5, but not other SIRT3s, induced senescence as judged by increased SA-Bgal activity and decreased BrdU labeling 10 days later. SIRT3 showed a stronger response, likely because it was more efficiently depleted (Figures 1A, 1B, S1B, and S1C). Cells induced to senesce by ionizing radiation (IR) (10 Gy), a common senescence inducer (Coppé et al., 2008; Rodier et al., 2009), showed no change in SIRT3 mRNA or protein (Figure S1D), indicating that reduced SIRT3 expression does not comprise the senescence response. Nonetheless, SIRT3 depletion induced three senescence markers: reduced lamin B1 (LMNB1) levels (Freund et al., 2012), decreased nuclear localization of high mobility group protein B1 (HMGB1) (Davalos et al., 2013), and increased levels of the cell-cycle inhibitor p21^{WAF1} (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007) (Figures 1C and 1D).

To determine whether mitochondrial SIRT3 depletion induces a SASP (Coppé et al., 2008), we measured secretion of IL-6, a major SASP factor, 10 days after SIRT3 or SIRT5 depletion. Despite the induction of other senescence markers, neither SIRT3 depletion increased IL-6 secretion (Figure 1E). Further, IR, a robust IL-6 inducer in unmodified cells, also failed to induce IL-6 secretion in SIRT3-depleted (and to a lesser extent SIRT5-depleted) cells (Figures 1E and S1E). In contrast, IR induced IL-6 secretion in cells depleted of SIRT2, SIRT4, SIRT6, or SIRT7 (Figure S1E); it induced cell death after SIRT1-depletion (not shown), as reported (Cheng et al., 2003; Yuan et al., 2012). Additional shRNAs confirmed the failure to induce IL-6 secretion in the absence of SIRT3 (Figures S1F and S1G). Thus, senescence resulting from

depleted SIRT3, and to a lesser extent SIRT5, failed to include the SASP factor IL-6. Further, mitochondrial SIRT3 depletion suppressed IL-6 secretion by cells induced to senesce by IR.

SASPs result primarily from increased mRNA abundance (Coppé et al., 2008). We analyzed control and SIRT3-depleted cells, with or without IR, for IL-6 and other SASP mRNAs by qPCR. SIRT3-depleted cells failed to express significant levels of the SASP mRNAs encoding IL1B, CXCL1, CXCL2, IL-6, IL-8 and VEGF, but expressed high levels of mRNAs encoding the SASP factors AREG and IL-10, regardless of IR exposure (Figure 1F). Antibody arrays, which interrogate a different but overlapping set of SASP proteins, confirmed that SIRT3-depleted cells failed to secrete IL-1 β , CXCL1, CXCL2, IL-6, IL-8, and VEGF (Figure 1G). Thus, SIRT3 depletion induced senescence but with a SASP that differed from that induced by IR, suggesting a mitochondrial function is required for expression of a subset of SASP factors. Notably, many SASP factors that were not expressed by SIRT3-depleted cells are pro-inflammatory, although the cells uniquely secreted CCL27 (Figure 1G), a pro-inflammatory cytokine that comprises the SASP of mouse, but not human, fibroblasts induced to senesce by IR (Coppé et al., 2010).

To determine whether SIRT3 depletion suppressed SASP factors in response to senescence inducers other than IR, we treated SIRT3-depleted cells with the HDAC inhibitor sodium butyrate (NaBu) or the clastogen bleomycin (Bleo), or expressed oncogenic RAS or constitutively active MKK6 (MKK6EE), all of which induce a growth arrest and IR-like SASP (Coppé et al., 2008; Freund et al., 2011; Ogryzko et al., 1996; Orjalo et al., 2009). SIRT3 depletion strongly suppressed IL-6 secretion by cells induced to senesce by IR, NaBu, or Bleo (Figure 1H) and moderately suppressed IL-6 secretion in response to MKK6EE or RAS (Figure 1I), suggesting that multiple SASP inducers require a pathway in which SIRT3 acts. Surprisingly, while SIRT3 shRNA induced senescence in wild-type (WT) mouse embryonic fibroblasts (MEFs), MEFs from SIRT3 knockout mice did not senesce (Figures S1H and S1I), indicating that an absence of SIRT3 throughout embryogenesis and acute loss of SIRT3 after development can have different effects, as reported (Fernandez-Marcos et al., 2012).

Mitochondrial Dysfunction and Senescent Phenotypes

Because SIRT3 and SIRT5 are mitochondrial proteins, the above senescence responses might be a general effect of mitochondrial dysfunction. We therefore depleted mtDNA in IMR-90 cells by passage in ethidium bromide (rho0 cells) (Figures 2A and S2A) (Nass, 1972), treated cells with the electron transport chain inhibitors rotenone (Rot) or antimycin A (Anti A) (Figure 2A) or depleted cells of the mitochondrial chaperone HSPA9, which was shown to induce senescence (Yaguchi et al., 2007) (Figure 2A). All treatments induced senescence as determined by reduced EdU incorporation, increased SA-Bgal activity (Figures 2A and S2B), and loss of nuclear HMGB1 (for rho0 and Rot; Figure 2C), but without an increase in *IL6* mRNA levels and IL-6 protein secretion, even after 10 Gy IR (Figures 2B, S2C, and S2D). We conclude that mitochondrial dysfunction causes a senescent phenotype that overlaps yet differs from that caused by other senescence inducers.

To better understand MiDAS, we cultured WT and rho0 IMR-90 cells and human mesenchymal stem cells (MSCs) with uridine

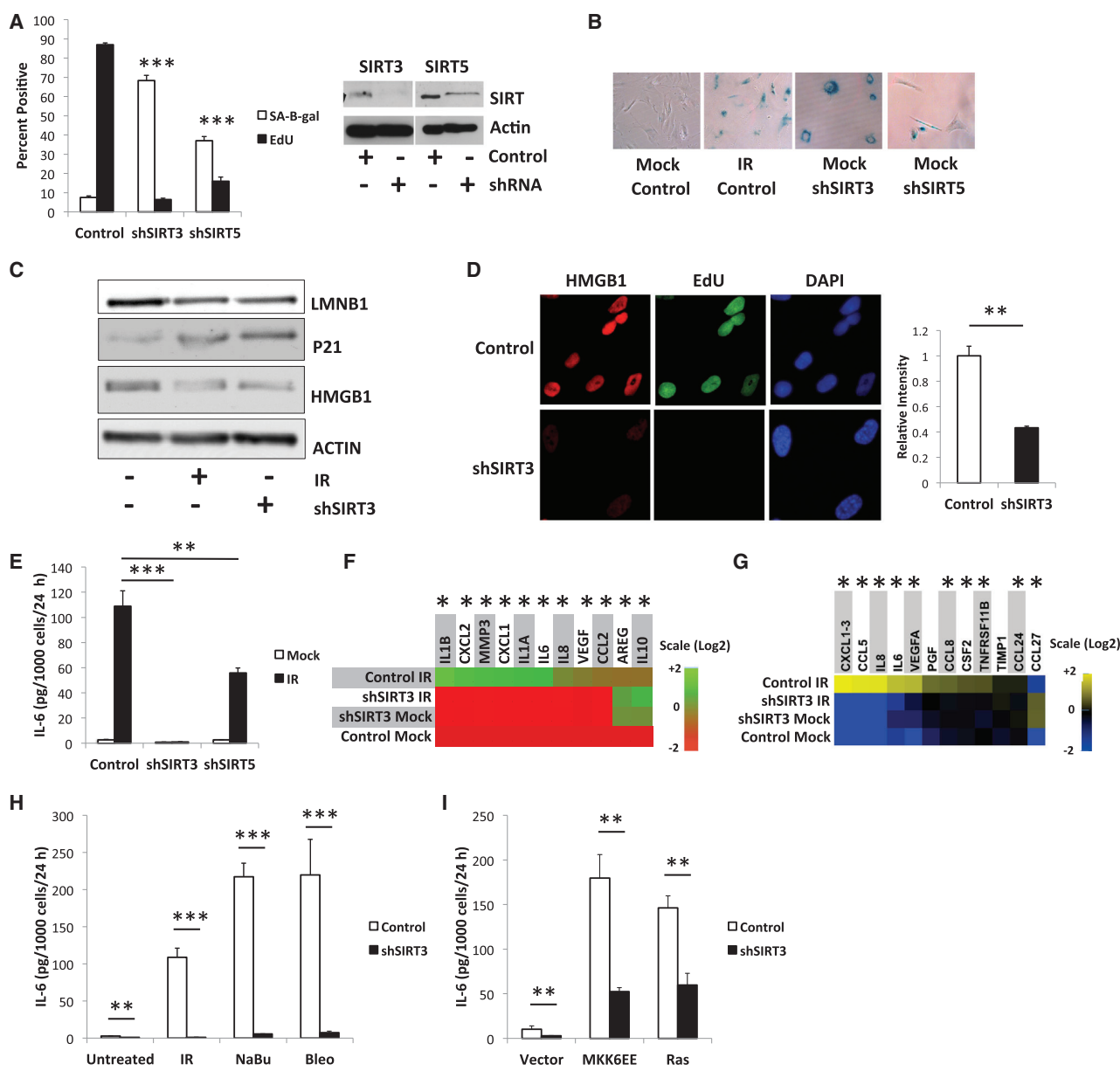


Figure 1. Loss of Mitochondrial SIRT3 Induces Senescence

(A) (Left) SA-Bgal and BrdU indices 10 days after IMR-90 cells were infected with control (scrambled sequence), shSIRT3-, or shSIRT5-expressing lentiviruses. (Right) SIRT3, SIRT5, and actin (control) protein levels after infection. (B) Representative image of cells 10 days after senescence induction by shSIRT3, shSIRT5, and/or 10 Gy IR, stained for SA-Bgal. (C) Intracellular LMNB1, p21, and HMGB1 protein levels 10 days after IR or infection with control (-) or shSIRT3 (+) lentiviruses. (D) (Left) Representative image of EdU and HMGB1 staining in control and shSIRT3-expressing cells. (Right) Quantification of nuclear HMGB1 staining intensity. (E) IL-6, measured by ELISA, in conditioned media from control, shSIRT3-, or shSIRT5-expressing cells 10 days after mock irradiation or 10 Gy IR. (F) Heatmap of the indicated mRNA levels detected by qPCR in non-senescent (mock) or senescent (IR) cells infected with control or shSIRT3 lentiviruses, normalized to mock cells. (G) Heatmap of secreted protein levels by above cells, detected by antibody array. (H and I) Secreted IL-6 levels in response to senescence inducers, normalized to control shRNA cells: IR, NaBu, Bleo, and expression of constitutively active MKK6 (MKK6EE) or oncogenic RAS. Bar graphs indicate mean + SEM.

and pyruvate, which prevents the rho0 growth arrest (Morais et al., 1994). Upon pyruvate withdrawal, rho0, but not WT, cells rapidly senesced, as measured by low EdU labeling and high SA-Bgal (Figures 2D and 2E). Pyruvate also prevented the Rot-

induced growth arrest (Figure S2E). Notably, pyruvate promoted the expression of mRNAs encoding many SASP factors, including IL-1A, IL-1B, IL-6, IL-8 and CXCL1 (Figures 2F and S2F) in unirradiated rho0 cells. Upon pyruvate withdrawal,

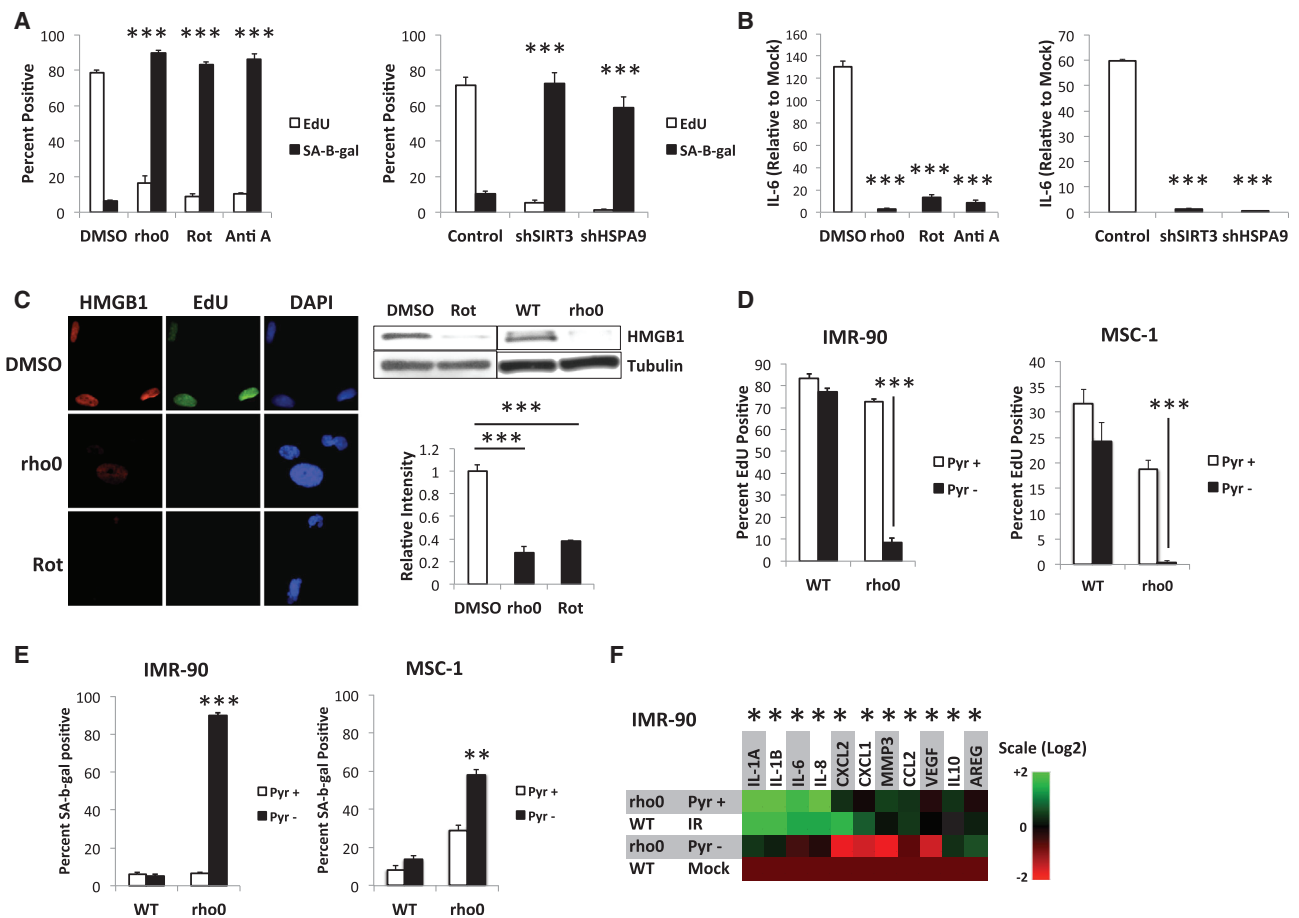


Figure 2. Mitochondrial Dysfunction-Induced Senescence

(A) (Left) IMR-90 cells were cultured in DMSO (control), ethidium bromide (rho0), rotenone (Rot), or antimycin A (Anti A) or (right) infected with control, shSIRT3-, or shHSPA9-expressing lentiviruses and analyzed for SA-Bgal and EdU 10 days later.

(B) Cells from (A) were mock irradiated or irradiated (10 Gy) and analyzed for IL-6 mRNA by qPCR.

(C) Cells cultured in control DMSO, EtBr (rho0), or rotenone (Rot) for 14 days were analyzed for EdU incorporation and nuclear HMGB1 by immunofluorescence and cellular HMGB1 by immunoblotting.

(D) Rho0 IMR-90 (left) or MSC-1 (right) were generated in the presence of pyruvate and uridine. WT and rho0 cells cultured with (Pyr+) or without (Pyr-) pyruvate for 7 days were analyzed for EdU incorporation.

(E) SA-Bgal activity in cells from (D).

(F) WT cells were mock or irradiated to senescence by IR (IR) and compared to rho0 cells cultured + or - pyruvate. Indicated mRNA levels were determined by qPCR. Bar graphs indicate mean + SEM.

expression of these factors declined to near WT levels (Figures 2F and S2F), and the cells arrested growth (Figure 2D), suggesting that MiDAS depends on a mitochondrial function for which pyruvate compensates.

ROS are thought to mediate senescence in response to mitochondrial dysfunction (Moiseeva et al., 2009). Although shSIRT3 and rho0 cells cultured without pyruvate had elevated Mitosox fluorescence (Figures S2G and S2H), normalization to Mitotracker showed roughly equivalent ROS levels between control and SIRT3-depleted cells (Figure S2G). Further, the antioxidant EUK-134 reduced mitochondrial, but not cytoplasmic, ROS in SIRT3- and HSPA9-depleted cells (Figures S2I and S2J) but did not prevent the growth arrest of these or Rot-treated cells (Figures S2K and S2L). Mitochondrial ROS is linked to senescence through nuclear DNA damage (Passos et al., 2010), but

rho0 and SIRT3-depleted cells showed no increase in 53BP1 foci (Figures S2M–S2O), a DNA damage marker, and EUK-134 had no effect on these foci in any senescent cell (Figure S2O). Thus, MiDAS phenotypes appear to be independent of ROS and DNA damage.

Decreased NAD⁺/NADH Ratios Mediate MiDAS

Pyruvate is at the nexus of glycolysis and the TCA cycle. In response to mitochondrial dysfunction or hypoxia, lactate dehydrogenase converts pyruvate to lactate, concomitantly converting cytosolic NADH to NAD⁺. NAD⁺ is required for glycolysis, whereas NADH inhibits glycolysis (Lehninger et al., 2013). We tested the idea that the NAD⁺/NADH ratio regulates MiDAS by measuring each metabolite in lysates from WT and rho0 cells cultured with or without pyruvate. The NAD⁺/NADH ratio

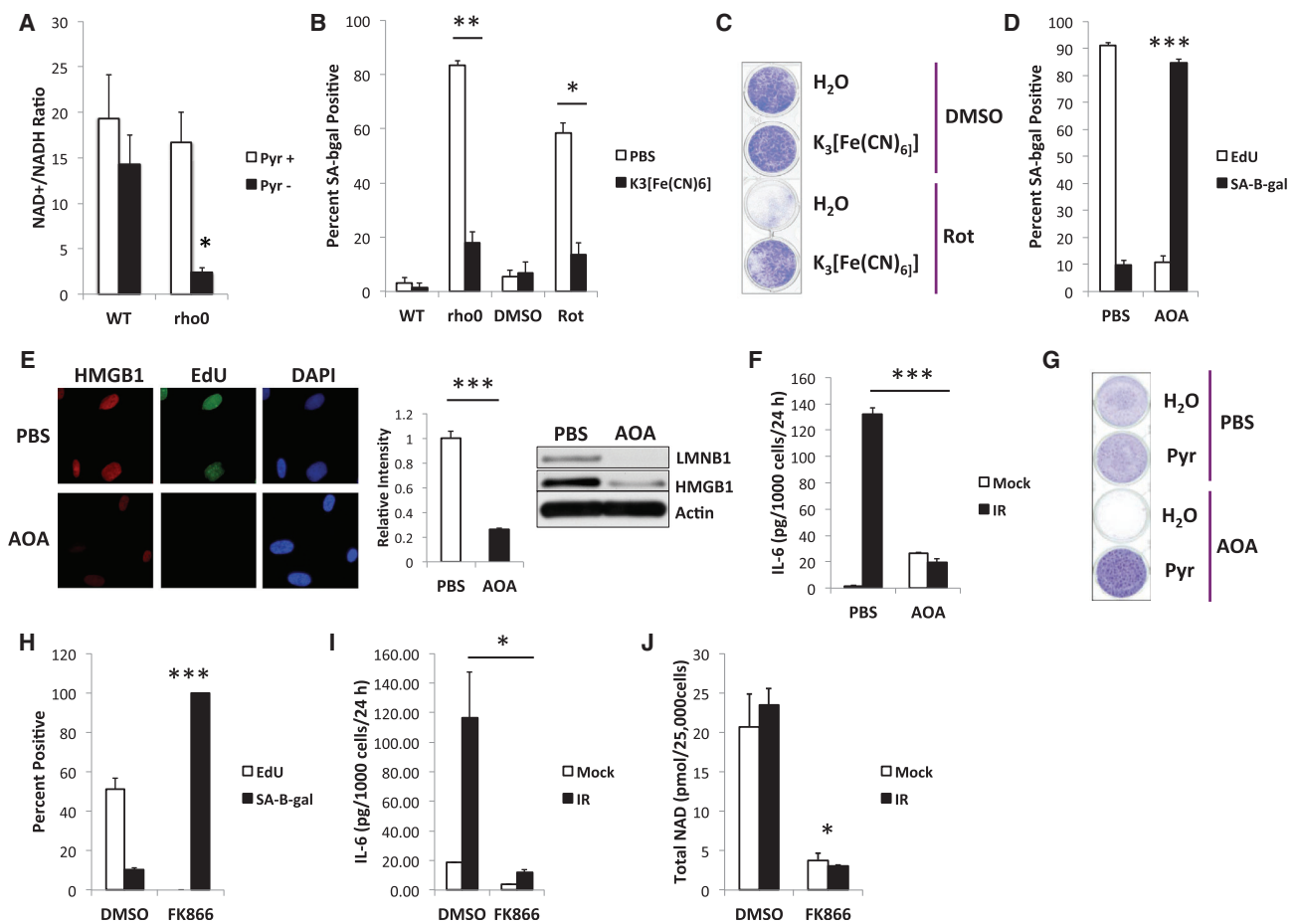


Figure 3. MiDAS Is Mediated by $NAD^+/NADH$ Ratios

(A) $NAD^+/NADH$ ratios in WT and rho0 cells cultured + or – pyruvate for 10 days. (B) Control (WT or DMSO), rho0, or rotenone-treated (Rot) cells cultured without pyruvate and + or – $K_3[Fe(CN)_6]$, analyzed for SA-Bgal. (C) Cells cultured – or + $K_3[Fe(CN)_6]$, and either DMSO or rotenone (Rot), for 8 days, were fixed and stained with crystal violet. (D–G) WT cells cultured in PBS or AOA for 10 days: (D) SA-Bgal activity and EdU labeling; (E) (left) representative image of HMGB1 staining and EdU labeling in PBS or AOA-treated cells, (middle) quantification of nuclear HMGB1 staining, (right) LMNB1 and HMGB1 protein in cells treated for 7 days with PBS or AOA; (F) IL-6 ELISAs of CM from mock or irradiated cells 10 days after IR and AOA treatment; (G) cells given PBS or AOA + or – pyruvate (Pyr) for 10 days were stained with crystal violet. (H) Cells cultured for 21 days + or – 20 nM FK866 were analyzed for SA-Bgal and EdU labeling. (I and J) Cells treated with 40 nM FK866 for 3 days following IR were analyzed for IL-6 secretion by ELISA (I) and NAD (J). Bar graphs indicate mean + SEM.

declined in rho0, Rot-treated, and SIRT3-depleted cells cultured without, but not with, pyruvate (Figures 3A, S3A, and S3B). Surprisingly, while the $NAD^+/NADH$ ratio declined with MiDAS, total NAD^+ actually increased (Figure S3C) along with a rise in nicotinamide phosphoribosyltransferase (*NAMPT*) mRNA (Figure S3D), suggesting that pyruvate acts by altering NAD redox status.

To determine whether the cytosolic or mitochondrial $NAD^+/NADH$ ratio drives MiDAS, we measured NADH in each compartment using two-photon emission spectrometry. In WT cells, lactate increased NADH levels in the cytosol but not mitochondria (Figures S3E and S3F). Conversely, pyruvate lowered NADH in the cytosol, while increasing NADH in mitochondria, and rotenone elevated NADH in both the mitochondria and cytosol. In rho0 cells, lactate elicited only a small cytosolic response, suggesting that NADH was already reduced in this compartment. Likewise, pyruvate lowered cytosolic NADH to a

much larger degree than in WT cells; it also lowered mitochondrial NADH in rho0 cells, but to a lesser extent than in the cytosol. Thus, MiDAS reduced the $NAD^+/NADH$ ratio mostly in the cytosol.

If decreased cytosolic $NAD^+/NADH$ drives MiDAS, NADH oxidation should prevent MiDAS. We treated pyruvate-free rho0 cells with potassium ferricyanide ($K_3[Fe(CN)_6]$), a cell-impermeable electron acceptor and NADH oxidase substrate that transfers reducing equivalents across the plasma membrane and allows rho0 cells to proliferate (Martinus et al., 1993). $K_3[Fe(CN)_6]$ prevented senescence, as determined by SA-Bgal and arrested growth, in both rho0 and Rot-treated cells (Figures 3B and 3C).

NADH reducing equivalents are transferred across the mitochondrial membrane by the malate-aspartate shuttle (Lehninger et al., 2013), and depletion of the shuttle component malate

dehydrogenase-1 induces a senescence arrest (Lee et al., 2012). Aminooxyacetate (AOA) inhibits the shuttle, lowering the cytosolic, but not mitochondrial, NAD⁺/NADH ratio (López-Alarcón and Eboli, 1986). AOA-treated WT cells underwent senescence (high SA-Bgal, low EdU labeling, loss of nuclear HMGB1; Figures 3D, 3E, S3G, and S3H) but failed to secrete IL-6 following IR, despite slightly higher secretion by unirradiated AOA-treated cells (Figure 3F). Importantly, pyruvate rescued the arrest of AOA-treated cells (Figures 3G and S3H).

We also artificially increased NAD⁺/NADH ratios by treating rho0 cells with the NAD⁺ precursor nicotinamide mononucleotide (NMN) without pyruvate. NMN delayed senescence by ~2 days relative to untreated cells (Figure S3I), but both groups senesced within 7 days (Figures S3I and S3J). Further, when we depleted NAD⁺ by preventing NAD salvage using the NAMPT inhibitor FK866, cell proliferation ceased after ~7 days (Figure S3K) and cells became senescent after ~21 days (low EdU labeling, high SA-Bgal) (Figures 3H and S3L). In addition, FK866 suppressed IR-induced IL-6 secretion (Figure 3I) and lowered total NAD levels (Figure 3J). We conclude that low NAD⁺/NADH ratios mediate MiDAS phenotypes, which are prevented by NADH oxidation.

Finally, SIRT3 activity requires NAD⁺ as a coenzyme, in which case loss of mitochondrial NAD⁺ and reduced SIRT3 function might account for MiDAS phenotypes. However, pyruvate withdrawal from rho0 cells decreased rather than increased acetylation at lysine 68 of SOD2—a known SIRT3 target (Figures S3M and S3N). Thus, MiDAS cells do not senesce owing to loss of SIRT3 function per se.

Low NAD⁺/NADH Ratios Drive MiDAS through AMPK

Because NAD⁺ is required for glycolysis and NADH inhibits glycolysis, the NAD⁺/NADH ratio regulates energy production. We therefore measured ADP:ATP ratios in WT, rho0, SIRT3-depleted, and Rot- or Anti-A-treated cells. All these manipulations elevated the ADP:ATP ratio (Figure 4A), which was lowered by pyruvate (Figure S4A). Similarly, rho0 cells showed elevated AMP:ATP ratios (Figure S4B), and inhibition of glycolysis by 2-deoxyglucose (2-DG) induced senescence in rho0, but not WT, cells, regardless of the presence of pyruvate (Figures 4B and S4C). 2-DG alone did not alter NAD⁺/NADH ratios (Figure S4D).

Increased ADP:ATP or AMP:ATP ratios activate AMPK (Hardie et al., 2012), which can induce senescence by phosphorylating p53 (Jones et al., 2005) or stabilizing p16^{INK4a} mRNA (Chang et al., 2010), making AMPK activation a plausible candidate for mediating MiDAS. We therefore analyzed by immunoblot cells expressing control or SIRT3 shRNAs, and WT and rho0 cells, all cultured with or without pyruvate. Pyruvate reduced AMPK α phosphorylation (activation) in all cells. However, only MiDAS cells showed marked activation of both AMPK α (thr-172 phosphorylation) and p53 (ser-15 phosphorylation), both of which were blunted by pyruvate (Figure 4C). MiDAS also increased p21^{WAF1} and p16^{INK4a} and decreased LMNB1 and intracellular HMGB1 protein levels, which were prevented by pyruvate. Similar results were obtained in cells treated with Rot or FK866 (Figures S4E and S4F). Treatment with a combination of 2-DG, pyruvate and Anti-A also activated AMPK (Figure S4G).

We also depleted AMPK using siRNAs, which prevented p53 phosphorylation and p21^{WAF1} expression in SIRT3-depleted

cells (Figure 4D). Because siRNA depletion was too transient to assess other senescence markers, we used a lentivirus to stably express a FLAG-tagged dominant-negative (kinase-dead) AMPK mutant (AMPK-DN). AMPK-DN conferred resistance to senescence induced by SIRT3 depletion, Rot, or Anti-A, as assessed by high SA-Bgal, low EdU labeling (Figures 4E and 4F), p53 phosphorylation, high p16^{INK4a} and p21^{WAF1} expression, and low intracellular HMGB1 (Figures S4H and S4I). Together, the results indicate that AMPK activation mediates MiDAS.

AMPK Mediates MiDAS through p53

Because p53 initiates the senescence arrest and is an AMPK target (Jiang et al., 2013b; Jones et al., 2005), we assessed the p53 dependence of MiDAS. We expressed control or p53 shRNAs in cells depleted of SIRT3, HSPA9, or mtDNA and analyzed them 7 days later for SA-Bgal, EdU labeling, and p21^{WAF1} levels (Figure 5A). p53 loss suppressed the induction of these senescence markers (Figures 5B, 5C, S5A, and S5B).

Because p53 also limits SASP gene expression (Coppé et al., 2008; Rodier et al., 2009), we depleted p53 in WT and rho0 cells and measured *IL1A* and *IL1B* mRNA levels. IL-1 α and IL-1 β initiate a positive feedback loop that drives expression of SASP factors such as IL-6 and IL-8 (Orjalo et al., 2009). p53 loss restored *IL1A* and *IL1B* expression to rho0 cells lacking pyruvate to levels near those of rho0 cells cultured with pyruvate (Figure 5D).

IR robustly activates p53, which subsides to a low chronic level in 7–10 days as the SASP develops (Coppé et al., 2008; Rodier et al., 2009). Although IR induced a SASP in WT cells with or without pyruvate, rho0 cells plus pyruvate expressed an enhanced SASP that was suppressed by IR (Figures 5E and S5C). Since both IR and mitochondrial dysfunction activate p53 (Figure 4C), we conclude that p53 limits the expression of selected SASP factors during MiDAS.

p53 can suppress NF- κ B (Dey et al., 2007; Murphy et al., 2011), which promotes transcription of many SASP genes (Freund et al., 2011). An NF- κ B reporter showed that NF- κ B activity was high in rho0 cells cultured with pyruvate but much lower in rho0 cells without pyruvate (Figure 5F). IR increased NF- κ B activity in WT cells, as reported (Freund et al., 2011), but failed to do so in rho0 cells without pyruvate and reduced NF- κ B activity to below that of unirradiated rho0 cells cultured with pyruvate (Figure 5F). These responses correlated with *IL1A* and *IL1B* mRNA levels (Figure 5E), suggesting that lack of the IL-1 signaling loop in MiDAS is due to suppression of NF- κ B activity. Indeed, although the RELA NF- κ B subunit increased binding to the *IL1A* promoter in rho0 cells cultured with or without pyruvate, binding of the NF- κ B coactivator CBP increased in rho0 cells with pyruvate, but not without pyruvate (Figure 5G). Since p53 inhibits RELA by competing for CBP binding (Webster and Perkins, 1999), p53 likely limits the IL1 arm of the SASP by reducing NF- κ B activity.

To further test this idea, we used shRNAs to deplete RELA from WT and rho0 cells cultured with pyruvate (Figure S5D). RELA depletion reduced several IL-1-responsive mRNAs (Figure 5H). Of interest, it also reduced mitochondrially encoded COX2 protein levels (Figure S5D), implicating RELA in retrograde signaling. Notably, some secreted factors were unaffected by MiDAS and were insensitive to pyruvate. Examples include the

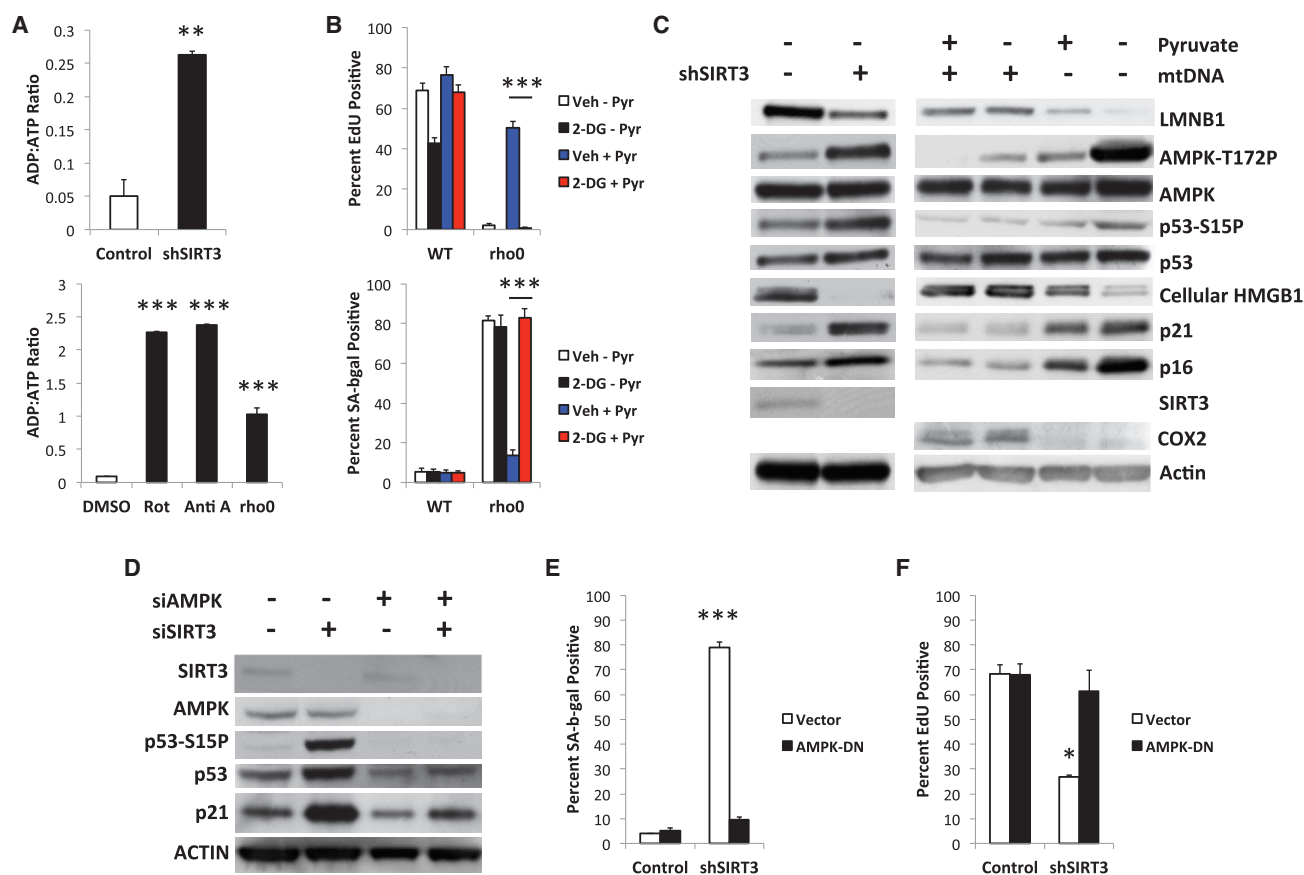


Figure 4. MiDAS Depends on AMPK Activation

(A) Cells infected with control or shSIRT3-expressing lentiviruses (upper panel), or treated with DMSO, Rot, Anti A, or ethidium bromide (EtBr) (lower panel) for 10 days were analyzed for ADP:ATP ratios.

(B) WT or rho0 cells cultured + or – pyruvate and/or 2-DG for 10 days were analyzed for EdU labeling (upper panel) or SA-Bgal (lower panel).

(C) Control or shSIRT3-expressing cells were cultured for 10 days after infection. WT (mtDNA⁺) and rho0 (mtDNA⁻) cells were cultured + or – 1 mM pyruvate for 10 days, lysed, and analyzed by immunoblotting for total and phosphorylated AMPK and p53 and intracellular LMNB1, HMGB1, p21^{WAF1}, p16^{INK4a}, SIRT3, COX2, and actin.

(D) Control (siSIRT3/AMPK⁻), SIRT3 (siSIRT3⁺), and AMPK α -1/2 (siAMPK⁺) siRNAs were transfected into cells, which were analyzed by immunoblotting 4 days later for the indicated proteins.

(E and F) Cells infected with control or dominant-negative AMPK (AMPK-DN)-expressing lentiviruses, then control or shSIRT3-expressing lentiviruses were analyzed 7 days later for (E) SA-Bgal and (F) EdU incorporation. Bar graphs indicate mean + SEM.

pro-inflammatory cytokines CCL27 (Figure 1G) and TNF- α (Figure 5I) and the anti-inflammatory cytokine IL-10 (Figure 5I).

MiDAS in POLG Mice

To determine whether MiDAS occurs in vivo, we analyzed POLG^{D257A} mice, which have a mutation in the proofreading domain of the mtDNA polymerase (PolG) and rapidly accumulate mtDNA mutations and aging phenotypes (Kujoth et al., 2005; Trifunovic et al., 2004).

Inguinal adipose tissue (IAT) from 8-month-old POLG^{D257A} mice had more cells with SA-Bgal (Figures 6A, 6C, S6A, and S6B) and loss of nuclear HMGB1 (Figures 6B and 6D) than age-matched WT IAT, primarily in cells between mature adipocytes. POLG^{D257A} IAT also expressed more p16^{INK4a} mRNA (Figure 6E) than age-matched WT IAT. Further, compared to WT, POLG^{D257A} epidermis had more senescent cells in the stratum corneum as judged by SA-Bgal positivity (Figures S6C and

S6D) and loss of HMGB1 in suprabasal epidermal nuclei (Figures S6E and S6F). Thus, senescent cells accumulated in vivo in response to mitochondrial dysfunction caused by the POLG^{D257A} mutation.

To confirm MiDAS phenotypes in vivo, we measured NAD⁺/NADH ratios in IAT from 8-month-old WT and POLG^{D257A} mice. The ratios varied among individual mice but were significantly less in POLG^{D257A} compared to WT IAT (Figure 6F). NAD⁺/NADH ratios were also lower in the colon and small intestine of POLG^{D257A} mice (Figures S6G–S6I). Further, *IL1A*, *IL1B*, and *IL6* mRNAs were unchanged, while *IL10* and *TNF* mRNAs were higher (Figure 6G), in POLG^{D257A} compared to WT IAT, indicating that the MiDAS SASP occurs in vivo in POLG^{D257A} mice.

Because MiDAS occurred in POLG^{D257A} fat and skin, which display aging phenotypes in these mice (Trifunovic et al., 2004), we asked whether the MiDAS SASP can influence adipocyte and/or keratinocyte phenotypes. Conditioned medium (CM)

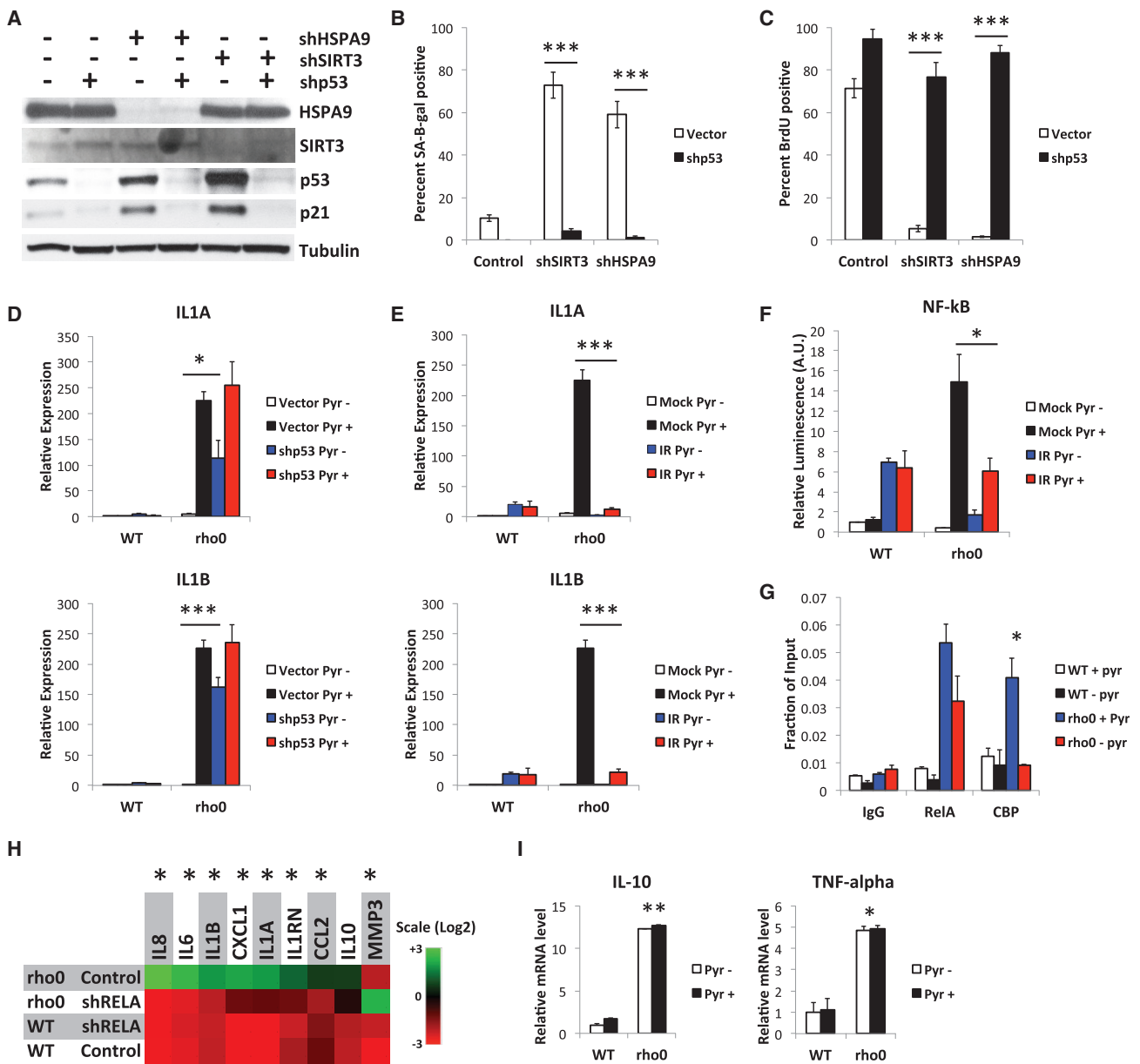


Figure 5. p53 Suppresses SASP Factors in MiDAS

(A–C) Cells were infected with lentiviruses expressing control, SIRT3 or HSPA9 shRNAs, then a p53 shRNA (shp53) or control virus, were assayed 10 days later for HSPA9, SIRT3, p53 and p21 protein (A), SA-Bgal activity (B), and BrdU incorporation (C).

(D) RNA from WT and rho0 cells, infected with shp53 or control lentiviruses and cultured + or – pyruvate for 10 days was analyzed for IL-1A (upper panel) and IL-1B (lower panel) mRNA by qPCR.

(E) RNA from WT or rho0 cells, mock- or IR-treated, and cultured + or – pyruvate for 10 days was analyzed as in (D).

(F) NF-κB reporter activity in cells cultured as in (E).

(G) ChIP assays for RelA and CBP binding at the IL1A promoter in WT and rho0 cells cultured + or – pyruvate for 7 days.

(H) WT and rho0 cells were cultured + or – pyruvate and infected with control or shRelA-expressing lentiviruses, and mRNA levels were measured by qPCR.

(I) WT and rho0 cells cultured + or – pyruvate were analyzed for IL-10 and TNF-α mRNAs by qPCR. Bar graphs indicate mean + SEM.

from rho0 fibroblasts blocked adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes, as measured by oil red O staining (Figure 6H) and levels of mRNAs encoding the adipogenic markers C/EBPβ, PPARγ, and FABP4 (Figure 6I) in a pyruvate-independent manner. Further, conditioned media from rho0 cells promoted keratinocyte differ-

entiation, as determined by staining for the differentiation markers transglutaminase (TGM1) and loricrin (LOR) (Figure S6J), loss of EdU labeling (Figure S6K) and increased levels of mRNAs encoding CD36 and DGAT2 (Figure S6L). These data support the findings that epidermal-specific SOD2-deficient

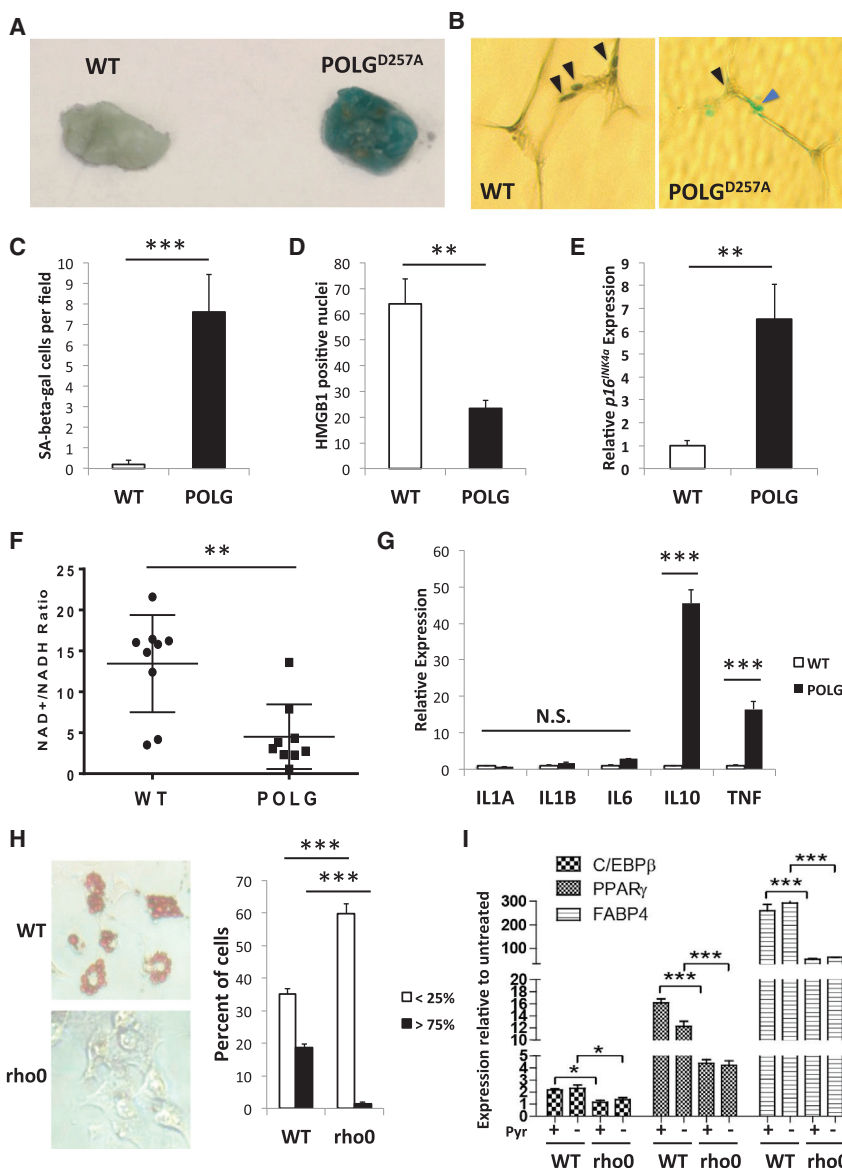


Figure 6. MiDAS in $POLG^{D257A}$ Mouse Tissues

(A) Representative image of SA-Bgal in IAT from 8-month-old WT and $POLG^{D257A}$ mice.

(B) Tissues from (A) were sectioned and immunostained for HMGB1 (representative image). Black arrows indicate nuclei; blue arrow indicates SA-Bgal.

(C and D) HMGB1-positive nuclei and SA-Bgal-positive cells were quantified in tissues from (A).

(E) qPCR analysis for $p16^{INK4a}$ mRNA in WT and $POLG^{D257A}$ tissue.

(F) $NAD^+/NADH$ ratios in IAT from WT and $POLG^{D257A}$ tissues.

(G) qPCR analysis for the indicated mRNAs in tissues from (E).

(H) 3T3-L1 cells were induced to differentiate in the presence of conditioned media from WT or rho0 IMR-90 fibroblasts. (Left panel) Representative images of cells stained with oil red O 6 days after treatment. (Right panel) quantitation of cells with <25% or >75% of cell area positive for oil red O.

(I) qPCR for markers of adipocyte differentiation in cells described in (H). Bar graphs indicate mean + SEM.

preadipocytes and keratinocytes; and (6) MiDAS occurs in a progeroid mouse that rapidly accumulates dysfunctional mitochondria. Our findings provide a basis for how dysfunctional mitochondria can drive distinct aging phenotypes.

Mitochondrial ROS can damage nuclear DNA, thus activating a DNA damage response that induces senescence (Moiseeva et al., 2009; Passos et al., 2010). In MiDAS, pyruvate, but not an antioxidant, prevented MiDAS, which showed no evidence of DNA damage. Rather, decreased $NAD^+/NADH$ ratios caused MiDAS. In addition, because pyruvate prevented the MiDAS growth arrest but restored NF- κ B activity, pyruvate un-

mice rapidly accumulate senescent keratinocytes, which show enhanced differentiation (Velarde et al., 2015) and that $POLG^{D257A}$ mice have a thicker stratum corneum and lipodystrophy compared to age-matched WT mice (Trifunovic et al., 2004).

DISCUSSION

Mitochondrial dysfunction has been linked to aging (Khrapko and Vijg, 2009), but it is not clear how it drives aging, particularly in mitotic tissues. We show that (1) mitochondrial dysfunction induces a senescence response (MiDAS), including arrested growth and a SASP that is distinct from that caused by genotoxic stress; (2) the MiDAS SASP includes IL-10, TNF- α and CCL27, but lacks the IL-1 signaling arm; (3) pyruvate rescues the growth arrest and IL-1 arm of the SASP in MiDAS cells; (4) MiDAS results from a decreased $NAD^+/NADH$ ratio, which causes AMPK and p53 activation; (5) the MiDAS SASP alters the differentiation of

coupled the growth arrest from the SASP in cells with compromised mitochondria. It is possible, however, that ROS activates NF- κ B and hence the inflammatory arm of the SASP in pyruvate-treated cells.

Our finding that loss of SIRT3 loss drives senescence appears to contradict a report in which cells from SIRT3 knockout mice were highly susceptible to oncogenic transformation; however, this susceptibility depended on the elevated ROS characteristic of $sirt3^{-/-}$ cells (Kim et al., 2010). We reported that elevated oxygen dampens the SASP in humans and mouse cells (Coppé et al., 2010; Parrinello et al., 2003). Other reports show that inducible SIRT3 knockout mice do not necessarily phenocopy germline knockout animals (Fernandez-Marcos et al., 2012), consistent with our finding that acute SIRT3 depletion induces senescence.

We show that low $NAD^+/NADH$ ratios drive MiDAS through the energy sensor AMPK. AMPK can induce senescence (Jiang

et al., 2013b; Jones et al., 2005) by phosphorylating p53 on ser-15 (Jones et al., 2005), a modification that drives cell-cycle arrest and senescence in response to genotoxic stress, and by preventing cytoplasmic translocation of the mRNA-stabilization factor HuR, thereby reducing pro-proliferation mRNAs (Wang et al., 2003) and stabilizing p16^{INK4a} mRNA (Chang et al., 2010). Because p53 depletion was sufficient to prevent MiDAS, AMPK most likely mediates MiDAS through p53 activation, and subsequent NF- κ B inhibition.

Our data from POLG^{D257A} mice indicate that MiDAS can occur in vivo, although mtDNA mutations accumulate with age at rates well below that seen in POLG^{D257A} mice (Khrapko and Vijg, 2009). However, aging also entails loss of mitochondrial function (Schriner et al., 2005), and we show many forms of mitochondrial dysfunction result in MiDAS. Further, our data from POLG^{D257A} mice indicate that the IL1-regulated arm of the SASP is not active in MiDAS in vivo, suggesting that mitochondrial dysfunction drives aging phenotypes through other SASP components. MiDAS cells secreted the anti-inflammatory cytokine IL-10, but also high levels of the pro-inflammatory cytokines CCL27 and TNF- α . In addition, they secreted HMGB1, a pro-inflammatory alarmin that is a feature of senescent cells (Davalos et al., 2013). While we have not identified all components of the MiDAS SASP, our finding that the secretions from MiDAS cells inhibit adipogenesis and promote keratinocyte differentiation suggest the MiDAS SASP can have potent paracrine effects in vivo.

In conclusion, we describe a distinct senescent phenotype associated with compromised mitochondria (MiDAS) in human cells and mice. MiDAS results from an NADH-AMPK-p53-dependent pathway and elicits a SASP that lacks IL-1-dependent factors but includes others. Our results underscore the plasticity of senescent phenotypes and explain how the age-related increase in dysfunctional mitochondria might drive aging phenotypes and pathologies.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Culture

IMR-90 human fibroblasts were mycoplasma-free, cultured in 3% O₂ as described (Coppé et al., 2008; Rodier et al., 2009), and used between 25 and 40 population doublings. To generate rho0, cells were cultured in 100 ng/ml ethidium bromide, 100 mM sodium pyruvate, and 50 μ g/ml uridine for 2 months. Cells were mock irradiated or irradiated with 10 Gy X-rays, as described in Rodier et al. (2009), or treated with 100 nM rotenone, 10 nM antimycin A, 400 μ M anisomycin (AOA), 1 mM NaBu, 2 mM 2-deoxyglucose, or 20–40 nM FK866 for 7–10 days unless noted otherwise. Cells were treated with 50 μ g/ml Bleo in 20% O₂ as described (Orjalo et al., 2009).

Animals

Protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee. POLG^{D257A} homozygotes were derived from heterozygous breeders, fed ad libitum from weaning, and aged to 8 months prior to tissue harvest.

SA-Bgal

SA-Bgal activity was detected as described (Dimiri et al., 1995) using a commercial kit (Biovision).

Immunofluorescence

Cells were cultured with BrdU (20 μ M) or EdU (10 μ M) for 24 or 72 hr, fixed in 4% buffered formalin for 10 min, washed, and permeabilized in 0.5% Triton X-100 for 30 min. For BrdU, cells were incubated with Exonuclease III and DNase I for 1 hr. For EdU, cells were treated as instructed by the manufacturer

(Life Technologies Cat #C10337). For HMGB1, cells were processed as described (Davalos et al., 2013).

Immunohistochemistry

Tissues were fixed and stained for SA-Bgal as described above, followed by a second fixation in 10% buffered formalin, embedding in paraffin, and sectioning (5–7 μ M). Sections were incubated overnight with HMGB1 antibody, and histochemistry was performed using the Vectastain Elite ABC KIT (Vector Labs) as instructed by the manufacturer.

NAD⁺/NADH Ratios

Cells were made quiescent by incubating in 0.2% serum for 3 days. NAD and NADH were measured using a commercial kit (Biovision) and 5 \times 10⁵ cells homogenized in 500 μ l lysis buffer. For tissue, 20 mg were homogenized in 400 μ l lysis buffer and clarified at 14,000 \times g for 5 min at 4°C. Supernatants were fractionated using 10 kDa cutoff filters (Millipore) and spun at 10,000 \times g for 45 min. To measure NADH, NAD⁺ was decomposed by incubation at 65°C for 30 min. Standard curves (5–200 pg/ml) were generated for quantification.

ADP/ATP Ratios

Cells (5 \times 10⁴) in 12-well plates were treated as described in the text. One well/treatment was analyzed for protein content by BCA assay. ADP/ATP ratios were measured using a kit (Biovision) as instructed by the manufacturer, and normalized to protein content.

Immunoblots

Cells were lysed in 5% SDS in 10 mM Tris, pH 7.4, and protein content determined by BCA assay. 40 μ g protein was separated by electrophoresis and transferred to PVDF membranes. Membranes were blocked in TBST + 5% BSA, incubated overnight with primary antibody, washed in TBST, incubated with HRP-conjugated secondary antibody for 30 min, and visualized by chemiluminescence. Antibodies are listed in Supplemental Experimental Procedures.

PCR

RNA was isolated from cells using a kit (QIAGEN), and from IAT using Qiazol, as instructed by the manufacturer. RNA (250 ng/ μ l) was used to synthesize cDNA, which was analyzed by qPCR using the universal probe library (Roche). mRNA levels were normalized to averages of actin and tubulin, unless noted otherwise. Primer sequences and probes are listed in Supplemental Experimental Procedures.

Secreted Factors

3 \times 10⁴ cells in 12-well plates were treated as indicated in the text, and cultured in 0.5–1 ml serum-free DMEM for 24 hr. CM were collected and clarified at 2,000 \times g for 10 min. Supernatants were transferred to a tube; cells were trypsinized and counted. CM (100 or 2.5 μ l) were analyzed by colorimetric (R&D) or bead-based ELISAs (AlphaLISA, Perkin-Elmer) as instructed by the manufacturer and normalized to cell number. For antibody arrays, 2 \times 10⁵ cells in 6-well plates were cultured in 0.5–1 ml of serum-free DMEM for 24 hr. CM were collected and cells counted. CM were diluted, applied to the arrays (RayBio), and analyzed as described (Coppé et al., 2008; Freund et al., 2011).

siRNAs

Control, SIRT3, and AMPK α 1/2 siRNAs (Santa Cruz) were packaged in Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies), and transfections were performed in Opti-MEM with replenishment each day for 3 days. Scrambled sequences served as controls.

Lentiviruses

SIRT3 (TRCN 000038892), HSPA9 (TRCN0000029450, TRCN0000029452), and scrambled shRNAs (in pLKO.1) were from Sigma (Cat # SHC002). p53 shRNA was described (Rodier et al., 2009). The AMPK-DN (D157A) (Zhou et al., 2009) cDNA was cloned into the Dral and XbaI sites of lentiviral vector 670-1 and packaged as described (Campeau et al., 2009).

Statistical Analysis

Data are presented either as representative examples or means of 3+ experiments. Data are represented as means + SEM. p values were obtained using

unpaired two-tailed Student's t test or two-way ANOVA. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes six figures and Supplemental Experimental Procedures and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2015.11.011>.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

C.D.W. and K.S. designed and executed the SIRT screen with guidance from J.C. and E.V. H.W.L. created SIRT shRNAs. C.D.W. and A.F. performed and analyzed antibody arrays. M.C.V., E.A.S., and C.D.W. designed and executed ROT, Anti A, and $K_3[Fe(CN)_6]$ experiments. M.C.V., S.L., and C.D.W. performed differentiation assays. C.D.W. and A.A.G. designed and executed ROS and NADH experiments. S.S.D. and A.R. measured AMP, ADP, and ATP. C.D.W. and P.L. conducted 2-DG and NMN experiments. C.D.W. designed and performed other experiments. C.D.W., M.C.V., and J.C. wrote the paper.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Pierre-Yves Desprez for critically reading the manuscript, Simon Melov for $POLG^{D257A}$ mice and breeding protocols, and Zhijun Luo for the AMPK-DN construct. This work was funded by NIH grants T32-AG00266 (J.C. for C.D.W.), R37-AG009909 (J.C.), K99-AG041221 (M.C.V.), fellowships from the American Federation of Aging Research (C.D.W.), SENS Research Foundation (E.A.S.), and Explo'Ra, PULSE and CROUS from France (P.L.). A.A.G. has a financial interest in Image Analyst Software. The other authors declare no conflicts of interest.

Received: April 30, 2015

Revised: September 28, 2015

Accepted: November 11, 2015

Published: December 10, 2015

REFERENCES

- Braidly, N., Guillemin, G.J., Mansour, H., Chan-Ling, T., Poljak, A., and Grant, R. (2011). Age related changes in NAD⁺ metabolism oxidative stress and Sirt1 activity in wistar rats. *PLoS ONE* 6, e19194.
- Braig, M., and Schmitt, C.A. (2006). Oncogene-induced senescence: putting the brakes on tumor development. *Cancer Res.* 66, 2881–2884.
- Campeau, E., Ruhl, V.E., Rodier, F., Smith, C.L., Rahmberg, B.L., Fuss, J.O., Campisi, J., Yaswen, P., Cooper, P.K., and Kaufman, P.D. (2009). A versatile viral system for expression and depletion of proteins in mammalian cells. *PLoS ONE* 4, e6529.
- Campisi, J. (2003). Cancer and ageing: rival demons? *Nat. Rev. Cancer* 3, 339–349.
- Campisi, J. (2013). Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu. Rev. Physiol.* 75, 685–705.
- Campisi, J., and d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 729–740.
- Chang, N., Yi, J., Guo, G., Liu, X., Shang, Y., Tong, T., Cui, Q., Zhan, M., Gorospe, M., and Wang, W. (2010). HuR uses AUF1 as a cofactor to promote p16INK4 mRNA decay. *Mol. Cell. Biol.* 30, 3875–3886.
- Cheng, H.L., Mostoslavsky, R., Saito, S., Manis, J.P., Gu, Y., Patel, P., Bronson, R., Appella, E., Alt, F.W., and Chua, K.F. (2003). Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 10794–10799.
- Coppé, J.P., Kauser, K., Campisi, J., and Beauséjour, C.M. (2006). Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J. Biol. Chem.* 281, 29568–29574.
- Coppé, J.P., Patil, C.K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D.P., Goldstein, J., Nelson, P.S., Desprez, P.Y., and Campisi, J. (2008). Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol.* 6, 2853–2868.
- Coppé, J.P., Patil, C.K., Rodier, F., Krtolica, A., Beauséjour, C.M., Parrinello, S., Hodgson, J.G., Chin, K., Desprez, P.Y., and Campisi, J. (2010). A human-like senescence-associated secretory phenotype is conserved in mouse cells dependent on physiological oxygen. *PLoS ONE* 5, e9188.
- Dai, D.F., Chen, T., Wanagat, J., Laflamme, M., Marcinek, D.J., Emond, M.J., Ngo, C.P., Prolla, T.A., and Rabinovitch, P.S. (2010). Age-dependent cardiomyopathy in mitochondrial mutator mice is attenuated by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Aging Cell* 9, 536–544.
- Davalos, A.R., Kawahara, M., Malhotra, G.K., Schaum, N., Huang, J., Ved, U., Beausejour, C.M., Coppe, J.P., Rodier, F., and Campisi, J. (2013). p53-dependent release of Alarmin HMGB1 is a central mediator of senescent phenotypes. *J. Cell Biol.* 201, 613–629.
- Dey, A., Wong, E.T., Bist, P., Tergaonkar, V., and Lane, D.P. (2007). Nutlin-3 inhibits the NFkappaB pathway in a p53-dependent manner: implications in lung cancer therapy. *Cell Cycle* 6, 2178–2185.
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., et al. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 9363–9367.
- Fernandez-Marcos, P.J., Jenning, E.H., Canto, C., Harach, T., de Boer, V.C., Andreux, P., Moullan, N., Pirinen, E., Yamamoto, H., Houten, S.M., et al. (2012). Muscle or liver-specific Sirt3 deficiency induces hyperacetylation of mitochondrial proteins without affecting global metabolic homeostasis. *Sci. Rep.* 2, 425.
- Freund, A., Patil, C.K., and Campisi, J. (2011). p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *EMBO J.* 30, 1536–1548.
- Freund, A., Laberge, R.M., Demaria, M., and Campisi, J. (2012). Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Mol. Biol. Cell* 23, 2066–2075.
- Gomes, A.P., Price, N.L., Ling, A.J., Moslehi, J.J., Montgomery, M.K., Rajman, L., White, J.P., Teodoro, J.S., Wrann, C.D., Hubbard, B.P., et al. (2013). Declining NAD(+) induces a pseudohypoxic state disrupting nuclear-mitochondrial communication during aging. *Cell* 155, 1624–1638.
- Haigis, M.C., and Sinclair, D.A. (2010). Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu. Rev. Pathol.* 5, 253–295.
- Hardie, D.G., Ross, F.A., and Hawley, S.A. (2012). AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 251–262.
- Herbst, A., Pak, J.W., McKenzie, D., Bua, E., Bassiouni, M., and Aiken, J.M. (2007). Accumulation of mitochondrial DNA deletion mutations in aged muscle fibers: evidence for a causal role in muscle fiber loss. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 62, 235–245.
- Hirschey, M.D. (2011). Old enzymes, new tricks: sirtuins are NAD(+)-dependent de-acetylases. *Cell Metab.* 14, 718–719.
- Houtkooper, R.H., Cantó, C., Wanders, R.J., and Auwerx, J. (2010). The secret life of NAD⁺: an old metabolite controlling new metabolic signaling pathways. *Endocr. Rev.* 31, 194–223.
- Jiang, H., Khan, S., Wang, Y., Charron, G., He, B., Sebastian, C., Du, J., Kim, R., Ge, E., Mostoslavsky, R., et al. (2013a). SIRT6 regulates TNF- α secretion through hydrolysis of long-chain fatty acyl lysine. *Nature* 496, 110–113.
- Jiang, P., Du, W., Mancuso, A., Wellen, K.E., and Yang, X. (2013b). Reciprocal regulation of p53 and malic enzymes modulates metabolism and senescence. *Nature* 493, 689–693.
- Jones, R.G., Plas, D.R., Kubek, S., Buzzai, M., Mu, J., Xu, Y., Birnbaum, M.J., and Thompson, C.B. (2005). AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol. Cell* 18, 283–293.
- Kang, S., Louboutin, J.P., Datta, P., Landel, C.P., Martinez, D., Zervos, A.S., Strayer, D.S., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E.S. (2013). Loss of HtrA2/Omi activity in non-neuronal tissues of adult mice causes premature aging. *Cell Death Differ.* 20, 259–269.
- Khrapko, K., and Vijg, J. (2009). Mitochondrial DNA mutations and aging: devils in the details? *Trends Genet.* 25, 91–98.

- Kim, H.S., Patel, K., Muldoon-Jacobs, K., Bisht, K.S., Aykin-Burns, N., Pennington, J.D., van der Meer, R., Nguyen, P., Savage, J., Owens, K.M., et al. (2010). SIRT3 is a mitochondria-localized tumor suppressor required for maintenance of mitochondrial integrity and metabolism during stress. *Cancer Cell* *17*, 41–52.
- Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2010). The essence of senescence. *Genes Dev.* *24*, 2463–2479.
- Kujoth, G.C., Hiona, A., Pugh, T.D., Someya, S., Panzer, K., Wohlgemuth, S.E., Hofer, T., Seo, A.Y., Sullivan, R., Jobling, W.A., et al. (2005). Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* *309*, 481–484.
- Lee, H.Y., Choi, C.S., Birkenfeld, A.L., Alves, T.C., Jornayvaz, F.R., Jurczak, M.J., Zhang, D., Woo, D.K., Shadel, G.S., Ladiges, W., et al. (2010). Targeted expression of catalase to mitochondria prevents age-associated reductions in mitochondrial function and insulin resistance. *Cell Metab.* *12*, 668–674.
- Lee, S.M., Dho, S.H., Ju, S.K., Maeng, J.S., Kim, J.Y., and Kwon, K.S. (2012). Cytosolic malate dehydrogenase regulates senescence in human fibroblasts. *Biogerontology* *13*, 525–536.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., and Cox, M.M. (2013). *Lehninger principles of biochemistry* (New York: W.H. Freeman).
- López-Alarcón, L., and Eboli, M.L. (1986). Oxidation of reduced cytosolic nicotinamide adenine dinucleotide by the malate-aspartate shuttle in the K-562 human leukemia cell line. *Cancer Res.* *46*, 5589–5591.
- Martinus, R.D., Linnane, A.W., and Nagley, P. (1993). Growth of rho 0 human Namalwa cells lacking oxidative phosphorylation can be sustained by redox compounds potassium ferricyanide or coenzyme Q10 putatively acting through the plasma membrane oxidase. *Biochem. Mol. Biol. Int.* *31*, 997–1005.
- Merksamer, P.I., Liu, Y., He, W., Hirschey, M.D., Chen, D., and Verdin, E. (2013). The sirtuins, oxidative stress and aging: an emerging link. *Aging (Albany, N.Y.)* *5*, 144–150.
- Moiseeva, O., Bourdeau, V., Roux, A., Deschênes-Simard, X., and Ferbeyre, G. (2009). Mitochondrial dysfunction contributes to oncogene-induced senescence. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 4495–4507.
- Morais, R., Zinkewich-Péotti, K., Parent, M., Wang, H., Babai, F., and Zollinger, M. (1994). Tumor-forming ability in athymic nude mice of human cell lines devoid of mitochondrial DNA. *Cancer Res.* *54*, 3889–3896.
- Murphy, S.H., Suzuki, K., Downes, M., Welch, G.L., De Jesus, P., Miraglia, L.J., Orth, A.P., Chanda, S.K., Evans, R.M., and Verma, I.M. (2011). Tumor suppressor protein (p)53, is a regulator of NF-kappaB repression by the glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *108*, 17117–17122.
- Nass, M.M. (1972). Differential effects of ethidium bromide on mitochondrial and nuclear DNA synthesis in vivo in cultured mammalian cells. *Exp. Cell Res.* *72*, 211–222.
- Ogryzko, V.V., Hirai, T.H., Russanova, V.R., Barbie, D.A., and Howard, B.H. (1996). Human fibroblast commitment to a senescence-like state in response to histone deacetylase inhibitors is cell cycle dependent. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 5210–5218.
- Orjalo, A.V., Bhaumik, D., Gengler, B.K., Scott, G.K., and Campisi, J. (2009). Cell surface-bound IL-1 α is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *106*, 17031–17036.
- Parrinello, S., Samper, E., Krtolica, A., Goldstein, J., Melov, S., and Campisi, J. (2003). Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat. Cell Biol.* *5*, 741–747.
- Passos, J.F., Nelson, G., Wang, C., Richter, T., Simillion, C., Proctor, C.J., Miwa, S., Olijslagers, S., Hallinan, J., Wipat, A., et al. (2010). Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Mol. Syst. Biol.* *6*, 347.
- Rodier, F., Coppé, J.P., Patil, C.K., Hoeijmakers, W.A., Muñoz, D.P., Raza, S.R., Freund, A., Campeau, E., Davalos, A.R., and Campisi, J. (2009). Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat. Cell Biol.* *11*, 973–979.
- Safdar, A., Hamadeh, M.J., Kaczor, J.J., Raha, S., Debeer, J., and Tarnopolsky, M.A. (2010). Aberrant mitochondrial homeostasis in the skeletal muscle of sedentary older adults. *PLoS ONE* *5*, e10778.
- Schriner, S.E., Linford, N.J., Martin, G.M., Treuting, P., Ogburn, C.E., Emond, M., Coskun, P.E., Ladiges, W., Wolf, N., Van Remmen, H., et al. (2005). Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science* *308*, 1909–1911.
- Sousa-Victor, P., Gutarra, S., García-Prat, L., Rodríguez-Ubrea, J., Ortet, L., Ruiz-Bonilla, V., Jardí, M., Ballestar, E., González, S., Serrano, A.L., et al. (2014). Geriatric muscle stem cells switch reversible quiescence into senescence. *Nature* *506*, 316–321.
- Stein, L.R., and Imai, S. (2014). Specific ablation of Namp1 in adult neural stem cells recapitulates their functional defects during aging. *EMBO J.* *33*, 1321–1340.
- Trifunovic, A., Wredenberg, A., Falkenberg, M., Spelbrink, J.N., Rovio, A.T., Bruder, C.E., Bohlooly-Y, M., Gidlöf, S., Oldfors, A., Wibom, R., et al. (2004). Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* *429*, 417–423.
- Velarde, M.C., Flynn, J.M., Day, N.U., Melov, S., and Campisi, J. (2012). Mitochondrial oxidative stress caused by Sod2 deficiency promotes cellular senescence and aging phenotypes in the skin. *Aging (Albany, N.Y.)* *4*, 3–12.
- Velarde, M.C., Demaria, M., Melov, S., and Campisi, J. (2015). Pleiotropic age-dependent effects of mitochondrial dysfunction on epidermal stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *112*, 10407–10412.
- Vijg, J., and Campisi, J. (2008). Puzzles, promises and a cure for ageing. *Nature* *454*, 1065–1071.
- Wallace, D.C. (2010). Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *Environ. Mol. Mutagen.* *51*, 440–450.
- Wang, W., Yang, X., López de Silanes, I., Carling, D., and Gorospe, M. (2003). Increased AMP:ATP ratio and AMP-activated protein kinase activity during cellular senescence linked to reduced HuR function. *J. Biol. Chem.* *278*, 27016–27023.
- Webster, G.A., and Perkins, N.D. (1999). Transcriptional cross talk between NF-kappaB and p53. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 3485–3495.
- Yaguchi, T., Aida, S., Kaul, S.C., and Wadhwa, R. (2007). Involvement of mortalin in cellular senescence from the perspective of its mitochondrial import, chaperone, and oxidative stress management functions. *Ann. N Y Acad. Sci.* *1100*, 306–311.
- Yoshino, J., Mills, K.F., Yoon, M.J., and Imai, S. (2011). Nicotinamide mononucleotide, a key NAD(+) intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice. *Cell Metab.* *14*, 528–536.
- Yuan, J., Luo, K., Liu, T., and Lou, Z. (2012). Regulation of SIRT1 activity by genotoxic stress. *Genes Dev.* *26*, 791–796.
- Zhou, J., Huang, W., Tao, R., Ibaragi, S., Lan, F., Ido, Y., Wu, X., Alekseyev, Y.O., Lenburg, M.E., Hu, G.F., and Luo, Z. (2009). Inactivation of AMPK alters gene expression and promotes growth of prostate cancer cells. *Oncogene* *28*, 1993–2002.

Cell Metabolism, Volume 23

Supplemental Information

Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence

with a Distinct Secretory Phenotype

Christopher D. Wiley, Michael C. Velarde, Pacome Lecot, Su Liu, Ethan A. Sarnoski, Adam Freund, Kotaro Shirakawa, Hyung W. Lim, Sonnet S. Davis, Arvind Ramanathan, Akos A. Gerencser, Eric Verdin, and Judith Campisi

Figure S1

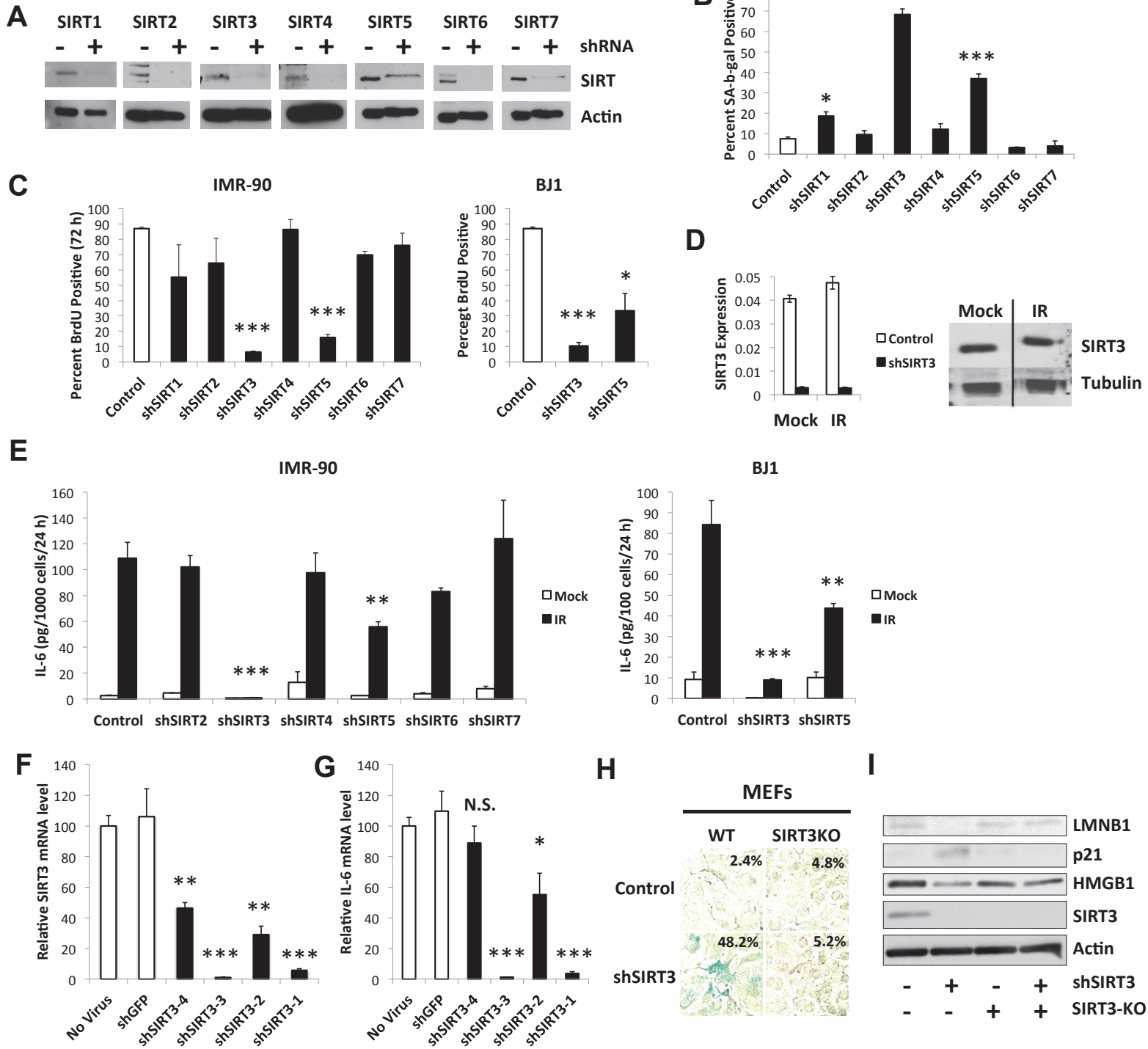


Figure S2

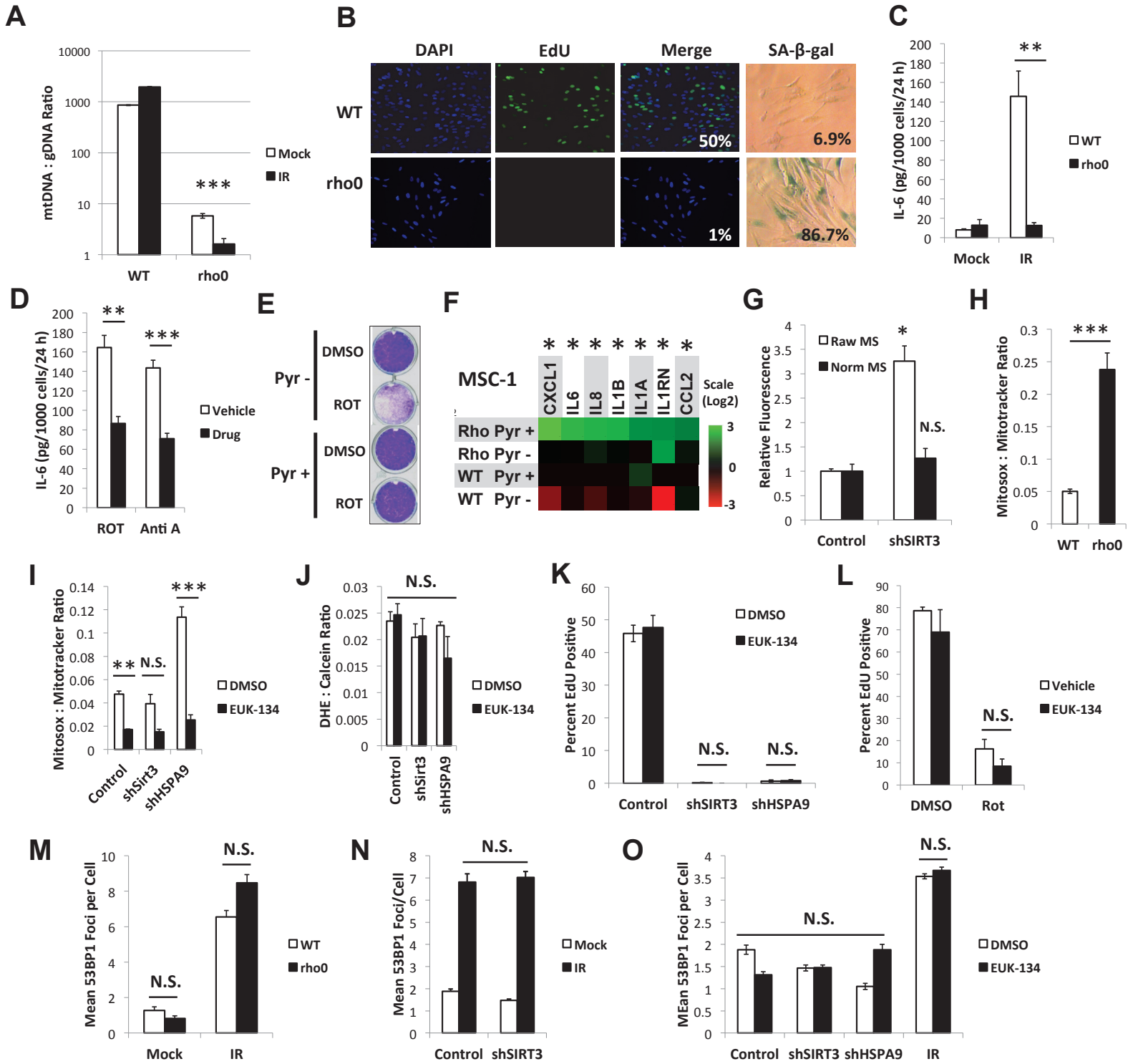


Figure S3

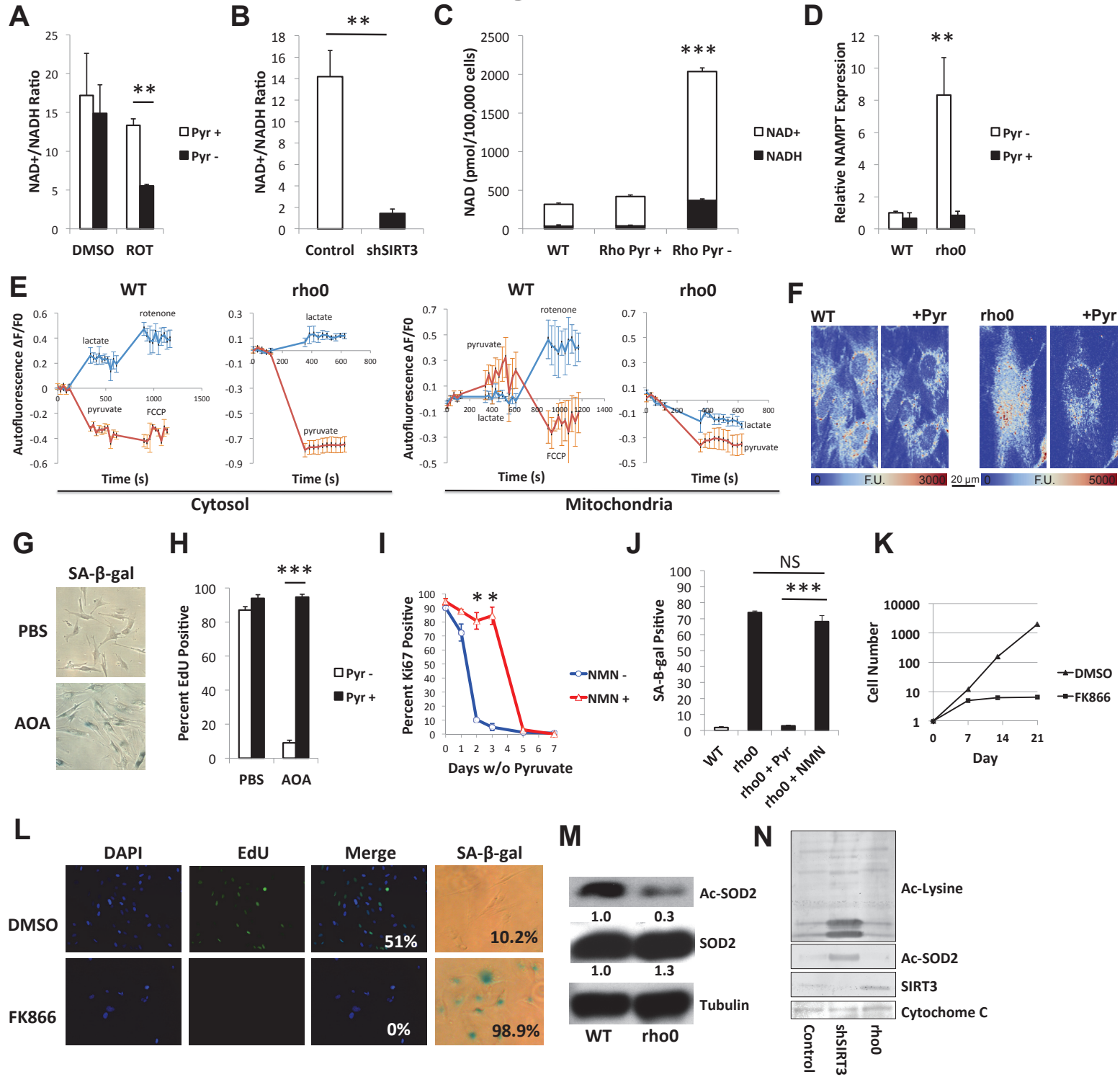


Figure S4

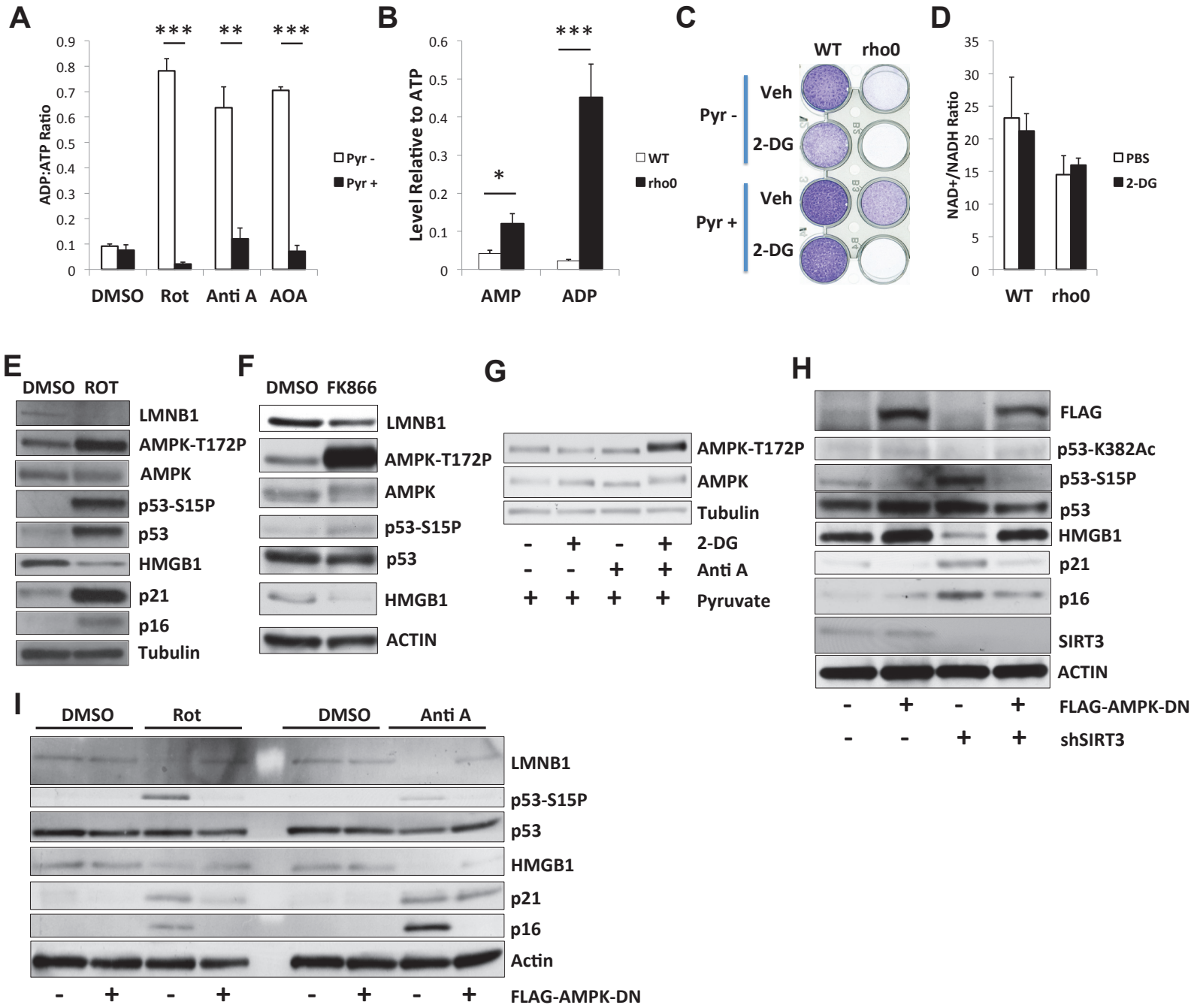


Figure S5

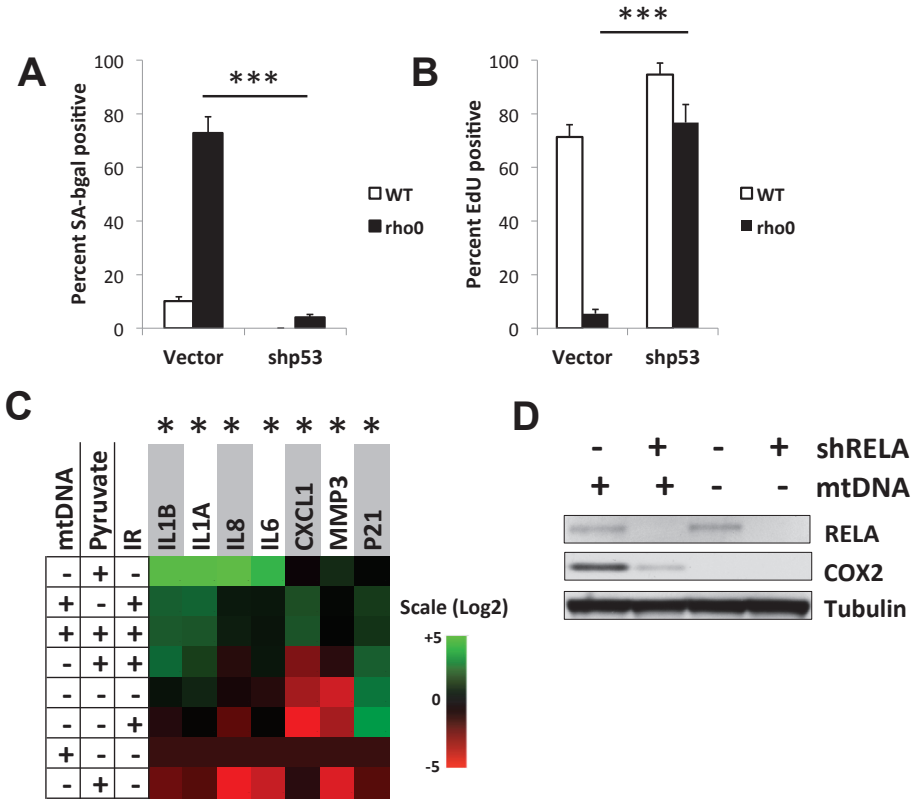
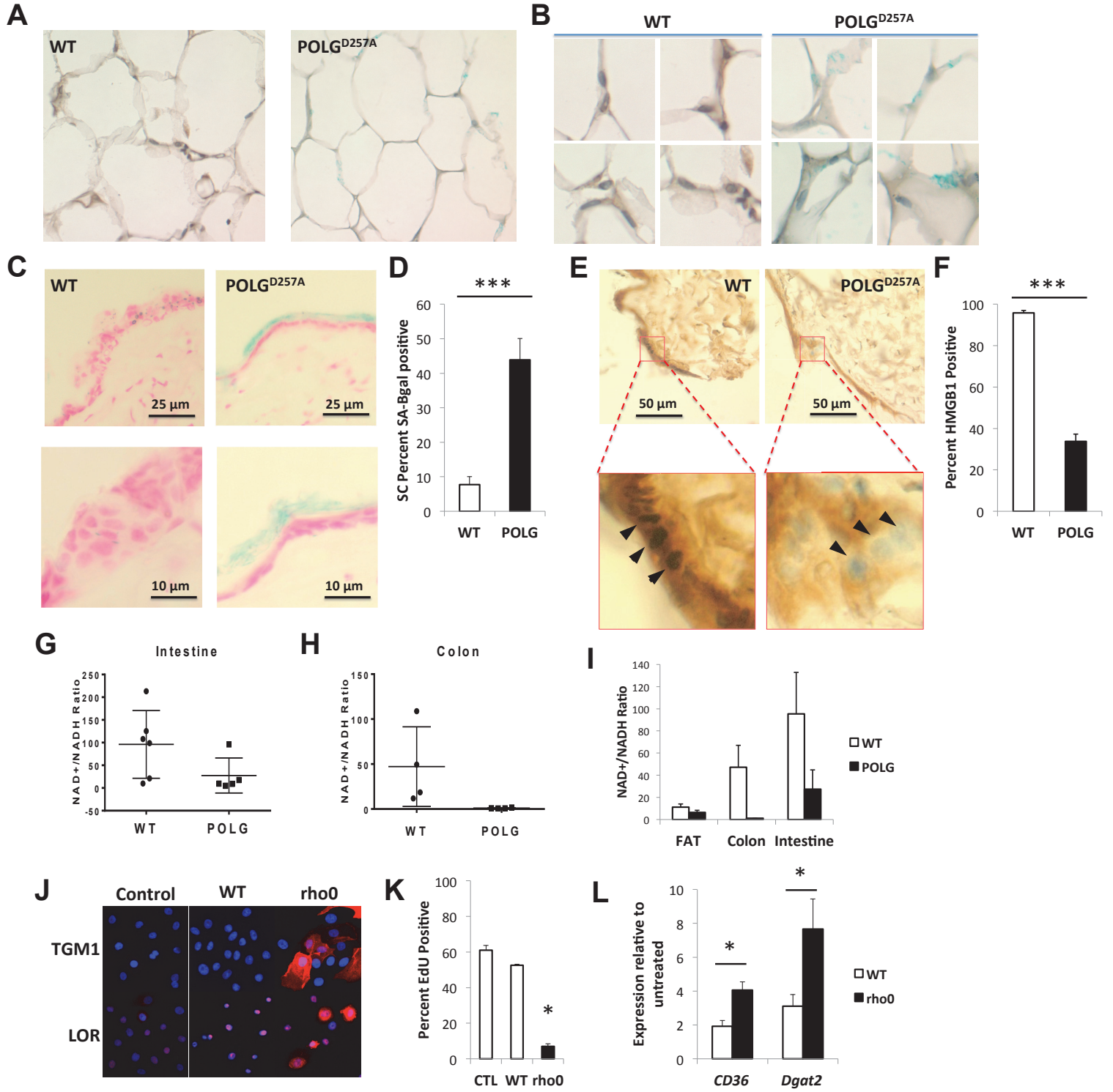


Figure S6



Supplemental Figure Legends, Extended Experimental Procedures and

Supplemental References

Supplemental Figure Legends

Figure S1, related to Figure 1. A sirtuin (SIRT) shRNA screen identifies SIRT3 and SIRT5 as mediators of senescence phenotypes.

(A) IMR-90 human fibroblasts were incubated for 10 d following infection with control or SIRT shRNA-expressing lentiviruses and analyzed by immunoblotting for the relevant SIRT proteins. (B-C) SIRT-depleted cells (IMR-90 or BJ1 human fibroblasts) were analyzed for SA-B-gal activity (B) and BrdU labeling (C). (D) Cells were mock irradiated (Mock) or induced to senesce by 10 Gy ionizing radiation (IR) and analyzed for SIRT3 mRNA by qPCR and protein levels by immunoblotting. (E) Conditioned media were harvested from cells in (B) and (C) and analyzed for IL-6 by ELISA. F-G) Lentiviruses expressing different SIRT3 shRNAs were used to deplete cells of SIRT3. Cells were analyzed for SIRT3 mRNA relative to tubulin mRNA by qPCR (F). Cells were irradiated and 10 d later analyzed by qPCR for IL-6 mRNA (G). (H-I) WT or SIRT3 knockout (SIRT3-KO) MEFs were infected with control or SIRT3 lentiviral shRNAs, and analyzed 10 d later for SA-B-gal activity (H) and LMNB1, p21, HMGB1, SIRT3 and actin proteins by immunoblotting (I). Bar graphs indicate mean + SEM.

Figure S2, related to Figure 2. Mitochondrial dysfunction induces senescence.

(A) IMR-90 cells were depleted of mtDNA by passage in ethidium bromide (EtBr; rho0 cells), then mock irradiated or given 10 Gy IR, followed by a 10 d recovery.

Mitochondrial:genomic DNA (mtDNA:gDNA) ratios were measured by qPCR. (B)

Representative image of EdU incorporation and SA-Bgal activity for control (WT) and

rho0 cells. (C) Cells were passaged + or - EtBr for 1 mo, followed by 10 Gy IR.

Conditioned media were analyzed 10 d later for IL-6 by ELISA. (D) Irradiated cells were cultured in DMSO, rotenone (ROT) or antimycin A (Anti A) for 7 d following IR.

Conditioned media were analyzed for IL-6 by ELISA. (E) Cells were cultured in rotenone (ROT) or DMSO, + or - pyruvate for 8 d. Cell growth was assessed by crystal violet staining. (F) Mesenchymal stem cells (MSC-1) were depleted of mtDNA by ethidium bromide, cultured + or - pyruvate, and analyzed by qPCR. (G-I) Mitosox/Mitotracker ratios were calculated in cells treated as described: (G) Control and shSIRT3-expressing cells 10 d after 0 or 10 Gy IR; (H) WT and rho0 cells; (I) Cells expressing control, SIRT3 or HSPA9 shRNAs, cultured with EUK-134 or DMSO for 10 d. (J) Cells from (I) were assessed for cytoplasmic ROS by dihydroethidium (DHE) fluorescence, normalized to calcein fluorescence. (K) EdU labeling in cells treated in (I). (L) Cells given DMSO or rotenone plus either vehicle or EUK-134, assessed for EdU incorporation. (M) 53BP1 foci, visualized by immunofluorescence and counted. WT or rho0 cells were irradiated with 0 or 10 Gy IR, then cultured in pyruvate-free media for 10 d. (N) 53BP1 foci counted in cells expressing control or SIRT3 shRNAs, then irradiated with 0 or 10 Gy IR and analyzed 10 d later. (O) 53BP1 foci counted for control, shSIRT3, shHSPA9 or IR-treated cells cultured with DMSO or EUK-134. Bar graphs indicate mean + SEM.

Figure S3, related to Figure 3. NAD metabolism during MiDAS. (A) NAD⁺/NADH ratios in IMR-90 cells 7 d after treatment with DMSO or rotenone (ROT). (B) NAD⁺/NADH ratios 10 d after infection with control or shSIRT3 expressing lentiviruses. (C) Total NAD⁺ or NADH in WT, rho0 + pyruvate, or rho0 – pyruvate cells cultured for 10 d. (D) WT or rho0 cells cultured + or – pyruvate for 10 d; NAMPT gene expression was analyzed by qPCR. (E-F) NAD(P)H autofluorescence time courses in WT and rho0 (2 d and 10 d) cells by two-photon microscopy in nuclei (solid lines, indicative of cytosolic NAD⁺/NADH) and mitochondria (dashed lines) using high pass image filtering. Baselines

were recorded with glucose (25 mM) as the only nutrient in the medium, then lactate (10 mM), pyruvate (10mM), rotenone (2 μ M) and FCCP (4 μ M) were added to selectively modulate the NADH pool (n=3-5 time courses per condition). (F) NAD(P)H autofluorescence by two-photon microscopy in WT and rho0 (2 d) cells. Baselines (left) were recorded with glucose (25 mM) as the only nutrient, then pyruvate (10 mM) was added (right). Cropped view field; representative of 3-5 recordings. (G) SA-B-gal staining 10 d after PBS or AOA treatment. (H) Cells treated with PBS or AOA + or - pyruvate for 10 d and assayed for EdU incorporation. (I) Rho0 cells cultured - pyruvate with (red) or without (blue) nicotinamide mononucleotide (NMN), and analyzed for Ki67 over 7 d. (J) WT and rho0 cells were cultured + pyruvate, NMN or neither for 7 d and analyzed for SA-B-gal. (K-L) Cells cultured + or - DMSO or 20 nM FK866, followed by passage, counting and reseeded at 1000 cells/cm² every 7 d. Final counts and senescence assays were performed at 21 d, (K) growth curves of DMSO and FK866 treated cells, (L) representative images of EdU and SA-Bgal assays. (M) WT or rho0 cells cultured - pyruvate for 10 d before immunoblotting for acetylated and total SOD2 and tubulin. (N) Mitochondrial extracts from control, shSIRT3 or rho0 cells were analyzed by immunoblotting for acetylated-lysine, acetylated SOD2, SIRT3 and cytochrome C. Bar graphs indicate mean + SEM.

Figure S4, related to Figure 4. MiDAS is AMPK-dependent. (A) Cells cultured with rotenone, antimycin A or AOA + or - pyruvate, assessed for ADP:ATP ratios by luminescence. (B) WT and rho0 cells were cultured - pyruvate for 10 d; nucleic acids were extracted and measured by LC-MS. (C) WT and rho0 cells were cultured in + or - pyruvate and/or 2-DG for 14 d and analyzed by crystal violet staining. (D) NAD⁺/NADH ratios from cells in Figure 4B. (E) IMR-90 cells were treated with rotenone for 7 d, followed by lysis and immunoblotting for LMNB1, phospho-AMPK (P-AMPK), AMPK,

p53-S15P, p53, HMGB1, p21, p16INK4A and tubulin. (F) Cells treated with FK866 or DMSO for 7 d were lysed and probed for P-AMPK, p53-S15P, p53, LMNB1, HMGB1 and actin. (G) Cells cultured with 2-DG and/or antimycin A (Anti A) + pyruvate for 2 d were analyzed by immunoblotting for AMPK-T172P, AMPK and tubulin. (H) Cells were infected with either an insertless control lentivirus or FLAG-tagged AMPK dominant negative (AMPK-DN) virus, followed by infection with control or shSIRT3 expressing viruses. Lysates were harvested 7 d later and assayed by immunoblotting for FLAG, LMNB1, acetylated p53 (p53-K382-Ac), p53-S15P, total p53, HMGB1, p21, p16INK4A, SIRT3, and actin. (I) Cells infected with lentiviruses carrying no insert (control) or AMPK-DN, then given DMSO, rotenone (Rot) or antimycin A (Anti A) were lysed were 7 d later and analyzed by immunoblotting for LMNB1, p53-S15P, total p53, HMGB1, p21, p16INK4A and actin. Bar graphs indicate mean + SEM.

Figure S5, related to Figure 5. MiDAS is p53-dependent. (A-B) WT and rho0 cells were infected with lentiviruses expressing either shp53 or no insert (vector), and cultured for 7 d before analysis for SA-Bgal (A) or EdU incorporation (B). (C) WT and rho0 cells were treated with IR, pyruvate or both. After 10 d, mRNA was analyzed by qPCR. (D) Immunoblot confirming knockdown of RelA and loss of COX2. Bar graphs indicate mean + SEM.

Figure S6, related to Figure 6. MiDAS phenotypes in POLG mutator mice. Mice were aged for 8 mos before tissue harvest. (A) Representative field of inguinal adipose tissue (IAT) assessed for SA-Bgal activity and HMGB1 immunostaining. (B) Representative image of SA-Bgal and nuclear HMGB1 staining in WT and POLG^{D257A} IAT. (C-F) Analysis of senescence in POLG^{D257A} skin. (C) Representative image of skin sections. SA-Bgal staining (blue) in the stratum corneum with nuclear counterstaining (red). (D) Representative image of HMGB1 immunohistochemistry (brown) with nuclear

hematoxylin counterstaining (blue). (E) Percentage of stratum corneum with positive SA-Bgal staining in WT and POLG^{D257A} mice. (F) Percentage of epidermal nuclei positive for HMGB1 in WT and POLG^{D257A} mice. (G-H) NAD⁺/NADH ratios in small intestine (G) and colon (H). (I) Mean NAD⁺/NADH ratios in fat, colon, and intestine of WT and POLG^{D257A} mice. (J-L) Human keratinocytes were cultured in conditioned media (CM) from WT or rho0 cells cultured in the absence of pyruvate for 2 d. (J) immunofluorescence staining for transglutaminase (TGM1) or loricrin (LOR); (K) EdU incorporation (24 h) in human keratinocytes cultured in control media, CM from WT cells, or CM from rho0 cells; (L) mRNA extracted from untreated keratinocytes and keratinocytes treated with WT CM or rho0 CM, analyzed by qPCR for CD36 and Dgat2. mRNA levels are shown relative to control levels. Bar graphs indicate mean + SEM.

Supplemental Experimental Procedures

Reactive oxygen species (ROS) measurement using MitoSOX. Cultures in 8-well coverglass-bottomed LabTek (Nunc) chambers were preincubated with MitoSOX Red (2 μ M) and MitoTracker Deep Red (10 nM) in standard medium and 3% O₂ for 45 h. The medium was replaced with clear imaging medium containing (mM): NaCl (120), KCl (3.5), CaCl₂ (1.3), MgCl₂ (1), KH₂PO₄ (0.4), NaHCO₃ (5), Na₂SO₄ (1.2), TES pH 7.4 (20), glucose (25), glutamine (2), 0.4% BSA, 20 μ M MnTMPyP (an SOD mimetic to stop formation of fluorescent ethidium products) and Hoechst 33342 (5 μ g/ml) to label nuclei. Cells were immediately imaged at 37° C using a Nikon Ti-Eclipse Perfect Focus System motorized microscope equipped with a 20X Super Fluor 0.75NA lens, Lambda LB-LS17 light source with 10-3 filter wheels (Sutter Instruments, Novato, CA), a Cascade 512B EMCCD camera (Photometrics, Tucson, AZ) and MS-2000 motorized stage (ASI;

Eugene, OR), controlled by NIS Elements 4.0 (Nikon, Melville, NY). Standard spectral settings (MitoSOX 543/22 nm excitation and 617/73 nm emission) were used, and a small contribution of MitoTracker Deep Red to MitoSOX emission was removed by spectral unmixing. Recordings at 5×5 tiling were analyzed using Image Analyst MKII (Image Analyst Software, Novato, CA) to calculate the MitoSOX:MitoTracker ratio, normalize MitoSOX fluorescence, to determine ROS levels independent of cell and mitochondrial density, shape and (partially) membrane potentials. The ratio was determined using an automated image processing pipeline, quantifying fluorescence in live cells identified by Hoechst and MitoTracker. Dead cells and debris oxidize MitoSOX and were masked based on round morphology and bright Hoechst 33342 fluorescence.

ROS levels using DHE. DHE:calcein end point fluorescence ratio was calculated to normalize ethidium fluorescence to cell shape and size. Experiments were performed as described for MitoSOX, but cultures were incubated with DHE (2 μ M) and calcein-AM (0.2 μ M). We used 543/22 nm excitation and 588/21 nm emission.

Cytosolic and mitochondrial NADH redox status. NAD(P)H autofluorescence was imaged using Zeiss LSM 7MP two-photon microscope equipped with a Chameleon XR laser running at 710 nm using a W Plan-Apochromat 20x 1.0NA lens and epi- and transfluorescence detectors at 420-480 nm. WT and rho0 fibroblasts ($\sim 10^5$ cells) were grown in 35 mm culture dishes - pyruvate, and imaged in medium containing in mM: 120 NaCl, 3.5 KCl, 1.3 CaCl₂, 1 MgCl₂, 0.4 KH₂PO₄, 5 NaHCO₃, 1.2 Na₂SO₄, 20 TES, 25 glucose at pH7.4 at 37° C. 1024×1024 (~ 0.2 μ m/pixel) resolution single-plane time series were recorded at 30 s intervals. To improve detection, epi and transfluorescence detector signals were summed. Cytosolic NAD(P)H autofluorescence was approximated by measuring fluorescence intensities of nuclei (mitochondrial fluorescence does not contribute) using manual region of interest (ROI) drawing. Mitochondrial NAD(P)H

autofluorescence was measured using ROIs over mitochondrion-rich areas of highpass filtered images (Gerencser and Adam-Vizi, 2001). Image analysis was performed in Image Analyst MKII (Image Analyst Software, Novato, CA), using the “Measure mitochondrial intensities with highpass filtering” pipeline with 41 and 69 pixels cut on and cut off spatial frequencies (ω), orders 7 and 16, respectively. This filter was optimized using the “High Pass, Band Pass, Long Pass Filter” by minimizing the bleedthrough of pyruvate-evoked decrease in cytosolic fluorescence. Specificity of the assay was provided by challenging cells with lactate to reduce cytosolic NAD^+ to NADH, or conversely, pyruvate to oxidize the cytosolic pool. The mitochondrial NAD^+ pool (in WT cells) was specifically reduced by the complex I inhibitor rotenone and oxidized by the uncoupler carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP).

Intracellular metabolite extraction. MiDAS (rho0) and control cells (+/- pyruvate) were rinsed with PBS and quenched with 1 ml 50% MeOH + 2 $\mu\text{g/ml}$ c13 leucine (internal standard) on ice. 2 ml chloroform was added to each sample. After mixing for 10 min at 4° C, samples were centrifuged at 4,000g for 15 min at 4° C to separate organic and aqueous fractions. 100 μl of the aqueous layer was recovered for LC-MS analysis.

LC-MS. HPLC was performed using a Shimadzu UFLC prominence system fitted with following modules: CBM-20A (communication bus module), DGU-A₃ (degasser), two LC-20AD (liquid chromatography, binary pump), SIL-20AC HT (auto sampler) connected to a Phenomenex Luna NH₂ (2.0mm x 150mm, 3.0 μM) column. The solvent system was A=20 mM ammonium acetate pH 9.5 with 5% acetonitrile, and B=acetonitrile. Starting gradient conditions were 95% B at a flow rate of 0.3 ml/min. The gradient program was: 0 to 20 min 95-10% B, 25-30 min 10% B, and 30.1-35 min 95% B. Samples were kept at 4° C, and the injection volume was 10 μl . Analysis was conducted using negative ion electrospray ionization in the multiple reaction monitoring mode (MRM) on an API 4000

QTRAP mass spectrometer fitted with a TurboV™ ion source. The ionization parameters were as follows: curtain gas (CAD): 20psi; collision gas: medium; ion spray voltage (IS): -4500V; temperature (TEM): 550°C; ion source Gas 1 (GS1): 60psi; and ion source Gas 2 (GS2): 50psi. Using appropriate standards, compound specific parameters for AMP, ADP and ATP were optimized and set (AMP: Q1(m/z) = 346.0, Q3(m/z) = 79.0, declustering potential (DP) = -50.0, collision energy (CE) = -54.0, entrance potential (EP) = -8.0, collision exit potential (CXP) = -5.0; ADP: Q1(m/z) = 426.0, Q3(m/z) = 134.0, DP = -50.0, CE = -54.0, EP = -8.0, CXP = -5.0; ATP: Q1(m/z) = 505.9, Q3(m/z) = 158.9, DP = -42.0, CE = -40.0, EP = -8.0, CXP = -5.0).

Data analysis and quantitation. AbSciex Analyst® v1.6.1 was used for all data acquisition and analysis, specifically for calculating the peak areas. Peak area was normalized for total protein. A calibration curve was used for quantification and constructed by plotting the peak area of the each standard ranging from 0.5 to 10 µM. The data was fit to a linear regression equation. A 4-point linear calibration curve showed a minimum R² value of 0.999 for each metabolite.

Keratinocyte differentiation. Human keratinocytes (AG21837) from the Coriell Cell Repository (Camden, NJ, USA) were cultured in keratinocyte growth medium (Zenbio, Research Triangle Park, NC, USA) at 20% O₂, 5% CO₂ until approximately 80% confluent. Culture media were then changed to keratinocyte differentiation media (Zenbio) plus 1.2 mM CaCl₂ for 2 or 4 d. Cells were also treated with conditioned media (150,000 cells/ml) from WT (nonsenescent) and rho0 (senescent) IMR-90 cells for 2 d, then processed for RNA extraction or immunofluorescence.

Differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. 3T3-L1 cells (American Type Culture Collection, Rockville, MD) were grown in DMEM plus 10% calf serum, 100 U/ml penicillin

and 100 mg/ml streptomycin in 3% O₂/humidified atmosphere at 37° C. 2 d post-confluent cells were stimulated to differentiate by incubation in differentiation medium (10% fetal bovine serum, 500 μM IBMX, 1 μM dexamethasone, 200 μM indomethacin, 10 μg/ml insulin) prepared in conditioned medium from WT or rho0 IMR-90 cells (150,000 cells/ml, 24 h). 6 d later, the cells were collected for mRNA extraction or processed for Oil Red staining.

Sequences for lentiviral shRNAs. For shRNA-mediated depletion, we cloned 19-mers into pSicoRMS2 as described (Shimazu et al., 2013). The sequences were as follows:

SIRT1 GAACATCACTCCTAAATTA

SIRT2 GTGTGGGCCTCTGAATATA

SIRT3 GGAGTGGCCTGTACAGCAA

SIRT4 GATTCCAGTCCCATTCAA

SIRT5 GCTGTGTCTTCATGTGAAA

SIRT6 GAAGTGGGGGATCAGTAGA

SIRT7 GAACGGAACTCGGGTTATT

p53 GACTCCAGTGGTAATCTAC.

Control sequence CAACAAGATGAAGAGCACCAA

siRNA sequences. AMPK α 1/2 was depleted by a combination of 3 siRNAs with the following sequences:

5'-GAUGUCAGAUGGUGAAUUU(dTdT)-3'

5'-CCACUGCAAUACUAAUUGA(dTdT)-3', and

5'-CUACUGGAUUUCCGUAGUA(dTdT)-3'.

SIRT3 was depleted by siRNAs with the following sequences:

5'-GCCCAACGUCACUCACUAC(dTdT)-3', and

5'-ACUCCCAUUCUUCUUCAC(dTdT)-3'.

Control siRNA (sc-37007) was from Santa Cruz.

Senescence-associated beta-galactosidase. Dorsal skin from 8 mos old WT and POLG^{D257A} mice was embedded in OCT, frozen, sliced into 10 µm sections and mounted on slides. Slides were thawed for 5 min prior to fixation and overnight staining following the manufacturer's protocol (Biovision). Slides were dehydrated by serial incubation in ethanol, followed by a xylene wash and mounted in Permount.

Antibodies for western blots. Antibodies were: phospho-p53-S15 (#9284), acetyl-p53-K392 (#2525), phospho-AMPK α -T172 (#2535) and AMPK α (#2532) from Cell Signaling Technology; lamin B1 (ab16048), HMGB1 (ab18256) and COX2 (ab91317) from Abcam; p53 (D01) (sc-126), SIRT3 (sc-49744), RELA (sc-372) and p16^{INK4a} (JC8) (sc-56330) from Santa Cruz; CDKN1A (p21) (556430) from BD Biosciences.

Primer sequences for qPCR. The primer sequences for qPCR are:

Human actin F 5'- CCAACCGCGAGAAGATGA; R 5'- TCCATCACGATGCCAGTG, UPL probe #64;

Human tubulin F 5'- CTTCGTCTCCGCCATCAG; R 5'- TTGCCAATCTGGACACCA, UPL Probe #58;

Human IL-6 F 5'- GCCCAGCTATGAACTCCTTCT; R 5'- GAAGGCAGCAGGCAACAC UPL Probe #45;

Human IL-8 F 5'- AGACAGCAGAGCACACAAGC; R 5'- ATGGTTCCTTCCGGTGGT, UPL Probe #72;

Human IL-1A F 5'- GGTTGAGTTTAAGCCAATCCA; R 5'- TGCTGACCTAGGCTTGATGA, UPL Probe #6;

Human IL-1B F 5'- CTGTCCTGCGTGTTGAAAGA; R 5'- TTGGGTAATTTTTGGGATCTACA, UPL Probe #78;

Human CXCL1 F 5'- GCTGAACAGTGACAAATCCAAC; R 5'-
CTTCAGGAACAGCCACCAGT, UPL Probe #52;

Human CXCL2 F 5'- CCCATGGTTAAGAAAATCATCG; R 5'-
CTTCAGGAACAGCCACCAAT, UPL Probe #69;

Human CCL2 F 5'-AGTCTCTGCCGCCCTTCT; R 5'-GTGACTGGGGCATTGATTG,
UPL Probe #40;

Human MMP3 F 5'- CAAAACATATTTCTTTGTAGAGGACAA; 5'-
TTCAGCTATTTGCTTGGGAAA, UPL Probe #36;

Human IL-10 F 5'- TGCCTTCAGCAGAGTGAAGA; R 5'- GCTTGGCAACCCAGGTAA,
UPL Probe #65;

Human TNF F 5'- CAGCCTCTTCTCCTTCCTGAT; R 5'-
GCCAGAGGGCTGATTAGAGA, UPL Probe #29;

Human AREG F 5'- TGATCCTCACAGCTGTTGCT; R 5'-
TCCATTCTCTTGTCGAAGTTTCT, UPL Probe #73;

Human SIRT3 F 5'- CTTGTGCAGCGGGAAACT; R 5'-
TCCTATGTTACCATTTATTGTGTGG, UPL Probe #46;

Human CD36 F 5'- CCTCCTTGGCCTGATAGAAA; R 5'-
GTTTGTGCTTGAGCCAGGT, UPL Probe #9

Human DGAT2 F 5'- GAGGGGTCTGGGAGATGG; R 5'-
TTGGACCTATTGAGCCAGGT, UPL Probe #55

Mouse actin F 5'- CTAAGGCCAACCGTGAAAAG, R 5'-
ACCAGAGGCATACAGGGACA, UPL Probe #64;

Mouse tubulin F 5'- CTGGAACCCACGGTCATC; R 5'- GTGGCCACGAGCATAGTTATT,
UPL Probe #88;

Mouse IL-6 F 5'-GCTACCAAACCTGGATATAATCAGGA; R 5'-
CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA, UPL Probe #6;

Mouse IL-1A F 5'- TTGGTTAAATGACCTGCAACA; R 5'- GAGCGCTCACGAACAGTTG,

UPL Probe #52;

Mouse IL-1B F 5'- TGTAATGAAAGACGGCACACC; R 5'-

TCTTCTTTGGGTATTGCTTGG, UPL Probe #78;

Mouse IL-10 F 5'-AGCCGGGAAGACAATAACTG; R 5'-GCAGTCCGCAGCTCTAGG,

UPL Probe #21;

Mouse TNF-alpha F 5'- TCTTCTCATTCTGCTTGTGG; R 5'-

GGTCTGGGCCATAGAACTGA, UPL Probe #49;

Mouse P16INK4A F 5'- AATCTCCGCGAGGAAAGC; R 5'- GTCTGCAGCGGACTCCAT,

UPL Probe #91;

Mouse FABP4 F 5'- GGATGGAAAGTCGACCACAA; R 5'-

TGGAAGTCACGCCTTTCATA, UPL Probe #31;

Mouse CEBPB F 5'- ATCGACTTCAGCCCCTACCT; R 5'- TAGTCGTCGGCGAAGAGG,

UPL Probe #55;

Mouse PPARG F 5'- GAAAGACAACGGACAAATCACC; R 5'-

GGGGGTGATATGTTTGA ACTTG, UPL Probe #7

Supplemental References

Gerencser, A.A., and Adam-Vizi, V. (2001). Selective, high-resolution fluorescence imaging of mitochondrial Ca²⁺ concentration. *Cell calcium* 30, 311-321.

Shimazu, T., Hirschey, M.D., Newman, J., He, W., Shirakawa, K., Le Moan, N., Grueter, C.A., Lim, H., Saunders, L.R., Stevens, R.D., *et al.* (2013). Suppression of oxidative stress by beta-hydroxybutyrate, an endogenous histone deacetylase inhibitor. *Science* 339, 211-214.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. G. P. Bodey, M. Buckley, Y. S. Sathe, E. J. Freireich, Quantitative relationships between circulating leukocytes and infection in patients with acute leukemia. *Ann. Intern. Med.* **64**, 328–340 (1966).
2. J. Donadieu, O. Fenneteau, B. Beaupain, N. Mahlaoui, C. B. Chantelot, Congenital neutropenia: diagnosis, molecular bases and patient management. *Orphanet J Rare Dis* **6**, 26 (2011).
3. K. Ley, *et al.*, Neutrophils: New insights and open questions. *Sci Immunol* **3** (2018).
4. J. Record, *et al.*, Immunodeficiency and severe susceptibility to bacterial infection associated with a loss-of-function homozygous mutation of MKL1. *Blood* **126**, 1527–1535 (2015).
5. U. Siler, *et al.*, Severe glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency leads to susceptibility to infection and absent NETosis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **139**, 212–219.e3 (2017).
6. T. Németh, A. Mócsai, The role of neutrophils in autoimmune diseases. *Immunol. Lett.* **143**, 9–19 (2012).
7. G. P. Dunn, A. T. Bruce, H. Ikeda, L. J. Old, R. D. Schreiber, Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* **3**, 991–998 (2002).
8. W. Xue, *et al.*, Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* **445**, 656–660 (2007).
9. Z. G. Fridlender, *et al.*, Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell* **16**, 183–194 (2009).
10. A. Blaisdell, *et al.*, Neutrophils Oppose Uterine Epithelial Carcinogenesis via Debridement of Hypoxic Tumor Cells. *Cancer Cell* **28**, 785–799 (2015).
11. S. Singhal, *et al.*, Origin and Role of a Subset of Tumor-Associated Neutrophils with Antigen-Presenting Cell Features in Early-Stage Human Lung Cancer. *Cancer Cell* **30**, 120–135 (2016).
12. P. Lecot, *et al.*, Neutrophil Heterogeneity in Cancer: From Biology to Therapies. *Front Immunol* **10**, 2155 (2019).
13. L. A. Pekarek, B. A. Starr, A. Y. Toledano, H. Schreiber, Inhibition of tumor growth by elimination of granulocytes. *J. Exp. Med.* **181**, 435–440 (1995).
14. S. K. Wculek, I. Malanchi, Neutrophils support lung colonization of metastasis-initiating breast cancer cells. *Nature* **528**, 413–417 (2015).
15. S. B. Coffelt, *et al.*, IL17-producing $\gamma\delta$ T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature* **522**, 345–348 (2015).
16. T.-T. Wang, *et al.*, Tumour-activated neutrophils in gastric cancer foster immune suppression and disease progression through GM-CSF-PD-L1 pathway. *Gut* **66**, 1900–1911 (2017).
17. B. M. Szczerba, *et al.*, Neutrophils escort circulating tumour cells to enable cell cycle progression. *Nature* **566**, 553–557 (2019).

18. A. J. Templeton, *et al.*, Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *J. Natl. Cancer Inst.* **106**, dju124 (2014).
19. J. Tanizaki, *et al.*, Peripheral Blood Biomarkers Associated with Clinical Outcome in Non-Small Cell Lung Cancer Patients Treated with Nivolumab. *J Thorac Oncol* **13**, 97–105 (2018).
20. K. G. Mitchell, *et al.*, Neutrophil expansion defines an immunoinhibitory peripheral and intratumoral inflammatory milieu in resected non-small cell lung cancer: a descriptive analysis of a prospectively immunoprofiled cohort. *J Immunother Cancer* **8** (2020).
21. Z. G. Fridlender, *et al.*, Transcriptomic analysis comparing tumor-associated neutrophils with granulocytic myeloid-derived suppressor cells and normal neutrophils. *PLoS ONE* **7**, e31524 (2012).
22. T. Condamine, *et al.*, Lectin-type oxidized LDL receptor-1 distinguishes population of human polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in cancer patients. *Sci Immunol* **1** (2016).
23. C. Engblom, *et al.*, Osteoblasts remotely supply lung tumors with cancer-promoting SiglecFhigh neutrophils. *Science* **358** (2017).
24. R. Zilionis, *et al.*, Single-Cell Transcriptomics of Human and Mouse Lung Cancers Reveals Conserved Myeloid Populations across Individuals and Species. *Immunity* **50**, 1317-1334.e10 (2019).
25. E. Kolaczowska, P. Kubes, Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 159–175 (2013).
26. K. Ley, C. Laudanna, M. I. Cybulsky, S. Nourshargh, Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 678–689 (2007).
27. S. Romanowski, A. Staszewski, [Gastrojejunocolonic fistula as a complication of gastrectomy]. *Wiad. Lek.* **41**, 1380–1382 (1988).
28. M. Phillipson, *et al.*, Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J. Exp. Med.* **203**, 2569–2575 (2006).
29. M. Phillipson, *et al.*, Vav1 is essential for mechanotactic crawling and migration of neutrophils out of the inflamed microvasculature. *J. Immunol.* **182**, 6870–6878 (2009).
30. A. R. Burns, *et al.*, Analysis of tight junctions during neutrophil transendothelial migration. *J. Cell. Sci.* **113** (Pt 1), 45–57 (2000).
31. A. Woodfin, *et al.*, The junctional adhesion molecule JAM-C regulates polarized transendothelial migration of neutrophils in vivo. *Nat. Immunol.* **12**, 761–769 (2011).
32. K. P. M. van Kessel, J. Bestebroer, J. A. G. van Strijp, Neutrophil-Mediated Phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. *Front. Immunol.* **5** (2014).
33. G. T. Nguyen, E. R. Green, J. Mecsas, Neutrophils to the ROScue: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance. *Front Cell Infect Microbiol* **7** (2017).

34. T. J. Evans, *et al.*, Cytokine-treated human neutrophils contain inducible nitric oxide synthase that produces nitration of ingested bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 9553–9558 (1996).
35. B. G. Yipp, *et al.*, Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nature Medicine* **18**, 1386–1393 (2012).
36. N. Branzk, *et al.*, Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat. Immunol.* **15**, 1017–1025 (2014).
37. V. Papayannopoulos, K. D. Metzler, A. Hakkim, A. Zychlinsky, Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* **191**, 677–691 (2010).
38. C. F. Urban, *et al.*, Neutrophil Extracellular Traps Contain Calprotectin, a Cytosolic Protein Complex Involved in Host Defense against *Candida albicans*. *PLOS Pathogens* **5**, e1000639 (2009).
39. R. I. Lehrer, A. K. Lichtenstein, T. Ganz, Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu. Rev. Immunol.* **11**, 105–128 (1993).
40. Y. Mori, *et al.*, Identification of the human eosinophil lineage-committed progenitor: revision of phenotypic definition of the human common myeloid progenitor. *J Exp Med* **206**, 183–193 (2009).
41. L. G. Ng, R. Ostuni, A. Hidalgo, Heterogeneity of neutrophils. *Nature Reviews Immunology* **19**, 255–265 (2019).
42. S. Kawamura, *et al.*, Identification of a Human Clonogenic Progenitor with Strict Monocyte Differentiation Potential: A Counterpart of Mouse cMoPs. *Immunity* **46**, 835–848.e4 (2017).
43. S. M. Lawrence, R. Corriden, V. Nizet, The Ontogeny of a Neutrophil: Mechanisms of Granulopoiesis and Homeostasis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **82** (2018).
44. Y. P. Zhu, *et al.*, Identification of an Early Unipotent Neutrophil Progenitor with Pro-tumoral Activity in Mouse and Human Bone Marrow. *Cell Rep* **24**, 2329–2341.e8 (2018).
45. J. Pillay, *et al.*, A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J Clin Invest* **122**, 327–336 (2012).
46. T. Tak, *et al.*, Human CD62Ldim neutrophils identified as a separate subset by proteome profiling and in vivo pulse-chase labeling. *Blood* **129**, 3476–3485 (2017).
47. J. T. Dincey, K. A. Deubelbeiss, L. A. Harker, C. A. Finch, Neutrophil kinetics in man. *J. Clin. Invest.* **58**, 705–715 (1976).
48. A. W. Roberts, G-CSF: a key regulator of neutrophil production, but that's not all! *Growth Factors* **23**, 33–41 (2005).
49. H. M. Mehta, M. Malandra, S. J. Corey, G-CSF and GM-CSF in Neutropenia. *J Immunol* **195**, 1341–1349 (2015).
50. M. A. Rieger, P. S. Hoppe, B. M. Smejkal, A. C. Eitelhuber, T. Schroeder, Hematopoietic cytokines can instruct lineage choice. *Science* **325**, 217–218 (2009).

51. M. L. McLemore, *et al.*, STAT-3 activation is required for normal G-CSF-dependent proliferation and granulocytic differentiation. *Immunity* **14**, 193–204 (2001).
52. L. Grassi, *et al.*, Dynamics of Transcription Regulation in Human Bone Marrow Myeloid Differentiation to Mature Blood Neutrophils. *Cell Rep* **24**, 2784–2794 (2018).
53. M. A. Stark, *et al.*, Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity* **22**, 285–294 (2005).
54. C. Hong, *et al.*, Coordinate regulation of neutrophil homeostasis by liver X receptors in mice. *J Clin Invest* **122**, 337–347 (2012).
55. J. Mei, *et al.*, Cxcr2 and Cxcl5 regulate the IL-17/G-CSF axis and neutrophil homeostasis in mice. *J Clin Invest* **122**, 974–986 (2012).
56. H. Pan, J. E. Shively, Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1 regulates granulopoiesis by inhibition of granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Immunity* **33**, 620–631 (2010).
57. S. Boettcher, *et al.*, Endothelial cells translate pathogen signals into G-CSF-driven emergency granulopoiesis. *Blood* **124**, 1393–1403 (2014).
58. M. G. Manz, S. Boettcher, Emergency granulopoiesis. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 302–314 (2014).
59. M. Kowanz, *et al.*, Granulocyte-colony stimulating factor promotes lung metastasis through mobilization of Ly6G+Ly6C+ granulocytes. *PNAS* **107**, 21248–21255 (2010).
60. L. Liu, Y. Liu, X. Yan, C. Zhou, X. Xiong, The role of granulocyte colony-stimulating factor in breast cancer development: A review. *Mol Med Rep* **21**, 2019–2029 (2020).
61. K. Nishimura, M. Higashino, T. Hara, T. Oka, Bladder Cancer Producing Granulocyte Colony-Stimulating Factor: A Case Report. *International Journal of Urology* **3**, 152–154 (1996).
62. T. Asano, *et al.*, [Bladder cancer producing granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF): a case report]. *Hinyokika Kyo* **48**, 495–498 (2002).
63. K. Nasu, C. Inoue, N. Takai, K. Kashima, I. Miyakawa, Squamous cell carcinoma of the cervix producing granulocyte colony-stimulating factor. *Obstet Gynecol* **104**, 1086–1088 (2004).
64. X. Wang, R. Sun, H. Wei, Z. Tian, High-mobility group box 1 (HMGB1)-Toll-like receptor (TLR)4-interleukin (IL)-23-IL-17A axis in drug-induced damage-associated lethal hepatitis: Interaction of $\gamma\delta$ T cells with macrophages. *Hepatology* **57**, 373–384 (2013).
65. B. Li, *et al.*, Tumor-derived exosomal HMGB1 promotes esophageal squamous cell carcinoma progression through inducing PD1+ TAM expansion. *Oncogenesis* **8**, 17 (2019).
66. C. H. Kim, Homeostatic and pathogenic extramedullary hematopoiesis. *J Blood Med* **1**, 13–19 (2010).
67. D. W. Barnes, J. F. Loutit, Haemopoietic stem cells in the peripheral blood. *Lancet* **2**, 1138–1141 (1967).
68. K. B. McCredie, E. M. Hersh, E. J. Freireich, Cells Capable of Colony Formation in the Peripheral Blood of Man. *Science* **171**, 293–294 (1971).

69. D. C. Dooley, P. Law, Detection and quantitation of long-term culture-initiating cells in normal human peripheral blood. *Exp. Hematol.* **20**, 156–160 (1992).
70. S. McKinney-Freeman, M. A. Goodell, Circulating hematopoietic stem cells do not efficiently home to bone marrow during homeostasis. *Exp. Hematol.* **32**, 868–876 (2004).
71. C. Udomsakdi, *et al.*, Characterization of primitive hematopoietic cells in normal human peripheral blood. *Blood* **80**, 2513–2521 (1992).
72. J. W. Goodman, G. S. Hodgson, Evidence for stem cells in the peripheral blood of mice. *Blood* **19**, 702–714 (1962).
73. A. Burberry, *et al.*, Infection mobilizes hematopoietic stem cells through cooperative NOD-like receptor and Toll-like receptor signaling. *Cell Host Microbe* **15**, 779–791 (2014).
74. V. Cortez-Retamozo, *et al.*, Origins of tumor-associated macrophages and neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 2491–2496 (2012).
75. J.-I. Youn, *et al.*, Epigenetic silencing of retinoblastoma gene regulates pathologic differentiation of myeloid cells in cancer. *Nat. Immunol.* **14**, 211–220 (2013).
76. C. Wu, *et al.*, Spleen mediates a distinct hematopoietic progenitor response supporting tumor-promoting myelopoiesis. *J. Clin. Invest.* **128**, 3425–3438 (2018).
77. E. Lefrançois, *et al.*, The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature* **544**, 105–109 (2017).
78. S. Devi, *et al.*, Neutrophil mobilization via plerixafor-mediated CXCR4 inhibition arises from lung demargination and blockade of neutrophil homing to the bone marrow. *Journal of Experimental Medicine* **210**, 2321–2336 (2013).
79. C. E. Sarraf, M. S. Mahmood, E. Aitken, Hepatic extramedullary granulopoiesis after treatment with liver-stimulatory xenobiotics, in lpr mice. *Ultrastruct Pathol* **22**, 443–448 (1998).
80. X. Xie, *et al.*, Single-cell transcriptome profiling reveals neutrophil heterogeneity and orchestrated maturation during homeostasis and bacterial infection. *bioRxiv*, 792200 (2019).
81. A. Zipursky, E. Bow, R. S. Seshadri, E. J. Brown, Leukocyte density and volume in normal subjects and in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **48**, 361–371 (1976).
82. C. Carmona-Rivera, M. J. Kaplan, Low-density granulocytes: a distinct class of neutrophils in systemic autoimmunity. *Semin Immunopathol* **35**, 455–463 (2013).
83. E. Mortaz, S. D. Alipour, I. M. Adcock, S. Mumby, L. Koenderman, Update on Neutrophil Function in Severe Inflammation. *Front Immunol* **9**, 2171 (2018).
84. F. Uhel, *et al.*, Early Expansion of Circulating Granulocytic Myeloid-derived Suppressor Cells Predicts Development of Nosocomial Infections in Patients with Sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **196**, 315–327 (2017).
85. O. Marini, *et al.*, Mature CD10⁺ and immature CD10⁻ neutrophils present in G-CSF-treated donors display opposite effects on T cells. *Blood* **129**, 1343–1356 (2017).

86. J. Fu, M. C. Tobin, L. L. Thomas, Neutrophil-like low-density granulocytes are elevated in patients with moderate to severe persistent asthma. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **113**, 635-640.e2 (2014).
87. T. Cloke, M. Munder, G. Taylor, I. Müller, P. Kropf, Characterization of a novel population of low-density granulocytes associated with disease severity in HIV-1 infection. *PLoS ONE* **7**, e48939 (2012).
88. N. Köstlin, *et al.*, Granulocytic myeloid derived suppressor cells expand in human pregnancy and modulate T-cell responses. *Eur. J. Immunol.* **44**, 2582–2591 (2014).
89. A. Ssemaganda, *et al.*, Characterization of neutrophil subsets in healthy human pregnancies. *PLoS ONE* **9**, e85696 (2014).
90. N. Köstlin, *et al.*, Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Accumulate in Human Placenta and Polarize toward a Th2 Phenotype. *J. Immunol.* **196**, 1132–1145 (2016).
91. N. Köstlin, *et al.*, Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells (GR-MDSC) in Breast Milk (BM); GR-MDSC Accumulate in Human BM and Modulate T-Cell and Monocyte Function. *Front Immunol* **9**, 1098 (2018).
92. N. Rieber, *et al.*, Neutrophilic myeloid-derived suppressor cells in cord blood modulate innate and adaptive immune responses. *Clin. Exp. Immunol.* **174**, 45–52 (2013).
93. M. A. Otten, *et al.*, Immature Neutrophils Mediate Tumor Cell Killing via IgA but Not IgG Fc Receptors. *The Journal of Immunology* **174**, 5472–5480 (2005).
94. J. Y. Sagiv, *et al.*, Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer. *Cell Rep* **10**, 562–573 (2015).
95. S. Lang, *et al.*, Clinical Relevance and Suppressiveness Capacity of Human Myeloid-Derived Suppressor Cell Subsets. *Clin. Cancer Res.* **24**, 4834–4844 (2018).
96. M. E. Shaul, *et al.*, Circulating neutrophil subsets in advanced lung cancer patients exhibit unique immune signature and relate to prognosis. *FASEB J.* **34**, 4204–4218 (2020).
97. P. C. Rodriguez, *et al.*, Arginase I-producing myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma are a subpopulation of activated granulocytes. *Cancer Res.* **69**, 1553–1560 (2009).
98. M. Faurschou, O. E. Sørensen, A. H. Johnsen, J. Askaa, N. Borregaard, Defensin-rich granules of human neutrophils: characterization of secretory properties. *Biochim. Biophys. Acta* **1591**, 29–35 (2002).
99. T. Sato, T. Hongu, M. Sakamoto, Y. Funakoshi, Y. Kanaho, Molecular mechanisms of N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced superoxide generation and degranulation in mouse neutrophils: phospholipase D is dispensable. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 136–145 (2013).
100. C. Silvestre-Roig, Z. G. Fridlender, M. Glogauer, P. Scapini, Neutrophil Diversity in Health and Disease. *Trends Immunol.* **40**, 565–583 (2019).
101. J. M. Adrover, J. A. Nicolás-Ávila, A. Hidalgo, Aging: A Temporal Dimension for Neutrophils. *Trends Immunol.* **37**, 334–345 (2016).
102. E. Kolaczkowska, The older the faster: aged neutrophils in inflammation. *Blood* **128**, 2280–2282 (2016).

103. D. Zhang, *et al.*, Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. *Nature* **525**, 528–532 (2015).
104. H. Nagase, *et al.*, Cytokine-mediated regulation of CXCR4 expression in human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* **71**, 711–717 (2002).
105. K. Tanji-Matsuba, *et al.*, Functional changes in aging polymorphonuclear leukocytes. *Circulation* **97**, 91–98 (1998).
106. V. Brinkmann, *et al.*, Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **303**, 1532–1535 (2004).
107. B. Uhl, *et al.*, Aged neutrophils contribute to the first line of defense in the acute inflammatory response. *Blood* **128**, 2327–2337 (2016).
108. C. V. Gorlino, *et al.*, Neutrophils exhibit differential requirements for homing molecules in their lymphatic and blood trafficking into draining lymph nodes. *J. Immunol.* **193**, 1966–1974 (2014).
109. J. Wang, *et al.*, Visualizing the function and fate of neutrophils in sterile injury and repair. *Science* **358**, 111–116 (2017).
110. M. Casanova-Acebes, *et al.*, Rhythmic modulation of the hematopoietic niche through neutrophil clearance. *Cell* **153**, 1025–1035 (2013).
111. U. Jerke, *et al.*, Complement receptor Mac-1 is an adaptor for NB1 (CD177)-mediated PR3-ANCA neutrophil activation. *J. Biol. Chem.* **286**, 7070–7081 (2011).
112. U. J. H. Sachs, *et al.*, The neutrophil-specific antigen CD177 is a counter-receptor for platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *J. Biol. Chem.* **282**, 23603–23612 (2007).
113. M. Bai, *et al.*, CD177 modulates human neutrophil migration through activation-mediated integrin and chemoreceptor regulation. *Blood* **130**, 2092–2100 (2017).
114. C. Ramirez-Velazquez, E. C. Castillo, L. Guido-Bayardo, V. Ortiz-Navarrete, IL-17-producing peripheral blood CD177+ neutrophils increase in allergic asthmatic subjects. *Allergy Asthma Clin Immunol* **9**, 23 (2013).
115. J. Demaret, *et al.*, Identification of CD177 as the most dysregulated parameter in a microarray study of purified neutrophils from septic shock patients. *Immunol. Lett.* **178**, 122–130 (2016).
116. A. Schreiber, A. Jannerjahn, R. Kettritz, CD177/NB1 receptor expression is dynamically regulated in sepsis patients. *Immunohematology* **31**, 128–129 (2015).
117. G. Zhou, *et al.*, CD177+ neutrophils as functionally activated neutrophils negatively regulate IBD. *Gut* **67**, 1052–1063 (2018).
118. X. Li, *et al.*, The β -glucan receptor Dectin-1 activates the integrin Mac-1 in neutrophils via Vav protein signaling to promote *Candida albicans* clearance. *Cell Host Microbe* **10**, 603–615 (2011).
119. P. H. C. Leliefeld, *et al.*, Differential antibacterial control by neutrophil subsets. *Blood Adv* **2**, 1344–1355 (2018).
120. P. Mistry, *et al.*, Transcriptomic, epigenetic, and functional analyses implicate neutrophil diversity in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **116**, 25222–25228 (2019).

121. B. C. Rocha, *et al.*, Type I Interferon Transcriptional Signature in Neutrophils and Low-Density Granulocytes Are Associated with Tissue Damage in Malaria. *Cell Rep* **13**, 2829–2841 (2015).
122. S. Martinelli, *et al.*, Induction of genes mediating interferon-dependent extracellular trap formation during neutrophil differentiation. *J. Biol. Chem.* **279**, 44123–44132 (2004).
123. N. Tamassia, *et al.*, Activation of an immunoregulatory and antiviral gene expression program in poly(I:C)-transfected human neutrophils. *J. Immunol.* **181**, 6563–6573 (2008).
124. X. Wen, *et al.*, G-protein-coupled formyl peptide receptors play a dual role in neutrophil chemotaxis and bacterial phagocytosis. *Mol. Biol. Cell* **30**, 346–356 (2019).
125. A. K. Gupta, S. Giaglis, P. Hasler, S. Hahn, Efficient neutrophil extracellular trap induction requires mobilization of both intracellular and extracellular calcium pools and is modulated by cyclosporine A. *PLoS ONE* **9**, e97088 (2014).
126. Á. Teijeira, *et al.*, CXCR1 and CXCR2 Chemokine Receptor Agonists Produced by Tumors Induce Neutrophil Extracellular Traps that Interfere with Immune Cytotoxicity. *Immunity* **52**, 856-871.e8 (2020).
127. S. A. Jones, M. Wolf, S. Qin, C. R. Mackay, M. Baggiolini, Different functions for the interleukin 8 receptors (IL-8R) of human neutrophil leukocytes: NADPH oxidase and phospholipase D are activated through IL-8R1 but not IL-8R2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 6682–6686 (1996).
128. P. Zhang, L. M. Minardi, J. T. Kuenstner, S. M. Zekan, R. Kruzelock, Anti-microbial Antibodies, Host Immunity, and Autoimmune Disease. *Front Med (Lausanne)* **5**, 153 (2018).
129. C. D. Murin, I. A. Wilson, A. B. Ward, Antibody responses to viral infections: a structural perspective across three different enveloped viruses. *Nat Microbiol* **4**, 734–747 (2019).
130. A. Casadevall, L. Pirofski, IMMUNOGLOBULINS IN DEFENSE, PATHOGENESIS AND THERAPY OF FUNGAL DISEASES. *Cell Host Microbe* **11**, 447–456 (2012).
131. R. Kimberly, J. Ahlstrom, M. Click, J. Edberg, The glycosyl phosphatidylinositol-linked FcγRIII(PMN) mediates transmembrane signaling events distinct from FcγRII. *J Exp Med* **171**, 1239–1255 (1990).
132. A. Coxon, *et al.*, Fc gamma RIII mediates neutrophil recruitment to immune complexes. a mechanism for neutrophil accumulation in immune-mediated inflammation. *Immunity* **14**, 693–704 (2001).
133. M. Kocher, M. E. Siegel, J. C. Edberg, R. P. Kimberly, Cross-linking of Fc gamma receptor IIa and Fc gamma receptor IIIb induces different proadhesive phenotypes on human neutrophils. *J. Immunol.* **159**, 3940–3948 (1997).
134. T. W. Huizinga, *et al.*, Phosphatidylinositol-linked FcRIII mediates exocytosis of neutrophil granule proteins, but does not mediate initiation of the respiratory burst. *J. Immunol.* **144**, 1432–1437 (1990).
135. P. J. Vosseveld, C. H. Homburg, D. Roos, A. J. Verhoeven, The anti-Fc gamma RIII mAb 3G8 induces neutrophil activation via a cooperative actin of Fc gamma RIIIb and Fc gamma RIIa. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **29**, 465–473 (1997).

136. K. Chen, *et al.*, Endocytosis of soluble immune complexes leads to their clearance by FcγRIIIB but induces neutrophil extracellular traps via FcγRIIA in vivo. *Blood* **120**, 4421–4431 (2012).
137. J. Golay, *et al.*, Human neutrophils express low levels of FcγRIIA, which plays a role in PMN activation. *Blood* **133**, 1395–1405 (2019).
138. X. Li, *et al.*, The unique cytoplasmic domain of human FcγRIIA regulates receptor-mediated function. *J. Immunol.* **189**, 4284–4294 (2012).
139. K. R. Patel, J. T. Roberts, A. W. Barb, Multiple Variables at the Leukocyte Cell Surface Impact Fc γ Receptor-Dependent Mechanisms. *Front Immunol* **10** (2019).
140. H. L. Matlung, *et al.*, Neutrophils Kill Antibody-Opsonized Cancer Cells by Trogoptosis. *Cell Rep* **23**, 3946-3959.e6 (2018).
141. L. W. Treffers, *et al.*, Genetic variation of human neutrophil Fcγ receptors and SIRPα in antibody-dependent cellular cytotoxicity towards cancer cells. *Eur. J. Immunol.* **48**, 344–354 (2018).
142. A. J. Duits, *et al.*, Skewed distribution of IgG Fc receptor IIa (CD32) polymorphism is associated with renal disease in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Rheum.* **38**, 1832–1836 (1995).
143. L. A. Haseley, *et al.*, Antibodies to C1q in systemic lupus erythematosus: characteristics and relation to Fc gamma RIIA alleles. *Kidney Int.* **52**, 1375–1380 (1997).
144. C. C. Khor, *et al.*, Genome-wide association study identifies FCGR2A as a susceptibility locus for Kawasaki disease. *Nat. Genet.* **43**, 1241–1246 (2011).
145. G. Saggiu, *et al.*, Cis interaction between sialylated FcγRIIA and the αI-domain of Mac-1 limits antibody-mediated neutrophil recruitment. *Nat Commun* **9**, 5058 (2018).
146. P. M. Guyre, A. S. Campbell, W. D. Kniffin, M. W. Fanger, Monocytes and polymorphonuclear neutrophils of patients with streptococcal pharyngitis express increased numbers of type I IgG Fc receptors. *J. Clin. Invest.* **86**, 1892–1896 (1990).
147. R. Repp, *et al.*, Neutrophils express the high affinity receptor for IgG (Fc gamma RI, CD64) after in vivo application of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* **78**, 885–889 (1991).
148. A. Breedveld, M. van Egmond, IgA and FcαRI: Pathological Roles and Therapeutic Opportunities. *Front Immunol* **10**, 553 (2019).
149. R. H. Weisbart, A. Kacena, A. Schuh, D. W. Golde, GM-CSF induces human neutrophil IgA-mediated phagocytosis by an IgA Fc receptor activation mechanism. *Nature* **332**, 647–648 (1988).
150. R. W. Hostoffer, I. Krukovets, M. Berger, Increased Fc alpha R expression and IgA-mediated function on neutrophils induced by chemoattractants. *J. Immunol.* **150**, 4532–4540 (1993).
151. E. Aleyd, *et al.*, IgA Enhances NETosis and Release of Neutrophil Extracellular Traps by Polymorphonuclear Cells via Fcα Receptor I. *The Journal of Immunology* **192**, 2374–2383 (2014).

152. E. Aleyd, M. Al, C. W. Tuk, C. J. van der Laken, M. van Egmond, IgA Complexes in Plasma and Synovial Fluid of Patients with Rheumatoid Arthritis Induce Neutrophil Extracellular Traps via Fc α RI. *J. Immunol.* **197**, 4552–4559 (2016).
153. L. van der Steen, *et al.*, Immunoglobulin A: Fc(alpha)RI interactions induce neutrophil migration through release of leukotriene B4. *Gastroenterology* **137**, 2018-2029.e1–3 (2009).
154. B. Pasquier, *et al.*, Identification of Fc α RI as an inhibitory receptor that controls inflammation: dual role of FcR γ ITAM. *Immunity* **22**, 31–42 (2005).
155. S. Ben Mkaddem, E. Rossato, N. Heming, R. C. Monteiro, Anti-inflammatory role of the IgA Fc receptor (CD89): from autoimmunity to therapeutic perspectives. *Autoimmun Rev* **12**, 666–669 (2013).
156. F. Colotta, *et al.*, Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. *Science* **261**, 472–475 (1993).
157. P. Martin, *et al.*, Mouse neutrophils express the decoy type 2 interleukin-1 receptor (IL-1R2) constitutively and in acute inflammatory conditions. *J. Leukoc. Biol.* **94**, 791–802 (2013).
158. O. Dmitrieva-Posocco, *et al.*, Cell-Type-Specific Responses to Interleukin-1 Control Microbial Invasion and Tumor-Elicited Inflammation in Colorectal Cancer. *Immunity* **50**, 166-180.e7 (2019).
159. B. P. Leung, *et al.*, A role for IL-18 in neutrophil activation. *J. Immunol.* **167**, 2879–2886 (2001).
160. J. Hirata, *et al.*, A role for IL-18 in human neutrophil apoptosis. *Shock* **30**, 628–633 (2008).
161. I. Daigle, S. Yousefi, M. Colonna, D. R. Green, H.-U. Simon, Death receptors bind SHP-1 and block cytokine-induced anti-apoptotic signaling in neutrophils. *Nat. Med.* **8**, 61–67 (2002).
162. J. Murray, *et al.*, Regulation of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor- α : requirement for TNFR55 and TNFR75 for induction of apoptosis in vitro. *Blood* **90**, 2772–2783 (1997).
163. L. E. Kilpatrick, S. Sun, H. M. Korchak, Selective regulation by delta-PKC and PI 3-kinase in the assembly of the antiapoptotic TNFR-1 signaling complex in neutrophils. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **287**, C633-642 (2004).
164. B. Geering, U. Gurzeler, E. Federzoni, T. Kaufmann, H.-U. Simon, A novel TNFR1-triggered apoptosis pathway mediated by class IA PI3Ks in neutrophils. *Blood* **117**, 5953–5962 (2011).
165. I. Dzhagalov, A. St John, Y.-W. He, The antiapoptotic protein Mcl-1 is essential for the survival of neutrophils but not macrophages. *Blood* **109**, 1620–1626 (2007).
166. A. Cross, R. J. Moots, S. W. Edwards, The dual effects of TNF α on neutrophil apoptosis are mediated via differential effects on expression of Mcl-1 and Bfl-1. *Blood* **111**, 878–884 (2008).
167. M. E. Brandes, U. E. Mai, K. Ohura, S. M. Wahl, Type I transforming growth factor-beta receptors on neutrophils mediate chemotaxis to transforming growth factor-beta. *J. Immunol.* **147**, 1600–1606 (1991).

168. J. Reibman, *et al.*, Transforming growth factor beta 1, a potent chemoattractant for human neutrophils, bypasses classic signal-transduction pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 6805–6809 (1991).
169. R. A. Fava, *et al.*, Transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) induced neutrophil recruitment to synovial tissues: implications for TGF-beta-driven synovial inflammation and hyperplasia. *J. Exp. Med.* **173**, 1121–1132 (1991).
170. T. Parekh, B. Saxena, J. Reibman, B. N. Cronstein, L. I. Gold, Neutrophil chemotaxis in response to TGF-beta isoforms (TGF-beta 1, TGF-beta 2, TGF-beta 3) is mediated by fibronectin. *J. Immunol.* **152**, 2456–2466 (1994).
171. M. Lagraoui, L. Gagnon, Enhancement of human neutrophil survival and activation by TGF-beta 1. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* **43**, 313–318 (1997).
172. K. J. Balazovich, R. Fernandez, V. Hinkovska-Galcheva, S. J. Suchard, L. A. Boxer, Transforming growth factor-beta1 stimulates degranulation and oxidant release by adherent human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* **60**, 772–777 (1996).
173. L. Shen, *et al.*, Inhibition of human neutrophil degranulation by transforming growth factor-beta1. *Clin. Exp. Immunol.* **149**, 155–161 (2007).
174. F. Hayashi, T. K. Means, A. D. Luster, Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* **102**, 2660–2669 (2003).
175. J. Downward, How BAD phosphorylation is good for survival. *Nat. Cell Biol.* **1**, E33-35 (1999).
176. L. József, T. Khreiss, J. G. Filep, CpG motifs in bacterial DNA delay apoptosis of neutrophil granulocytes. *FASEB J.* **18**, 1776–1778 (2004).
177. B. Koller, *et al.*, TLR expression on neutrophils at the pulmonary site of infection: TLR1/TLR2-mediated up-regulation of TLR5 expression in cystic fibrosis lung disease. *J. Immunol.* **181**, 2753–2763 (2008).
178. A. D. Kennedy, *et al.*, Dectin-1 promotes fungicidal activity of human neutrophils. *Eur. J. Immunol.* **37**, 467–478 (2007).
179. A. J. Moroi, S. P. Watson, Impact of the PI3-kinase/Akt pathway on ITAM and hemITAM receptors: haemostasis, platelet activation and antithrombotic therapy. *Biochem. Pharmacol.* **94**, 186–194 (2015).
180. W.-B. Lee, *et al.*, Neutrophils Promote Mycobacterial Trehalose Dimycolate-Induced Lung Inflammation via the Mincle Pathway. *PLoS Pathog.* **8**, e1002614 (2012).
181. W.-B. Lee, *et al.*, Mincle activation enhances neutrophil migration and resistance to polymicrobial septic peritonitis. *Sci Rep* **7**, 41106 (2017).
182. A. Sharma, T. J. Simonson, C. N. Jondle, B. B. Mishra, J. Sharma, Mincle-Mediated Neutrophil Extracellular Trap Formation by Regulation of Autophagy. *J. Infect. Dis.* **215**, 1040–1048 (2017).
183. M. B. Richardson, S. J. Williams, MCL and Mincle: C-Type Lectin Receptors That Sense Damaged Self and Pathogen-Associated Molecular Patterns. *Front Immunol* **5**, 288 (2014).
184. J. Klesney-Tait, I. R. Turnbull, M. Colonna, The TREM receptor family and signal integration. *Nat. Immunol.* **7**, 1266–1273 (2006).

185. A. Bouchon, J. Dietrich, M. Colonna, Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. *J. Immunol.* **164**, 4991–4995 (2000).
186. S. Baruah, *et al.*, TREM-1 regulates neutrophil chemotaxis by promoting NOX-dependent superoxide production. *J. Leukoc. Biol.* **105**, 1195–1207 (2019).
187. A. Tammaro, *et al.*, TREM-1 and its potential ligands in non-infectious diseases: from biology to clinical perspectives. *Pharmacol. Ther.* **177**, 81–95 (2017).
188. J. Wu, *et al.*, The proinflammatory myeloid cell receptor TREM-1 controls Kupffer cell activation and development of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* **72**, 3977–3986 (2012).
189. C. B. Read, *et al.*, Cutting Edge: identification of neutrophil PGLYRP1 as a ligand for TREM-1. *J. Immunol.* **194**, 1417–1421 (2015).
190. R. El Mezayen, *et al.*, Endogenous signals released from necrotic cells augment inflammatory responses to bacterial endotoxin. *Immunol. Lett.* **111**, 36–44 (2007).
191. P. Haselmayer, L. Grosse-Hovest, P. von Landenberg, H. Schild, M. P. Radsak, TREM-1 ligand expression on platelets enhances neutrophil activation. *Blood* **110**, 1029–1035 (2007).
192. E. Merck, *et al.*, Ligation of the FcR gamma chain-associated human osteoclast-associated receptor enhances the proinflammatory responses of human monocytes and neutrophils. *J. Immunol.* **176**, 3149–3156 (2006).
193. A. D. Barrow, *et al.*, OSCAR is a collagen receptor that costimulates osteoclastogenesis in DAP12-deficient humans and mice. *J. Clin. Invest.* **121**, 3505–3516 (2011).
194. L. Zhou, *et al.*, Structural basis for collagen recognition by the immune receptor OSCAR. *Blood* **127**, 529–537 (2016).
195. H. Sarantis, S. D. Gray-Owen, The specific innate immune receptor CEACAM3 triggers neutrophil bactericidal activities via a Syk kinase-dependent pathway. *Cell. Microbiol.* **9**, 2167–2180 (2007).
196. A. Buntru, *et al.*, Phosphatidylinositol 3'-kinase activity is critical for initiating the oxidative burst and bacterial destruction during CEACAM3-mediated phagocytosis. *J. Biol. Chem.* **286**, 9555–9566 (2011).
197. A. Sintsova, *et al.*, Global analysis of neutrophil responses to *Neisseria gonorrhoeae* reveals a self-propagating inflammatory program. *PLoS Pathog.* **10**, e1004341 (2014).
198. J. R. Dunkelberger, W.-C. Song, Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res.* **20**, 34–50 (2010).
199. B. B. Whitlock, S. Gardai, V. Fadok, D. Bratton, P. M. Henson, Differential roles for alpha(M)beta(2) integrin clustering or activation in the control of apoptosis via regulation of akt and ERK survival mechanisms. *J. Cell Biol.* **151**, 1305–1320 (2000).
200. M. C. L. Wu, *et al.*, The receptor for complement component C3a mediates protection from intestinal ischemia-reperfusion injuries by inhibiting neutrophil mobilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 9439–9444 (2013).

201. F. H. Brennan, *et al.*, Complement receptor C3aR1 controls neutrophil mobilization following spinal cord injury through physiological antagonism of CXCR2. *JCI Insight* **4** (2019).
202. S. Guglietta, *et al.*, Coagulation induced by C3aR-dependent NETosis drives protumorigenic neutrophils during small intestinal tumorigenesis. *Nat Commun* **7**, 11037 (2016).
203. Y. Miyabe, *et al.*, Complement C5a Receptor is the Key Initiator of Neutrophil Adhesion Igniting Immune Complex-induced Arthritis. *Sci Immunol* **2** (2017).
204. A. Schreiber, *et al.*, C5a receptor mediates neutrophil activation and ANCA-induced glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **20**, 289–298 (2009).
205. K. F. Bornhöfft, T. Goldammer, A. Rebl, S. P. Galuska, Siglecs: A journey through the evolution of sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins. *Dev. Comp. Immunol.* **86**, 219–231 (2018).
206. T. Angata, *et al.*, Loss of Siglec-14 reduces the risk of chronic obstructive pulmonary disease exacerbation. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 3199–3210 (2013).
207. S. R. Ali, *et al.*, Siglec-5 and Siglec-14 are polymorphic paired receptors that modulate neutrophil and amnion signaling responses to group B Streptococcus. *J. Exp. Med.* **211**, 1231–1242 (2014).
208. O. Malbec, *et al.*, Fc epsilon receptor I-associated lyn-dependent phosphorylation of Fc gamma receptor IIB during negative regulation of mast cell activation. *J. Immunol.* **160**, 1647–1658 (1998).
209. K. Su, *et al.*, Expression Profile of FcγRIIb on Leukocytes and Its Dysregulation in Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol* **178**, 3272–3280 (2007).
210. J. van der Heijden, *et al.*, Haplotypes of FcγRIIa and FcγRIIb polymorphic variants influence IgG-mediated responses in neutrophils. *J. Immunol.* **192**, 2715–2721 (2014).
211. R. Lu, H. Pan, J. E. Shively, CEACAM1 negatively regulates IL-1β production in LPS activated neutrophils by recruiting SHP-1 to a SYK-TLR4-CEACAM1 complex. *PLoS Pathog.* **8**, e1002597 (2012).
212. M. Sadarangani, A. J. Pollard, S. D. Gray-Owen, Opa proteins and CEACAMs: pathways of immune engagement for pathogenic Neisseria. *FEMS Microbiol. Rev.* **35**, 498–514 (2011).
213. K. Zen, *et al.*, Inflammation-induced proteolytic processing of the SIRPα cytoplasmic ITIM in neutrophils propagates a proinflammatory state. *Nat Commun* **4**, 2436 (2013).
214. N. G. Ring, *et al.*, Anti-SIRPα antibody immunotherapy enhances neutrophil and macrophage antitumor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114**, E10578–E10585 (2017).
215. L. W. Treffers, *et al.*, IgA-Mediated Killing of Tumor Cells by Neutrophils Is Enhanced by CD47-SIRPα Checkpoint Inhibition. *Cancer Immunol Res* **8**, 120–130 (2020).
216. A. F. Carlin, *et al.*, Group B Streptococcus suppression of phagocyte functions by protein-mediated engagement of human Siglec-5. *J. Exp. Med.* **206**, 1691–1699 (2009).

217. I. Secundino, *et al.*, Host and pathogen hyaluronan signal through human siglec-9 to suppress neutrophil activation. *J. Mol. Med.* **94**, 219–233 (2016).
218. A. Lizcano, *et al.*, Erythrocyte sialoglycoproteins engage Siglec-9 on neutrophils to suppress activation. *Blood* **129**, 3100–3110 (2017).
219. A. Zarbock, K. Singbartl, K. Ley, Complete reversal of acid-induced acute lung injury by blocking of platelet-neutrophil aggregation. *J. Clin. Invest.* **116**, 3211–3219 (2006).
220. B. McDonald, R. Urrutia, B. G. Yipp, C. N. Jenne, P. Kubersky, Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis. *Cell Host Microbe* **12**, 324–333 (2012).
221. V. Sreeramkumar, *et al.*, Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. *Science* **346**, 1234–1238 (2014).
222. J. García-Prieto, *et al.*, Neutrophil stunning by metoprolol reduces infarct size. *Nat Commun* **8**, 14780 (2017).
223. J. Rossaint, *et al.*, Directed transport of neutrophil-derived extracellular vesicles enables platelet-mediated innate immune response. *Nat Commun* **7**, 13464 (2016).
224. S. R. Clark, *et al.*, Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat. Med.* **13**, 463–469 (2007).
225. A. Caudrillier, *et al.*, Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. *J Clin Invest* **122**, 2661–2671 (2012).
226. R. Polanowska-Grabowska, *et al.*, P-selectin-mediated platelet-neutrophil aggregate formation activates neutrophils in mouse and human sickle cell disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 2392–2399 (2010).
227. M. J. Peters, *et al.*, Circulating platelet-neutrophil complexes represent a subpopulation of activated neutrophils primed for adhesion, phagocytosis and intracellular killing. *Br. J. Haematol.* **106**, 391–399 (1999).
228. M. Gawaz, T. Dickfeld, C. Bogner, S. Fateh-Moghadam, F. J. Neumann, Platelet function in septic multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive Care Med* **23**, 379–385 (1997).
229. K. Ueno, *et al.*, Circulating platelet-neutrophil aggregates play a significant role in Kawasaki disease. *Circ. J.* **79**, 1349–1356 (2015).
230. M. A. Jimenez, E. M. Novelli, G. D. Shaw, P. Sundd, Glycoprotein Iba inhibitor (CCP-224) prevents neutrophil-platelet aggregation in sickle cell disease. *Blood Adv* **1**, 1712–1716 (2017).
231. M. Finsterbusch, W. C. Schrottmaier, J. B. Kral-Pointner, M. Salzmann, A. Assinger, Measuring and interpreting platelet-leukocyte aggregates. *Platelets* **29**, 677–685 (2018).
232. F. Herster, *et al.*, Platelets Aggregate With Neutrophils and Promote Skin Pathology in Psoriasis. *Front Immunol* **10**, 1867 (2019).
233. M. Mauler, *et al.*, Platelet-neutrophil complex formation—a detailed in vitro analysis of murine and human blood samples. *J. Leukoc. Biol.* **99**, 781–789 (2016).
234. H. Hui, K. Fuller, W. N. Erber, M. D. Linden, Measurement of monocyte-platelet aggregates by imaging flow cytometry. *Cytometry A* **87**, 273–278 (2015).

235. A. Hidalgo, *et al.*, Heterotypic interactions enabled by polarized neutrophil microdomains mediate thromboinflammatory injury. *Nat. Med.* **15**, 384–391 (2009).
236. B. E. Clausen, C. Burkhardt, W. Reith, R. Renkawitz, I. Förster, Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res.* **8**, 265–277 (1999).
237. G. H. Frydman, *et al.*, Technical Advance: Changes in neutrophil migration patterns upon contact with platelets in a microfluidic assay. *J. Leukoc. Biol.* **101**, 797–806 (2017).
238. N. A. Horn, *et al.*, Epinephrine enhances platelet-neutrophil adhesion in whole blood in vitro. *Anesth. Analg.* **100**, 520–526 (2005).
239. G. H. Rao, G. J. Johnson, J. G. White, Influence of epinephrine on the aggregation response of aspirin-treated platelets. *Prostaglandins Med* **5**, 45–58 (1980).
240. S. Singh, C. J. Malm, S. Ramström, C. Hesse, A. Jeppsson, Adrenaline enhances in vitro platelet activation and aggregation in blood samples from ticagrelor-treated patients. *Res Pract Thromb Haemost* **2**, 718–725 (2018).
241. T. Parimon, *et al.*, Staphylococcus aureus α -hemolysin promotes platelet-neutrophil aggregate formation. *J. Infect. Dis.* **208**, 761–770 (2013).
242. B. Furie, B. C. Furie, R. Flaumenhaft, A journey with platelet P-selectin: the molecular basis of granule secretion, signalling and cell adhesion. *Thromb. Haemost.* **86**, 214–221 (2001).
243. S. Sbrana, *et al.*, Relationships between optical aggregometry (type born) and flow cytometry in evaluating ADP-induced platelet activation. *Cytometry B Clin Cytom* **74**, 30–39 (2008).
244. K. L. Moore, *et al.*, Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells. *J. Cell Biol.* **118**, 445–456 (1992).
245. H. Beutier, *et al.*, Platelets expressing IgG receptor Fc γ R1IA/CD32A determine the severity of experimental anaphylaxis. *Sci Immunol* **3** (2018).
246. F. W. Lam, A. R. Burns, C. W. Smith, R. E. Rumbaut, Platelets enhance neutrophil transendothelial migration via P-selectin glycoprotein ligand-1. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **300**, H468-475 (2011).
247. V. R. Krishnamurthy, *et al.*, Glycopeptide analogues of PSGL-1 inhibit P-selectin in vitro and in vivo. *Nat Commun* **6**, 6387 (2015).
248. E. Larsen, *et al.*, PADGEM-dependent adhesion of platelets to monocytes and neutrophils is mediated by a lineage-specific carbohydrate, LNF III (CD15). *Cell* **63**, 467–474 (1990).
249. S. Aigner, *et al.*, CD24, a mucin-type glycoprotein, is a ligand for P-selectin on human tumor cells. *Blood* **89**, 3385–3395 (1997).
250. T. N. Mayadas, X. Cullere, Neutrophil beta2 integrins: moderators of life or death decisions. *Trends Immunol.* **26**, 388–395 (2005).
251. D. I. Simon, *et al.*, Platelet glycoprotein Iba1 is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J. Exp. Med.* **192**, 193–204 (2000).

252. A. Corken, S. Russell, J. Dent, S. R. Post, J. Ware, Platelet glycoprotein Ib-IX as a regulator of systemic inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **34**, 996–1001 (2014).
253. Y. Wang, *et al.*, Leukocyte engagement of platelet glycoprotein Iba α via the integrin Mac-1 is critical for the biological response to vascular injury. *Circulation* **112**, 2993–3000 (2005).
254. J. Hirahashi, *et al.*, Mac-1 (CD11b/CD18) links inflammation and thrombosis after glomerular injury. *Circulation* **120**, 1255–1265 (2009).
255. Y. Wang, *et al.*, Leukocyte integrin Mac-1 regulates thrombosis via interaction with platelet GPIb α . *Nat Commun* **8**, 15559 (2017).
256. C. Weber, T. A. Springer, Neutrophil accumulation on activated, surface-adherent platelets in flow is mediated by interaction of Mac-1 with fibrinogen bound to α IIb β 3 and stimulated by platelet-activating factor. *J. Clin. Invest.* **100**, 2085–2093 (1997).
257. A. Caron, J.-F. Théorêt, S. A. Mousa, Y. Merhi, Anti-platelet effects of GPIIb/IIIa and P-selectin antagonism, platelet activation, and binding to neutrophils. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **40**, 296–306 (2002).
258. T. Ibbotson, J. K. McGavin, K. L. Goa, Abciximab: an updated review of its therapeutic use in patients with ischaemic heart disease undergoing percutaneous coronary revascularisation. *Drugs* **63**, 1121–1163 (2003).
259. X. Li, *et al.*, Platelet Function and Risk of Bleeding in Patients With Acute Coronary Syndrome Following Tirofiban Infusion. *Front Pharmacol* **10**, 1158 (2019).
260. , Effects of platelet glycoprotein IIb/IIIa blockade with tirofiban on adverse cardiac events in patients with unstable angina or acute myocardial infarction undergoing coronary angioplasty. The RESTORE Investigators. Randomized Efficacy Study of Tirofiban for Outcomes and REstenosis. *Circulation* **96**, 1445–1453 (1997).
261. S. Santoso, *et al.*, The junctional adhesion molecule 3 (JAM-3) on human platelets is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1. *J. Exp. Med.* **196**, 679–691 (2002).
262. A. Paramanathan, A. Saxena, D. L. Morris, A systematic review and meta-analysis on the impact of pre-operative neutrophil lymphocyte ratio on long term outcomes after curative intent resection of solid tumours. *Surg Oncol* **23**, 31–39 (2014).
263. Y.-A. Vano, *et al.*, Optimal cut-off for neutrophil-to-lymphocyte ratio: Fact or Fantasy? A prospective cohort study in metastatic cancer patients. *PLoS ONE* **13**, e0195042 (2018).
264. Y. Nakamura, *et al.*, Neutrophil/lymphocyte ratio has a prognostic value for patients with terminal cancer. *World J Surg Oncol* **14** (2016).
265. S. Ostrand-Rosenberg, C. Fenselau, Myeloid-derived suppressor cells: Immune suppressive cells that impair antitumor immunity and are sculpted by their environment. *J Immunol* **200**, 422–431 (2018).
266. V. Bronte, *et al.*, Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat Commun* **7**, 12150 (2016).
267. Y. Si, *et al.*, Multidimensional imaging provides evidence for down-regulation of T cell effector function by MDSC in human cancer tissue. *Sci Immunol* **4** (2019).

268. M. D. Wellenstein, *et al.*, Loss of p53 triggers WNT-dependent systemic inflammation to drive breast cancer metastasis. *Nature* **572**, 538–542 (2019).
269. Y. Li, *et al.*, Trajectory of absolute neutrophil counts in patients treated with pegfilgrastim on the day of chemotherapy versus the day after chemotherapy. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **77**, 703–712 (2016).
270. J. Klastersky, *et al.*, Management of febrile neutropaenia: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann. Oncol.* **27**, v111–v118 (2016).
271. W. Chua, K. A. Charles, V. E. Baracos, S. J. Clarke, Neutrophil/lymphocyte ratio predicts chemotherapy outcomes in patients with advanced colorectal cancer. *Br. J. Cancer* **104**, 1288–1295 (2011).
272. M. Michael, *et al.*, Prognostic factors predictive of response and survival to a modified FOLFOX regimen: importance of an increased neutrophil count. *Clin Colorectal Cancer* **6**, 297–304 (2006).
273. W. Chua, S. J. Clarke, K. A. Charles, Systemic inflammation and prediction of chemotherapy outcomes in patients receiving docetaxel for advanced cancer. *Support Care Cancer* **20**, 1869–1874 (2012).
274. S. Kaito, *et al.*, A new prognostic score comprising lactate dehydrogenase, albumin and neutrophil to lymphocyte ratio to predict sensitivity to first-line chemotherapy in patients with peripheral T-cell lymphomas. *Int. J. Hematol.* **107**, 451–459 (2018).
275. E. Dell'Aquila, *et al.*, Prognostic and predictive role of neutrophil/lymphocytes ratio in metastatic colorectal cancer: a retrospective analysis of the TRIBE study by GONO. *Ann. Oncol.* **29**, 924–930 (2018).
276. K.-M. Cho, *et al.*, Neutrophil-to-lymphocyte ratio, platelet-to-lymphocyte ratio, and their dynamic changes during chemotherapy is useful to predict a more accurate prognosis of advanced biliary tract cancer. *Oncotarget* **8**, 2329–2341 (2017).
277. A. T. Sümbül, *et al.*, Neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts PSA response, but not outcomes in patients with castration-resistant prostate cancer treated with docetaxel. *Int Urol Nephrol* **46**, 1531–1535 (2014).
278. C. Robert, *et al.*, Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N. Engl. J. Med.* **372**, 320–330 (2015).
279. H. Borghaei, *et al.*, Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **373**, 1627–1639 (2015).
280. P. F. Ferrucci, *et al.*, Baseline neutrophil-to-lymphocyte ratio is associated with outcome of ipilimumab-treated metastatic melanoma patients. *Br. J. Cancer* **112**, 1904–1910 (2015).
281. M. Capone, *et al.*, Baseline neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) and derived NLR could predict overall survival in patients with advanced melanoma treated with nivolumab. *J Immunother Cancer* **6**, 74 (2018).
282. K. Buder-Bakhaya, J. C. Hassel, Biomarkers for Clinical Benefit of Immune Checkpoint Inhibitor Treatment-A Review From the Melanoma Perspective and Beyond. *Front Immunol* **9**, 1474 (2018).
283. J. Brahmer, *et al.*, Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **373**, 123–135 (2015).

284. S. Diem, *et al.*, Neutrophil-to-Lymphocyte ratio (NLR) and Platelet-to-Lymphocyte ratio (PLR) as prognostic markers in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) treated with nivolumab. *Lung Cancer* **111**, 176–181 (2017).
285. A. Schernberg, *et al.*, Neutrophilia as prognostic biomarker in locally advanced stage III lung cancer. *PLoS One* **13** (2018).
286. J. Ma, *et al.*, Neutrophil-to-lymphocyte Ratio (NLR) as a predictor for recurrence in patients with stage III melanoma. *Sci Rep* **8**, 4044 (2018).
287. Z. Li, R. Zhao, Y. Cui, Y. Zhou, X. Wu, The dynamic change of neutrophil to lymphocyte ratio can predict clinical outcome in stage I-III colon cancer. *Sci Rep* **8**, 9453 (2018).
288. C.-N. Wu, *et al.*, Prognosis of neutrophil-to-lymphocyte ratio in clinical early-stage tongue (cT1/T2N0) cancer. *Onco Targets Ther* **10**, 3917–3924 (2017).
289. M. Oritura, *et al.*, Neutrophil to lymphocyte ratio (NLR) for prediction of distant metastasis-free survival (DMFS) in early breast cancer: a propensity score-matched analysis. *ESMO Open* **1**, e000038 (2016).
290. M. O. Chu, *et al.*, Pretreatment Inflammation-Based Markers Predict Survival Outcomes in Patients with Early Stage Hepatocellular Carcinoma After Radiofrequency Ablation. *Sci Rep* **8**, 16611 (2018).
291. I. Torsteinsdóttir, N. G. Arvidson, R. Hällgren, L. Håkansson, Enhanced expression of integrins and CD66b on peripheral blood neutrophils and eosinophils in patients with rheumatoid arthritis, and the effect of glucocorticoids. *Scand. J. Immunol.* **50**, 433–439 (1999).
292. B. S. Bochner, *et al.*, Differences between human eosinophils and neutrophils in the function and expression of sialic acid-containing counterligands for E-selectin. *J. Immunol.* **152**, 774–782 (1994).
293. T. Kiwamoto, N. Kawasaki, J. C. Paulson, B. S. Bochner, Siglec-8 as a drugable target to treat eosinophil and mast cell-associated conditions. *Pharmacol Ther* **135**, 327–336 (2012).
294. H. K. Jensen, *et al.*, Presence of intratumoral neutrophils is an independent prognostic factor in localized renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* **27**, 4709–4717 (2009).
295. H.-L. Rao, *et al.*, Increased intratumoral neutrophil in colorectal carcinomas correlates closely with malignant phenotype and predicts patients' adverse prognosis. *PLoS ONE* **7**, e30806 (2012).
296. S. Trellakis, *et al.*, Polymorphonuclear granulocytes in human head and neck cancer: enhanced inflammatory activity, modulation by cancer cells and expansion in advanced disease. *Int. J. Cancer* **129**, 2183–2193 (2011).
297. Y. Matsumoto, *et al.*, The significance of tumor-associated neutrophil density in uterine cervical cancer treated with definitive radiotherapy. *Gynecol. Oncol.* **145**, 469–475 (2017).
298. M. R. Galdiero, *et al.*, Potential involvement of neutrophils in human thyroid cancer. *PLoS ONE* **13**, e0199740 (2018).
299. R. A. Caruso, *et al.*, Prognostic value of intratumoral neutrophils in advanced gastric carcinoma in a high-risk area in northern Italy. *Mod. Pathol.* **15**, 831–837 (2002).

300. M. R. Galdiero, *et al.*, Occurrence and significance of tumor-associated neutrophils in patients with colorectal cancer. *International Journal of Cancer* **139**, 446–456 (2016).
301. R. A. Droeser, *et al.*, High myeloperoxidase positive cell infiltration in colorectal cancer is an independent favorable prognostic factor. *PLoS ONE* **8**, e64814 (2013).
302. M. L. Wikberg, *et al.*, Neutrophil infiltration is a favorable prognostic factor in early stages of colon cancer. *Hum. Pathol.* **68**, 193–202 (2017).
303. R. S. Berry, *et al.*, High levels of tumor-associated neutrophils are associated with improved overall survival in patients with stage II colorectal cancer. *PLoS ONE* **12**, e0188799 (2017).
304. A. Ponzetta, *et al.*, Neutrophils Driving Unconventional T Cells Mediate Resistance against Murine Sarcomas and Selected Human Tumors. *Cell* **178**, 346-360.e24 (2019).
305. T. O. Jensen, *et al.*, Intratumoral neutrophils and plasmacytoid dendritic cells indicate poor prognosis and are associated with pSTAT3 expression in AJCC stage I/II melanoma. *Cancer* **118**, 2476–2485 (2012).
306. A. Carus, M. Ladekarl, H. Hager, B. S. Nedergaard, F. Donskov, Tumour-associated CD66b+ neutrophil count is an independent prognostic factor for recurrence in localised cervical cancer. *Br. J. Cancer* **108**, 2116–2122 (2013).
307. K. Tomczak, P. Czerwińska, M. Wiznerowicz, The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge. *Contemp Oncol (Pozn)* **19**, A68-77 (2015).
308. A. R. Abbas, *et al.*, Immune response in silico (IRIS): immune-specific genes identified from a compendium of microarray expression data. *Genes Immun.* **6**, 319–331 (2005).
309. G. Bindea, *et al.*, Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer. *Immunity* **39**, 782–795 (2013).
310. E. Becht, *et al.*, Estimating the population abundance of tissue-infiltrating immune and stromal cell populations using gene expression. *Genome Biol.* **17**, 218 (2016).
311. A. J. Nirmal, *et al.*, Immune Cell Gene Signatures for Profiling the Microenvironment of Solid Tumors. *Cancer Immunol Res* **6**, 1388–1400 (2018).
312. Y. Xue, *et al.*, Tumor-infiltrating M2 macrophages driven by specific genomic alterations are associated with prognosis in bladder cancer. *Oncol. Rep.* **42**, 581–594 (2019).
313. F. Finotello, Z. Trajanoski, Quantifying tumor-infiltrating immune cells from transcriptomics data. *Cancer Immunol Immunother* **67**, 1031–1040 (2018).
314. G. Sturm, *et al.*, Comprehensive evaluation of transcriptome-based cell-type quantification methods for immuno-oncology. *Bioinformatics* **35**, i436–i445 (2019).
315. M. Tosolini, *et al.*, Assessment of tumor-infiltrating TCRV γ 9V δ 2 $\gamma\delta$ lymphocyte abundance by deconvolution of human cancers microarrays. *Oncoimmunology* **6**, e1284723 (2017).
316. A. M. Newman, *et al.*, Determining cell type abundance and expression from bulk tissues with digital cytometry. *Nat. Biotechnol.* **37**, 773–782 (2019).

317. G. Monaco, *et al.*, RNA-Seq Signatures Normalized by mRNA Abundance Allow Absolute Deconvolution of Human Immune Cell Types. *Cell Rep* **26**, 1627-1640.e7 (2019).
318. N. Rohr-Udilova, *et al.*, Deviations of the immune cell landscape between healthy liver and hepatocellular carcinoma. *Sci Rep* **8**, 6220 (2018).
319. S. Brandau, *et al.*, Myeloid-derived suppressor cells in the peripheral blood of cancer patients contain a subset of immature neutrophils with impaired migratory properties. *Journal of Leukocyte Biology* **89**, 311–317 (2011).
320. M. Evrard, *et al.*, Developmental Analysis of Bone Marrow Neutrophils Reveals Populations Specialized in Expansion, Trafficking, and Effector Functions. *Immunity* **48**, 364-379.e8 (2018).
321. A. Spiegel, *et al.*, Neutrophils Suppress Intraluminal NK Cell-Mediated Tumor Cell Clearance and Enhance Extravasation of Disseminated Carcinoma Cells. *Cancer Discov* **6**, 630–649 (2016).
322. J. Albrengues, *et al.*, Neutrophil extracellular traps produced during inflammation awaken dormant cancer cells in mice. *Science* **361**, eaao4227 (2018).
323. D. Di Mitri, *et al.*, Tumour-infiltrating Gr-1+ myeloid cells antagonize senescence in cancer. *Nature* **515**, 134–137 (2014).
324. A. M. Houghton, *et al.*, Neutrophil elastase-mediated degradation of IRS-1 accelerates lung tumor growth. *Nat. Med.* **16**, 219–223 (2010).
325. S. Tohme, *et al.*, Neutrophil Extracellular Traps Promote the Development and Progression of Liver Metastases after Surgical Stress. *Cancer Res.* **76**, 1367–1380 (2016).
326. P. C. Rodriguez, *et al.*, Arginase I Production in the Tumor Microenvironment by Mature Myeloid Cells Inhibits T-Cell Receptor Expression and Antigen-Specific T-Cell Responses. *Cancer Res* **64**, 5839–5849 (2004).
327. J. Michaeli, *et al.*, Tumor-associated neutrophils induce apoptosis of non-activated CD8 T-cells in a TNF α and NO-dependent mechanism, promoting a tumor-supportive environment. *Oncoimmunology* **6** (2017).
328. J. Zhu, *et al.*, Resistance to cancer immunotherapy mediated by apoptosis of tumor-infiltrating lymphocytes. *Nature Communications* **8**, 1404 (2017).
329. J. Yang, *et al.*, Loss of CXCR4 in Myeloid Cells Enhances Antitumor Immunity and Reduces Melanoma Growth through NK Cell and FASL Mechanisms. *Cancer Immunol Res* **6**, 1186–1198 (2018).
330. E. S. Radisky, D. C. Radisky, Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **15**, 201–212 (2010).
331. J. Faget, *et al.*, Neutrophils and Snail Orchestrate the Establishment of a Pro-tumor Microenvironment in Lung Cancer. *Cell Rep* **21**, 3190–3204 (2017).
332. Y. Wang, *et al.*, Tumor-Contacted Neutrophils Promote Metastasis by a CD90-TIMP-1 Juxtacrine-Paracrine Loop. *Clin. Cancer Res.* **25**, 1957–1969 (2019).
333. L. Yang, *et al.*, DNA of neutrophil extracellular traps promotes cancer metastasis via CCDC25. *Nature* (2020) <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2394-6>.

334. J. Cools-Lartigue, *et al.*, Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *J. Clin. Invest.* (2013) <https://doi.org/10.1172/JCI67484>.
335. J. Jablonska, S. Leschner, K. Westphal, S. Lienenklaus, S. Weiss, Neutrophils responsive to endogenous IFN-beta regulate tumor angiogenesis and growth in a mouse tumor model. *J. Clin. Invest.* **120**, 1151–1164 (2010).
336. X. Huo, *et al.*, Transcriptomic profiles of tumor-associated neutrophils reveal prominent roles in enhancing angiogenesis in liver tumorigenesis in zebrafish. *Sci Rep* **9**, 1509 (2019).
337. M. E. Shaul, *et al.*, Tumor-associated neutrophils display a distinct N1 profile following TGF β modulation: A transcriptomics analysis of pro- vs. antitumor TANs. *Oncoimmunology* **5**, e1232221 (2016).
338. R. Schrufer, N. Lutze, J. Schymeinsky, B. Walzog, Human neutrophils promote angiogenesis by a paracrine feedforward mechanism involving endothelial interleukin-8. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **288**, H1186-1192 (2005).
339. T.-J. Li, *et al.*, Interleukin-17-Producing Neutrophils Link Inflammatory Stimuli to Disease Progression by Promoting Angiogenesis in Gastric Cancer. *Clin. Cancer Res.* **23**, 1575–1585 (2017).
340. L. Aldabbous, *et al.*, Neutrophil Extracellular Traps Promote Angiogenesis: Evidence From Vascular Pathology in Pulmonary Hypertension. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **36**, 2078–2087 (2016).
341. R. Kikuchi, *et al.*, An antiangiogenic isoform of VEGF-A contributes to impaired vascularization in peripheral artery disease. *Nat. Med.* **20**, 1464–1471 (2014).
342. S. Loffredo, *et al.*, Group V Secreted Phospholipase A2 Induces the Release of Proangiogenic and Antiangiogenic Factors by Human Neutrophils. *Front Immunol* **8**, 443 (2017).
343. T. Takeshima, *et al.*, Key role for neutrophils in radiation-induced antitumor immune responses: Potentiation with G-CSF. *PNAS* **113**, 11300–11305 (2016).
344. F. Dallegri, *et al.*, Tumor cell lysis by activated human neutrophils: analysis of neutrophil-delivered oxidative attack and role of leukocyte function-associated antigen 1. *Inflammation* **15**, 15–30 (1991).
345. J. Yan, *et al.*, Human polymorphonuclear neutrophils specifically recognize and kill cancerous cells. *Oncoimmunology* **3**, e950163 (2014).
346. V. Finisguerra, *et al.*, MET is required for the recruitment of anti-tumoural neutrophils. *Nature* **522**, 349–353 (2015).
347. C. Tecchio, *et al.*, IFN α -stimulated neutrophils and monocytes release a soluble form of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo-2 ligand) displaying apoptotic activity on leukemic cells. *Blood* **103**, 3837–3844 (2004).
348. S. Arelaki, *et al.*, Gradient Infiltration of Neutrophil Extracellular Traps in Colon Cancer and Evidence for Their Involvement in Tumour Growth. *PLOS ONE* **11**, e0154484 (2016).
349. A. Martin, *et al.*, Tumor-derived granzyme B-expressing neutrophils acquire antitumor potential after lipid A treatment. *Oncotarget* **9**, 28364–28378 (2018).

350. K. Mahiddine, *et al.*, Relief of tumor hypoxia unleashes the tumoricidal potential of neutrophils. *J Clin Invest* **130**, 389–403 (2020).
351. A. D. Waldman, J. M. Fritz, M. J. Lenardo, A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nature Reviews Immunology*, 1–18 (2020).
352. T. Valerius, *et al.*, Fc α RI (CD89) as a novel trigger molecule for bispecific antibody therapy. *Blood* **90**, 4485–4492 (1997).
353. M. Dechant, *et al.*, Chimeric IgA antibodies against HLA class II effectively trigger lymphoma cell killing. *Blood* **100**, 4574–4580 (2002).
354. S. Lohse, *et al.*, Characterization of a mutated IgA2 antibody of the m(1) allotype against the epidermal growth factor receptor for the recruitment of monocytes and macrophages. *J. Biol. Chem.* **287**, 25139–25150 (2012).
355. M. Albanesi, *et al.*, Neutrophils mediate antibody-induced antitumor effects in mice. *Blood* **122**, 3160–3164 (2013).
356. E. B. Eruslanov, *et al.*, Tumor-associated neutrophils stimulate T cell responses in early-stage human lung cancer. *J Clin Invest* **124**, 5466–5480 (2014).
357. V. Governa, *et al.*, The Interplay Between Neutrophils and CD8+ T Cells Improves Survival in Human Colorectal Cancer. *Clin. Cancer Res.* **23**, 3847–3858 (2017).
358. S. Kruger, *et al.*, Advances in cancer immunotherapy 2019 - latest trends. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **38**, 268 (2019).
359. J. D. Waight, Q. Hu, A. Miller, S. Liu, S. I. Abrams, Tumor-Derived G-CSF Facilitates Neoplastic Growth through a Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cell-Dependent Mechanism. *PLOS ONE* **6**, e27690 (2011).
360. L. J. Bendall, K. F. Bradstock, G-CSF: From granulopoietic stimulant to bone marrow stem cell mobilizing agent. *Cytokine Growth Factor Rev.* **25**, 355–367 (2014).
361. M. Groblewska, *et al.*, Serum levels of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) in pancreatic cancer patients. *Clin. Chem. Lab. Med.* **45**, 30–34 (2007).
362. B. Mroczko, M. Szmitkowski, B. Okulczyk, Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) and macrophagecolony stimulating factor (M-CSF) in colorectal cancer patients. *Clin. Chem. Lab. Med.* **40**, 351–355 (2002).
363. B. Mroczko, M. Szmitkowski, J. Niklinski, Granulocyte-Colony stimulating factor and macrophage-colony stimulating factor in patients with non-small-cell lung cancer. *Clin. Chem. Lab. Med.* **39**, 374–379 (2001).
364. B. Yeo, A. D. Redfern, K. A. Mouchemore, J. A. Hamilton, R. L. Anderson, The dark side of granulocyte-colony stimulating factor: a supportive therapy with potential to promote tumour progression. *Clin Exp Metastasis* **35**, 255–267 (2018).
365. P. Papaldo, *et al.*, Addition of Either Lonidamine or Granulocyte Colony-Stimulating Factor Does Not Improve Survival in Early Breast Cancer Patients Treated With High-Dose Epirubicin and Cyclophosphamide. *JCO* **21**, 3462–3468 (2003).
366. A. D. Panopoulos, S. S. Watowich, Granulocyte colony-stimulating factor: Molecular mechanisms of action during steady state and ‘emergency’ hematopoiesis. *Cytokine* **42**, 277–288 (2008).

367. E. A. Akbay, *et al.*, Interleukin-17A Promotes Lung Tumor Progression through Neutrophil Attraction to Tumor Sites and Mediating Resistance to PD-1 Blockade. *Journal of Thoracic Oncology* **12**, 1268–1279 (2017).
368. J. Wu, *et al.*, Elevated Pretherapy Serum IL17 in Primary Hepatocellular Carcinoma Patients Correlate to Increased Risk of Early Recurrence after Curative Hepatectomy. *PLoS One* **7** (2012).
369. C. Xu, K. Hao, L. Yu, X. Zhang, Serum interleukin-17 as a diagnostic and prognostic marker for non-small cell lung cancer. *Biomarkers* **19**, 287–290 (2014).
370. B. Pan, *et al.*, Interleukin-17 levels correlate with poor prognosis and vascular endothelial growth factor concentration in the serum of patients with non-small cell lung cancer. *Biomarkers* **20**, 232–239 (2015).
371. G. Cacalano, *et al.*, Neutrophil and B cell expansion in mice that lack the murine IL-8 receptor homolog. *Science* **265**, 682–684 (1994).
372. C. Martin, *et al.*, Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence. *Immunity* **19**, 583–593 (2003).
373. K. J. Eash, A. M. Greenbaum, P. K. Gopalan, D. C. Link, CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *J. Clin. Invest.* **120**, 2423–2431 (2010).
374. L. Gong, *et al.*, Promoting effect of neutrophils on lung tumorigenesis is mediated by CXCR2 and neutrophil elastase. *Mol. Cancer* **12**, 154 (2013).
375. C. W. Steele, *et al.*, CXCR2 Inhibition Profoundly Suppresses Metastases and Augments Immunotherapy in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* **29**, 832–845 (2016).
376. F. Luppi, A. M. Longo, W. I. de Boer, K. F. Rabe, P. S. Hiemstra, Interleukin-8 stimulates cell proliferation in non-small cell lung cancer through epidermal growth factor receptor transactivation. *Lung Cancer* **56**, 25–33 (2007).
377. P. Saintigny, *et al.*, CXCR2 expression in tumor cells is a poor prognostic factor and promotes invasion and metastasis in lung adenocarcinoma. *Cancer Res.* **73**, 571–582 (2013).
378. Y. M. Zhu, S. J. Webster, D. Flower, P. J. Woll, Interleukin-8/CXCL8 is a growth factor for human lung cancer cells. *Br. J. Cancer* **91**, 1970–1976 (2004).
379. K. J. Eash, J. M. Means, D. W. White, D. C. Link, CXCR4 is a key regulator of neutrophil release from the bone marrow under basal and stress granulopoiesis conditions. *Blood* **113**, 4711–4719 (2009).
380. E. De Clercq, Mozobil® (Plerixafor, AMD3100), 10 years after its approval by the US Food and Drug Administration. *Antivir Chem Chemother* **27** (2019).
381. K. Jung, *et al.*, Targeting CXCR4-dependent immunosuppressive Ly6Clow monocytes improves antiangiogenic therapy in colorectal cancer. *PNAS* **114**, 10455–10460 (2017).
382. L. Xue, X. Mao, L. Ren, X. Chu, Inhibition of CXCL12/CXCR4 axis as a potential targeted therapy of advanced gastric carcinoma. *Cancer Med* **6**, 1424–1436 (2017).

383. S. Baltshukat, *et al.*, Capmatinib (INC280) Is Active Against Models of Non-Small Cell Lung Cancer and Other Cancer Types with Defined Mechanisms of MET Activation. *Clin. Cancer Res.* (2019) <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-2814>.
384. N. Glodde, *et al.*, Reactive Neutrophil Responses Dependent on the Receptor Tyrosine Kinase c-MET Limit Cancer Immunotherapy. *Immunity* **47**, 789-802.e9 (2017).
385. G. A. Dominguez, *et al.*, Selective Targeting of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Cancer Patients Using DS-8273a, an Agonistic TRAIL-R2 Antibody. *Clin Cancer Res* (2016) <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1784> (April 24, 2019).
386. Z. Wang, B. Till, Q. Gao, Chemotherapeutic agent-mediated elimination of myeloid-derived suppressor cells. *Oncoimmunology* **6**, e1331807 (2017).
387. V. Fleming, *et al.*, Targeting Myeloid-Derived Suppressor Cells to Bypass Tumor-Induced Immunosuppression. *Front Immunol* **9**, 398 (2018).
388. J. Vincent, *et al.*, 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. *Cancer Res.* **70**, 3052–3061 (2010).
389. M. D. Patil, J. Bhaumik, S. Babykutty, U. C. Banerjee, D. Fukumura, Arginine dependence of tumor cells: targeting a chink in cancer's armor. *Oncogene* **35**, 4957–4972 (2016).
390. R. García-Navas, M. Munder, F. Mollinedo, Depletion of L-arginine induces autophagy as a cytoprotective response to endoplasmic reticulum stress in human T lymphocytes. *Autophagy* **8**, 1557–1576 (2012).
391. R. Geiger, *et al.*, L-Arginine Modulates T Cell Metabolism and Enhances Survival and Anti-tumor Activity. *Cell* **167**, 829-842.e13 (2016).
392. P. C. Rodríguez, A. C. Ochoa, Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunol. Rev.* **222**, 180–191 (2008).
393. T. L. Lam, *et al.*, Recombinant human arginase inhibits proliferation of human hepatocellular carcinoma by inducing cell cycle arrest. *Cancer Lett.* **277**, 91–100 (2009).
394. T.-L. Lam, *et al.*, Recombinant human arginase inhibits the in vitro and in vivo proliferation of human melanoma by inducing cell cycle arrest and apoptosis. *Pigment Cell Melanoma Res* **24**, 366–376 (2011).
395. A. K. M. Chow, *et al.*, Anti-tumor efficacy of a recombinant human arginase in human hepatocellular carcinoma. *Curr Cancer Drug Targets* **12**, 1233–1243 (2012).
396. L. Li, *et al.*, An Engineered Arginase FC Protein Inhibits Tumor Growth In Vitro and In Vivo. *Evid Based Complement Alternat Med* **2013**, 423129 (2013).
397. Z. Wang, *et al.*, Blocking autophagy enhanced cytotoxicity induced by recombinant human arginase in triple-negative breast cancer cells. *Cell Death Dis* **5**, e1563 (2014).
398. G. Agnello, S. E. Alters, D. G. Lowe, S. W. Rowlinson, Abstract 3964: Reducing systemic arginine with arginase (AEB1102) therapy does not suppress the immune response induced by anti-PD-1 and anti-PD-L1, and exerts an additive anti-tumor and synergistic survival benefit. *Cancer Res* **77**, 3964–3964 (2017).

399. G. Agnello, *et al.*, Abstract 869: Depletion of blood arginine with pegzilarginase (AEB1102) in combination with anti-PD-L1 increases tumor infiltration by immune cells and enhances antitumor activity. *Cancer Res* **78**, 869–869 (2018).
400. S.-L. Zhou, *et al.*, Tumor-Associated Neutrophils Recruit Macrophages and T-Regulatory Cells to Promote Progression of Hepatocellular Carcinoma and Resistance to Sorafenib. *Gastroenterology* **150**, 1646-1658.e17 (2016).
401. L. Corrales, *et al.*, Anaphylatoxin C5a creates a favorable microenvironment for lung cancer progression. *J. Immunol.* **189**, 4674–4683 (2012).
402. D. Ajona, *et al.*, A Combined PD-1/C5a Blockade Synergistically Protects against Lung Cancer Growth and Metastasis. *Cancer Discov* **7**, 694–703 (2017).
403. T. R. Medler, *et al.*, Complement C5a Fosters Squamous Carcinogenesis and Limits T Cell Response to Chemotherapy. *Cancer Cell* **34**, 561-578.e6 (2018).
404. O. Demaria, *et al.*, Characterization of anti-C5aR antibodies for specific Poster # B184 targeting of myeloid cells and neutrophils in the TME. 1.
405. E. J. Hillmer, H. Zhang, H. S. Li, S. S. Watowich, STAT3 signaling in immunity. *Cytokine Growth Factor Rev* **31**, 1–15 (2016).
406. H.-L. Wright, A. L. Cross, S. W. Edwards, R. J. Moots, Effects of IL-6 and IL-6 blockade on neutrophil function in vitro and in vivo. *Rheumatology (Oxford)* **53**, 1321–1331 (2014).
407. M. Kortylewski, *et al.*, Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity. *Nat. Med.* **11**, 1314–1321 (2005).
408. B. R. Rosborough, *et al.*, Cutting Edge: Flt3 Ligand Mediates STAT3-Independent Expansion but STAT3-Dependent Activation of Myeloid-Derived Suppressor Cells. *The Journal of Immunology* **192**, 3470–3473 (2014).
409. J. Zhou, *et al.*, Myeloid STAT3 promotes lung tumorigenesis by transforming tumor immunosurveillance into tumor-promoting inflammation. *Cancer Immunol Res*, canimm.0073.2016 (2017).
410. Y.-L. Su, S. Banerjee, S. V. White, M. Kortylewski, STAT3 in Tumor-Associated Myeloid Cells: Multitasking to Disrupt Immunity. *Int J Mol Sci* **19** (2018).
411. M. Kujawski, *et al.*, Stat3 mediates myeloid cell-dependent tumor angiogenesis in mice. *J. Clin. Invest.* **118**, 3367–3377 (2008).
412. F. Hossain, *et al.*, Inhibition of Fatty Acid Oxidation Modulates Immunosuppressive Functions of Myeloid-Derived Suppressor Cells and Enhances Cancer Therapies. *Cancer Immunol Res* **3**, 1236–1247 (2015).
413. A. A. Al-Khami, *et al.*, Exogenous lipid uptake induces metabolic and functional reprogramming of tumor-associated myeloid-derived suppressor cells. *Oncoimmunology* **6**, e1344804 (2017).
414. M. Kortylewski, D. Moreira, Myeloid cells as a target for oligonucleotide therapeutics: turning obstacles into opportunities. *Cancer Immunol. Immunother.* **66**, 979–988 (2017).
415. F. Veglia, *et al.*, Fatty acid transport protein 2 reprograms neutrophils in cancer. *Nature* **569**, 73–78 (2019).

416. J. Park, *et al.*, Cancer cells induce metastasis-supporting neutrophil extracellular DNA traps. *Sci Transl Med* **8**, 361ra138 (2016).
417. S. Najmeh, *et al.*, Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells via β 1-integrin mediated interactions. *Int. J. Cancer* **140**, 2321–2330 (2017).
418. P. Boross, *et al.*, IgA EGFR antibodies mediate tumour killing in vivo. *EMBO Molecular Medicine* **5**, 1213–1226 (2013).
419. S. Meyer, *et al.*, Improved in vivo anti-tumor effects of IgA-Her2 antibodies through half-life extension and serum exposure enhancement by FcRn targeting. *MABs* **8**, 87–98 (2016).
420. C. R. Reczek, N. S. Chandel, The Two Faces of Reactive Oxygen Species in Cancer. *Annual Review of Cancer Biology* **1**, 79–98 (2017).
421. S. M. Hatfield, *et al.*, Immunological mechanisms of the antitumor effects of supplemental oxygenation. *Sci Transl Med* **7**, 277ra30 (2015).
422. P. Jayaprakash, *et al.*, Targeted hypoxia reduction restores T cell infiltration and sensitizes prostate cancer to immunotherapy. *J. Clin. Invest.* **128**, 5137–5149 (2018).
423. C. Neuzillet, *et al.*, Targeting the TGF β pathway for cancer therapy. *Pharmacol. Ther.* **147**, 22–31 (2015).
424. K. Ganesh, J. Massagué, TGF- β Inhibition and Immunotherapy: Checkmate. *Immunity* **48**, 626–628 (2018).
425. S. Mariathasan, *et al.*, TGF β attenuates tumour response to PD-L1 blockade by contributing to exclusion of T cells. *Nature* **554**, 544–548 (2018).
426. D. V. F. Tauriello, *et al.*, TGF β drives immune evasion in genetically reconstituted colon cancer metastasis. *Nature* **554**, 538–543 (2018).
427. R. J. Akhurst, Targeting TGF- β Signaling for Therapeutic Gain. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **9**, a022301 (2017).
428. J. Rodon, *et al.*, First-in-human dose study of the novel transforming growth factor- β receptor I kinase inhibitor LY2157299 monohydrate in patients with advanced cancer and glioma. *Clin. Cancer Res.* **21**, 553–560 (2015).
429. Y.-K. Kang, *et al.*, Safety and Tolerability of Bintrafusp Alfa, a Bifunctional Fusion Protein Targeting TGF β and PD-L1, in Asian Patients with Pretreated Recurrent or Refractory Gastric Cancer. *Clin. Cancer Res.* **26**, 3202–3210 (2020).
430. B. Favier, Regulation of neutrophil functions through inhibitory receptors: an emerging paradigm in health and disease. *Immunol. Rev.* **273**, 140–155 (2016).
431. H. Läubli, *et al.*, Engagement of myelomonocytic Siglecs by tumor-associated ligands modulates the innate immune response to cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 14211–14216 (2014).
432. A. Blaisdell, *et al.*, Neutrophils Oppose Uterine Epithelial Carcinogenesis via Debridement of Hypoxic Tumor Cells. *Cancer Cell* **28**, 785–799 (2015).
433. S. Badrnya, L. M. Butler, C. Söderberg-Naucler, I. Volf, A. Assinger, Platelets directly enhance neutrophil transmigration in response to oxidised low-density lipoprotein. *Thromb. Haemost.* **108**, 719–729 (2012).

434. K. Mahiddine, *et al.*, Relief of tumor hypoxia unleashes the tumoricidal potential of neutrophils. *J Clin Invest* **130**, 389–403 (2020).
435. R. Zilionis, *et al.*, Single-Cell Transcriptomics of Human and Mouse Lung Cancers Reveals Conserved Myeloid Populations across Individuals and Species. *Immunity* **50**, 1317-1334.e10 (2019).
436. K. Boggio, *et al.*, Interleukin 12–mediated Prevention of Spontaneous Mammary Adenocarcinomas in Two Lines of Her-2/neu Transgenic Mice. *J Exp Med* **188**, 589–596 (1998).
437. K. Boggio, *et al.*, Interleukin 12–mediated Prevention of Spontaneous Mammary Adenocarcinomas in Two Lines of Her-2/neu Transgenic Mice. *J Exp Med* **188**, 589–596 (1998).
438. G. Boivin, *et al.*, Durable and controlled depletion of neutrophils in mice. *Nat Commun* **11**, 2762 (2020).
439. D. S. Abi Abdallah, C. E. Egan, B. A. Butcher, E. Y. Denkers, Mouse neutrophils are professional antigen-presenting cells programmed to instruct Th1 and Th17 T-cell differentiation. *Int. Immunol.* **23**, 317–326 (2011).
440. C. Ferreri, *et al.*, Fatty Acids in Membranes as Homeostatic, Metabolic and Nutritional Biomarkers: Recent Advancements in Analytics and Diagnostics. *Diagnostics (Basel)* **7** (2016).
441. L. Spinelli, S. Carpentier, F. Montañana Sanchis, M. Dalod, T.-P. Vu Manh, BubbleGUM: automatic extraction of phenotype molecular signatures and comprehensive visualization of multiple Gene Set Enrichment Analyses. *BMC Genomics* **16**, 814 (2015).
442. W. Hugo, *et al.*, Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma. *Cell* **165**, 35–44 (2016).
443. N. Riaz, *et al.*, Tumor and Microenvironment Evolution during Immunotherapy with Nivolumab. *Cell* **171**, 934-949.e16 (2017).
444. H. Dillekås, M. S. Rogers, O. Straume, Are 90% of deaths from cancer caused by metastases? *Cancer Med* **8**, 5574–5576 (2019).
445. M. D. Wellenstein, *et al.*, Loss of p53 triggers WNT-dependent systemic inflammation to drive breast cancer metastasis. *Nature* **572**, 538–542 (2019).
446. T. Lisman, Platelet–neutrophil interactions as drivers of inflammatory and thrombotic disease. *Cell Tissue Res* **371**, 567–576 (2018).
447. S. L. Wolock, R. Lopez, A. M. Klein, Scrublet: Computational Identification of Cell Doublets in Single-Cell Transcriptomic Data. *Cell Syst* **8**, 281-291.e9 (2019).
448. M. M. Kulkarni, Digital multiplexed gene expression analysis using the NanoString nCounter system. *Curr Protoc Mol Biol* **Chapter 25**, Unit25B.10 (2011).
449. S. Kaliki, C. L. Shields, Uveal melanoma: relatively rare but deadly cancer. *Eye* **31**, 241–257 (2017).
450. S. Rahman, *et al.*, Low-density granulocytes activate T cells and demonstrate a non-suppressive role in systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* **78**, 957–966 (2019).

451. E. Villanueva, *et al.*, Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* **187**, 538–552 (2011).
452. C. Carmona-Rivera, W. Zhao, S. Yalavarthi, M. J. Kaplan, Neutrophil extracellular traps induce endothelial dysfunction in systemic lupus erythematosus through the activation of matrix metalloproteinase-2. *Ann Rheum Dis* **74**, 1417–1424 (2015).