Rôle du récepteur de chimiokines CCR2 dans la dynamique des lymphocytes T régulateurs et monocytes/macrophages en réponse aux thérapies antitumorales

Pierre-Louis Loyher

▶ **To cite this version:**

Pierre-Louis Loyher. Rôle du récepteur de chimiokines CCR2 dans la dynamique des lymphocytes T régulateurs et monocytes/macrophages en réponse aux thérapies antitumorales. Immunologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066010 . tel-01736944v2

HAL Id: tel-01736944
https://theses.hal.science/tel-01736944v2

Submitted on 27 Apr 2018

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

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

Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale ED515 : Complexité du vivant

Rôle du récepteur de chimiokines CCR2 dans la dynamique des lymphocytes T régulateurs et monocytes/macrophages en réponse aux thérapies antitumorales

Présentée par

Pierre-Louis Loyher

Thèse de doctorat

Spécialité : Immunologie

Dirigée par Dr Alexandre Boissonnas

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

Présentée et soutenue publiquement le 17 mars 2017

Devant un jury composé de :

Dr Alexandre Boissonnas - Directeur de thèse

Dr Emmanuel Donnadieu - Rapporteur

Pr Nathalie Chaput - Rapporteur

Dr Marie-Caroline Dieu-Nosjean - Examinateur

Dr Sebastian Amigorena – Examinateur

Dr Béhazine Combadière - Président

Remerciements

Je remercie tout d'abord les membres du jury qui m'ont fait l'honneur de s'intéresser à mes travaux et ont accepté de l'évaluer.

Je remercie très sincèrement Alexandre Boissonnas d'avoir dirigé ma thèse. Merci pour ta confiance, pour ta patience, pour ta disponibilité, pour tout ce que tu m'as inculqué et de m'avoir sollicité pour différents projets. Ces 3 ans et demi avec toi n'ont pas été de tout repos (surtout pour toi).

Je tiens à remercier le directeur de l'équipe Christophe Combadière de m'avoir accueilli et offert cette opportunité. Merci en particulier pour tes précieux conseils scientifiques et pour ton humour.

Je tiens à remercier chaleureusement Philipe Deterre d'avoir été une oreille attentive pendant tout mon séjour au laboratoire.

Je remercie particulièrement tous les membres et anciens membres de l'équipe. Merci Pauline de m'avoir beaucoup épaulé tout au long de mon travail. Merci à Camille, Aida, Floriane, Sandrine, Patricia (ma maman de labo), Mathieu, Fabrice, Ludovic, Benjamin et Lucie pour votre soutien durant ma thèse.

Je remercie également tous ceux avec qui j'ai pu collaborer pour réaliser ce travail, en particulier, Juliette Rochefort, Michele Mondini, Nadege Bercovici et Ariel Savina.

Merci aux autres membres ou anciens membres du CIMI-Paris pour l'aide qu'ils m'ont apporté et pour tous ces bons moments.

Pour finir je tiens à remercier mes amis et ma famille pour m'avoir soutenu et par-dessus tout, mes parents Jeanne et Alain.

Résumé des travaux de thèse

Une forte production de la chimiokine CCL2 par les cellules malignes et les cellules stromales a été démontrée dans la plupart des cancers humains. Ainsi, l'axe chimiokinique CCR2/CCL2 est un important marqueur du développement des cancers ; ce même axe est associé à la récurrence de tumeurs après thérapie anticancéreuses. Les macrophages associés aux tumeurs (TAM) et les lymphocytes T régulateurs (Treg) ont des capacités immunosuppressives robustes et contribue à la croissance tumorale. Durant cette thèse, je me suis intéressé à la fonction de l'expression du récepteur de chimiokine CCR2 par ces cellules dans le contexte de thérapies anticancéreuses.

Nous avons montré que le récepteur de chimiokines CCR2 contrôle la migration des Treg en contexte tumoral, chez l'homme et la souris, et que son expression par les Treg peut servir de biomarqueur de la réponse à la chimiothérapie. Notre étude indique une nouvelle fonction de CCR2 et définie un nouveau sous-type de Treg impliqué dans la régulation de l'immunité antitumorale.

En parallèle, nous avons pu mettre en évidence que les métastases pulmonaire sont composées à la fois de macrophages résident du tissu et de macrophages recrutés via l'axe CCR2. La présence de macrophages résidents au sein des tumeurs pourrait contribuer à l'hétérogénéité des microenvironnements de diffèrent type de tumeurs. Le récepteur CCR2 est important pour le la phase de rechute après chimiothérapie, indiquant un rôle limité des macrophages résidents dans ce phénomène. De plus, nous avons montré que le VEGF joue un rôle direct dans la survie des TAM. Ainsi, la combinaison de la chimiothérapie avec un anticorps anti-VEGF cible simultanément les TAM résidents et recrutés et permet d'augmenter l'efficacité de la chimiothérapie.

Finalement, nous avons montré que l'axe CCR2/CCL2 est négativement impliqué dans la réponse à la radiothérapie anticancéreuse en favorisant le recrutement de Treg et de TAM.

Ces travaux mettent en évidence en rôle crucial de l'axe CCR2 dans la colocalisation des Treg et des TAM en réponse aux thérapies anticancéreuse ce qui pourrait contribuer à la mise en place des réseaux immunosuppressifs au sein des tumeurs. Nos résultats apportent une meilleure compréhension des mécanismes immunitaires impliqués dans la résistance aux thérapies anticancéreuses.

Abstract

Malignant and stromal cells are strong producer of the chemokine CCL2 in most human cancers. The chemokine axis CCR2/CCL2 is thus a key marker of cancer development, but is also associated with relapse following therapy. Tumour associated macrophages (TAM) and regulatory T cells (Treg) display robust immunosuppressive capacities and contribute to tumour growth. My thesis work focused on the function of the expression of the chemokine receptor CCR2 by these cell types in the context of anticancer therapies.

We have shown that CCR2 controls the migration of Treg in tumoral context, in both human and mice, and that the expression of this receptor by Treg could serve as a biomarker of the response to chemotherapy. Our study indicate a novel function of CCR2, defining at the same time a new Treg subset implicated in the regulation of antitumor immunity.

We have also demonstrated that pulmonary metastases are composed of both tissue resident and recruited macrophages. The presence of resident macrophages within tumours could contribute to the heterogeneity of the microenvironment of different tumour types. CCR2 is largely implicated in the relapse phase following chemotherapy, indicating a limited role for resident macrophages in this phenomenon. Meanwhile, we have demonstrated that VEGF plays a direct role in TAM survival. The combination of chemotherapy with an anti-VEGF antibody targets both resident and recruited TAM, thereby enhancing the efficacy of chemotherapy.

Finally, we have shown that the CCR2/CCL2 axis is implicated in the response to radiotherapy by enhancing the recruitment of both Treg and TAM.

This work provides evidences for a central role of the CCR2/CCL2 axis in mediating Treg and TAM co-localization in response to anticancer therapy, this axis could also contribute to establishment of immunosuppressive networks in tumours. Our results provide a better understanding of the immune mechanism implicated in resistance to anticancer therapies.

Table des matières

Remerciements 3
Résumé des travaux de thèse 5
Abstract 6
Liste d'abbreviations 10
Avant-propos 12
Introduction 15
1. L'immunité antitumorale 15
1.1. Les évidences de la réponse antitumorale 15
1.2. Les antigènes tumoraux 15
1.3. Les différentes étapes d'activation des effecteurs antitumoraux 17
1.3.1. La présentation d'antigènes par les APCs sur le site tumoral 21
1.4. Rôle de la spécificité antigénique dans le recrutement et la rétention des cellules T dans les tumeurs 23
1.5. Les mécanismes d'élimination tumorale par les cellules effectrices 25
1.5.1. Rôle des lymphocytes $CD4^+$ dans le contrôle tumoral 25
1.5.2. L'élimination des tumeurs par les lymphocytes $CD8^+$ 25
1.5.3. L'élimination des tumeurs par les lymphocytes NK 27
1.5.4. L'élimination indirecte des tumeurs 27
2. L'échappement tumoral à la réponse immunitaire 30
2.1. Contrôle de l'infiltration des lymphocytes T dans les tumeurs par les vaisseaux 30
2.2. Contrôle de la migration intratumorale des lymphocytes T 32
2.3. L'immunosubversion dans les cancers 34
2.3.1. Rôle des DC dans l'immunosuppression 35
2.3.2. Rôles des checkpoints immunologiques dans l'immunosuppression 36
2.3.3 Les lymphocytes T régulateurs 37
2.3.4 Les macrophages 42
2.3.5. Les monocytes 48
2.3.6. Les cellules myéloïdes suppressives (MDSC) 50
2.3.7. Les fonctions protumorales des macrophages 52
3. Impacts des thérapies conventionnelles sur la réponse antitumorales. 56
3.1. L'induction de l'immunité antitumorale par les thérapies anticancéreuses 56
3.2. Rôles protumoraux des macrophages et MDSC en réponse aux thérapies anticancéreuses 58
3.2.1. Rôle des macrophages et MDSC dans la réponse à la chimiothérapie 58
3.2.2. Rôles des macrophages et MDSC dans la réponse à la radiothérapie 61
4. L'axe chimiokinique CCR2/CCL2 62
4.1 Biologie de CCL2 et CCR2 62

4.2 L'axe CCR2/CCL2 comme cible thérapeutique contre les cancers 64
Objectifs de la thèse 68
Résultats 69
Article 1: « Immune surveillance of the lung by migrating tissue monocytes » 70
Article 2: «Anti-VEGF targets tissue-resident and recruited macrophage recovery to limit pulmonary metastasis relapse after chemotherapy» 76
Article 3: « CCR2 Influences T Regulatory Cell Migration to Tumors and Serves as a Biomarker of Cyclophosphamide Sensitivity » 83
Travaux collaboratifs « Rôle de CCR2 dans le co-recrutement de Treg et monocytes en réponse à la radiothérapie » 88
Conclusion générale et perspectives 95
Bibliographie 97

Liste d'abréviations

AM, 71 Macrophages alvéolaire
CCL2, 10 Chemokine ligand 2
CCR2, 10 C-C chemokine receptor 2
CD64, 39 Récepteur Fc-gamma de type 1
CFP, 25 Protéine fluorecente cyan
CRT, 53 Calréticuline
CSF-1, 41 Facteur stimulateur de colony 1
CSF-1R, 41 Recepteur au CSF-1
CTL, 12 Lymphocyte $CD8^+$ cytotoxique
CTLA4, 33 Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
DAMP, 53 Motifs moléculaires associés aux dégâts cellulaires
dLN, 15 Ganglions drainants la tumeur
ECFP, 71 Protéine fluorecente cyan améliorée
ECM, 30 Matrice extracellulaire
EGFP, 71 Protéine fluorecente verte améliorée
ET-1, 27 Endotheline 1
I.V, 72 Voie Intra-veineuse
IDO, 32 Indoleamine 2,3-dioxygénase
IFNγ, 23 Interferon gamma
IL, 24 Interleukine
iNOS, 58 Forme inductible de l'oxyde nitrique synthase
IVM, 22 Microscopie intravitale
LFA-1, 29 Lymphocyte function-associated antigen 1
LPS, 41 Lipopolysaccharide
MAMP, 53 Motifs moléculaires associés aux pathogènes
MCA, 12 3'- méthlylcholanthrène
MHCI, 13 Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
MHCII, 13 Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
M-MDSC, 46 Cellules myéloïdes suppressives monocytaires
MMPs, 50 Métalloprotéases matricielles
NK, 12 Natural killer
NKG2D, 12 Recepteur Natural Killer Group 2D
NKT, 12 Natural killer T
NOS2, 24 Oxyde nitrique synthase
OT1, 16 Lymphocyte T $CD8^+$ spécifique pour l'antigene OVA
OVA, 16 Ovalbumin
PD1, 33 Programmed cell death 1
PDL1, 33 PD1 ligand
PMN-MDSC, 47 Cellules myéloïdes suppressive polymorphonuléaires
PRR, 39 Récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires
TAAs, 12 Antigènes associés aux tumeurs
TAM, 5 Macrophages associé aux tumeurs
TCR, 13 Récepteur des cellules T
TGF-b, 40 Facteur de croissance transformant bêta
Th, 12 Lymphocyte $CD4^+$ conventionels
TLR4, 54 Récepteurs de type toll 4
TME, 9 Microenvironment tumoral
TNFα, 23 Facteur de nécrose tumorale alpha
TRAIL, 24 TNF-related apoptosis-inducing ligand
Treg, 5 Lymphocytes T regulateurs
VADS, 62 Voies aérodigestives supérieures
VEGF, 5 Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VEGFR, 51 Recepteur au VEGF
YFP, 25 Proteine fluorescente jaune

Avant-propos

Les cellules cancéreuses évoluent dans un environnement hostile mais développent des stratégies pour s'adapter et survivre. Certaines propriétés biologiques permettent d'expliquer la complexité des cancers : une signalisation prolifération soutenue, l'insensibilité aux signaux antiprolifératifs, la résistance à l'apoptose, la reprogrammation du métabolisme énergétique ainsi que l'induction de l'angiogenèse, de l'invasion et de la capacité à métastaser. L'instabilité du génome des cellules tumorales génère une diversité génétique permettant d'acquérir toutes ces propriétés biologiques. Au cours des dernières décennies, de nouvelles propriétés cancéreuses ont émergé dans les études: l'échappement des tumeurs à la destruction par le système immunitaire et la capacité à induire l'inflammation. Le potentiel malin est intrinsèquement lié à la capacité des tumeurs à contourner les défenses immunitaires et à bloquer l'action des effecteurs antitumoraux. L'inflammation générée durant de développement des cancers contribue au recrutement de protagonistes immunitaires pro-tumoraux. Ces derniers aspects feront plus particulièrement l'objet de ma thèse.

Le système immunitaire est capable de reconnaitre et d'éliminer les tumeurs naissantes ou établies via le processus d'immunosurveillance. Les cellules cancéreuses expriment très souvent des antigènes permettant une discrimination efficace par le système immunitaire. Une série d'étapes distinctes est nécessaire pour que ce rejet ait lieu. Les mécanismes immunologiques permettant l'élimination des tumeurs peuvent varier et sont dépendants de l'action synergique de multiples types cellulaires.

En contrepartie, la pression immunitaire favorise une sélection des variants tumoraux qui échappent à l'immunosuveillance, ce processus est appelé « Immunoediting ».

En plus de l'Immunoediting, les tumeurs bénéficient de différents composants immunitaires qui contribuent à leur développement, on parle alors de « l'Immunosubversion ».

Les tumeurs solides sont constituées de cellules tumorales mais aussi d'un stroma riche en cellules immunitaires qui définissent le microenvironnement tumoral (TME). L'abondance de macrophages et de cellules T régulatrices (Treg) au sein du TME est, notamment, un facteur clé inhibant les réponses antitumorales. Ces populations représentent des cibles préférentielles de l'immunosubversion. Les macrophages peuvent avoir des activités protumorales directes et augmenter le développement des cancers.

Idéalement, une thérapie anti-cancéreuse efficace consisterait à contourner à la fois l'immunoediting et l'immunosubversion.

Les chimiothérapies et radiothérapies sont très rarement curatives lorsqu'elles sont utilisées pour le traitement de cancers avancés ou métastatiques. De nombreuses études mettent en évidence que le système immunitaire joue un rôle majeur dans la réponse à ces thérapies. Mon projet de thèse a pour but de mieux comprendre l'impact des thérapies anti-cancéreuses sur les compartiments de macrophages et de Treg. Une meilleure compréhension de la contribution des différents protagonistes immunitaires à la réponse aux thérapies conventionnelles permettra de développer de nouvelles stratégies ou combinaisons thérapeutiques.

Les thérapies basées sur l'utilisation du système immunitaire ou « Immunothérapies » ont un fort succès dans la lutte contre les cancers hématologiques mais sont plus difficiles à développer dans le contexte de tumeurs solides. Le TME pourrait être la cause de l'échec de ces thérapies, puisque celui-ci semble agir comme une niche protectrice des tumeurs.

Les chimiokines sont de petites protéines orchestrant la migration des cellules immunitaires en conditions physiologiques ou pathologiques. Elles sont produites au sein des tumeurs où elles jouent des rôles majeurs dans le recrutement préférentiel de cellules pro- ou antitumorales et dans la mise en place du TME. L'interaction entre la chimiokine CCL2 et son récepteur CCR2 (axe chimiokinique CCR2/CCL2) a été associée à de multiples fonctions protumorales et pro-métastatiques, notamment via le recrutement de monocytes/macrophages dans le TME.

Je me suis particulièrement intéressé au rôle de cet axe dans le recrutement de cellules immunosuppressives ou protumorales en réponse aux thérapies anti-cancéreuses. Dans ce manuscrit introduisant mon travail de thèse, nous discuterons des différentes étapes nécessaires à la mise en place d'une réponse antitumorale spécifique, dépendante des lymphocytes T. Dans le deuxième chapitre, nous détaillerons les différentes stratégies que les tumeurs peuvent utiliser afin d'échapper à cette réponse. Enfin, nous nous intéresserons à l'impacts des chimio- et radiothérapie sur la réponse antitumorale ainsi que le rôle des macrophages et de l'axe CCR2/CCL2 dans les phénomènes de résistance à ces thérapies.

Introduction

1. L'immunité antitumorale

1.1. Les évidences de la réponse antitumorale

L'implication du système immunitaire dans le contrôle des tumeurs a été mise en évidence grâce à l'utilisation de modèles murins. Ainsi, les souris déficientes pour les compartiments cellulaire αβT, γϱT, B ou Natural killer T (NKT) présentent une sensibilité accrue aux cancers induits par l'agent carcinogène 3'- méthlylcholanthrène (MCA)(Shinkai et al., 1992; Smyth et al., 2001). Les souris traitées avec un anticorps éliminant les « natural killer » (NK) ou NKT sont également plus suceptibles de développer des cancers induits par MCA. Les altérations de la voie IFNγ (Street et al., 2002), de la voie de reconnaissance NKG2D (Bauer et al., 1999) ou de la voie cytolytique perforine (van den Broek et al., 1996) sont associées à une apparition plus précoce et un développement augmenté de tumeurs solides induites ou spontanées. Les lymphocytes $CD8^+$ cytotoxiques (CTL), $CD4^+$ helpers (Th) et NK semblent donc jouer un rôle central dans les réponses antitumorales, celles-ci peuvent reconnaitre les tumeurs et potentiellement les détruire. D'autres expériences précliniques ont pu montrer qu'un compartiment lymphocytaire intact pouvait agir sur les tumeurs et modifier leur immunogénicité. Dans les expériences du groupe de Schreiber, la transplantation de tumeurs dérivées d'hôtes déplétés en lymphocytes T $CD4^+$ ou $CD8^+$ dans un hôte immunocompétent induit un rejet tumoral, ce qui n'est pas le cas de tumeurs issues de souris immunocompétentes (Shankaran et al., 2001). Ceci fut la première démonstration que les tumeurs provenant d'hôtes immunodéficients sont plus immunogéniques que des tumeurs dérivées d'hôtes immunocompétents. Ainsi, en détruisant les cellules exprimant fortement un antigène spécifique de la tumeur, le système immunitaire adaptatif est capable de sélectionner naturellement les cellules tumorales exprimant faiblement ou pas cet antigène spécifique par processus appelé « immunoediting ».

1.2. Les antigènes tumoraux

Les modifications néoplasiques du soi peuvent générer des antigènes associés aux tumeurs (TAAs). Les TAAs peuvent être formés soit à partir de protéines non-mutées mais surexprimées par rapport aux tissus normaux soit à partir de peptides complètements absents du génome humain (Néoantigènes). Ces néoantigènes sont créés à partir de nouvelles séquences protéiques

dérivées d'altérations de l'ADN spécifiques des tumeurs ou issus de génomes viraux dans le cas de tumeurs induites par les virus **(Figure 1)**.

La réponse immunitaire peut dépendre de la nature des TAAs reconnus par les lymphocytes T. Le transfert adoptif de lymphocytes T spécifiques de la tumeur peut induire un rejet tumoral, à la fois dans les modèles murins et chez les patients atteints notamment de mélanomes (Rosenberg and Restifo, 2015). De plus, la présence de lymphocytes infiltrant la tumeur est associée à une augmentation de la survie dans différents types de tumeurs humaines (Galon et al., 2006). La spécificité relative pour les antigènes de soi par rapport aux néoantigènes est difficile à évaluer et varie probablement entre différents patients et différents types de tumeurs. Les cellules T ayant un TCR de forte affinité pour un antigène du soi ont plus de chance d'être éliminées par sélection négative dans le thymus. Les néoantigènes étant vue par le système immunitaire comme étranger devraient donc induire une meilleure réponse des cellules T.

L'expression de différents néoantigènes reconnus par les cellules T a été identifiée et ces TAAs ont été associés à la survie des patients (Lu et al., 2014) et à la réponse aux immunothérapies dans différents types de tumeurs (Vogelstein et al., 2013). La présence d'épitopes restreints aux complexes majeurs d'histocompatibilité de classe I et II (MHCI et MHCII) a été observée dans ces contextes, indiquant l'importance clinique de ces deux types de répertoires lymphocytaires (Schumacher and Schreiber, 2015). Malheureusement, le processus d'immunoediting peut également avoir lieu sur les néoantigènes, indiquant l'importance du ciblage d'un large répertoire d'antigènes (Verdegaal et al., 2016).

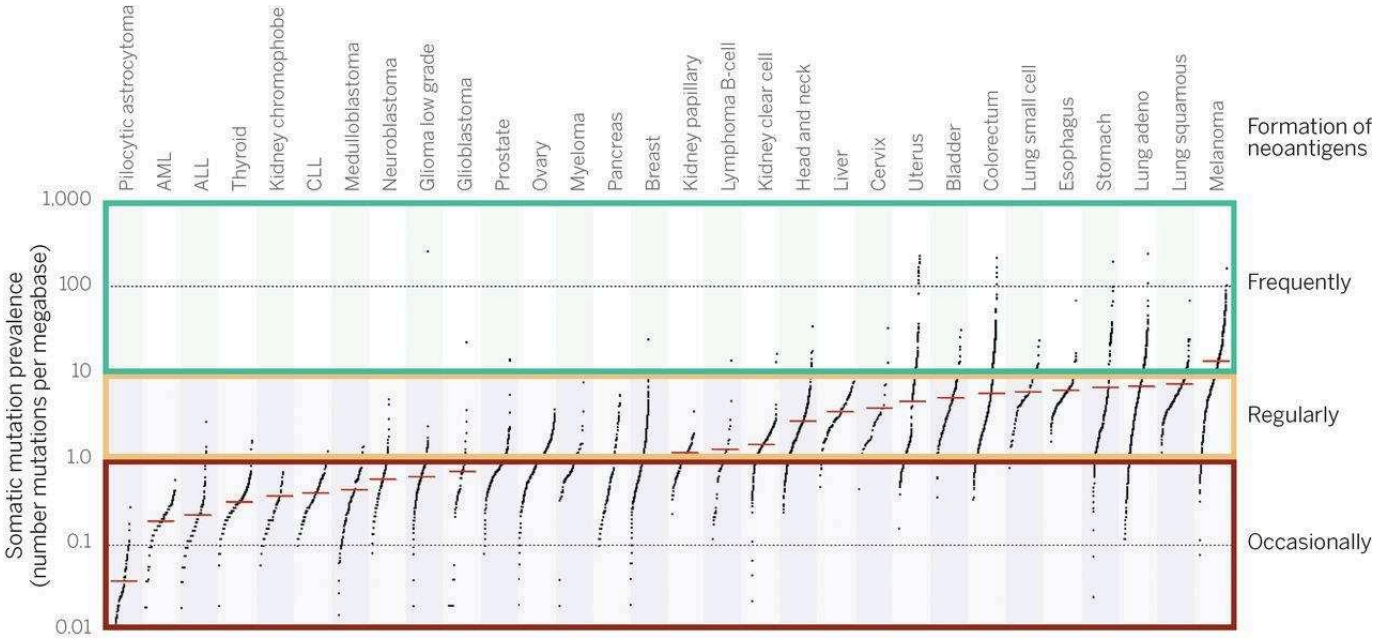


Figure 1: Estimation du répertoire de néoantigènes à partir de 7042 cancers humains.
Les données montrent le nombre de mutations somatiques dans des tumeurs individuelles et la probabilité de formation de néoantigènes pour chaque type de cancer (Alexandrov et al, 2013)

1.3. Les différentes étapes d'activation des effecteurs antitumoraux

Les études cliniques s'accordent sur le fait que les lymphocytes $CD4^+$ et $CD8^+$ sont capables de reconnaitre des épitopes tumoraux. Le prérequis pour l'initiation d'une réponse adaptative est la rencontre avec l'antigène permettant l'activation lymphocytaire. La plupart des tumeurs étant négatives pour les molécules de MHCII, il est peu probable d'observer une activation des lymphocytes T $CD4^+$ par les cellules tumorales elles-mêmes. De plus, dans les modèles de tumeurs transplantées exprimant MHCII, une activation via les cellules présentatrices d'antigènes (APC) semble nécessaire, car aucun rejet n'a lieu chez les hôtes déficients pour le MHCII (Perez-Diez et al., 2007). Les lymphocytes T $CD4^+$ sont néanmoins connus pour jouer un rôle important dans l'induction de la réponse humorale et pour la maturation de lymphocytes $CD8^+$ restreints au MHCI, leur expansion clonale ainsi que l'acquisition de leurs fonctions cytolytiques (Hung et al., 1998; Pardoll and Topalian, 1998). Les CTLs sont quant à eux considérés comme étant des cellules effectrices essentielles dans le ciblage et la destruction des cellules tumorales.

L'activation des lymphocytes $CD8^+$ peut être directe si la tumeur exprime le MHCI ou indirect après la capture d'antigènes tumoraux, l'apprêtement et la présentation par les APC. La présentation croisée d'antigènes tumoraux liés aux molécules de MHCI est un processus qui a souvent lieu dans les tumeurs et les ganglions drainant la tumeur (dLN) (Platzer et al., 2014). Ces deux sites jouent un rôle important dans l'activation et la prolifération de cellules T naïves. Les dLN sont considérés comme étant le premier site ou les antigènes tumoraux sont collectés et ont la capacité d'attirer les lymphocytes T naïfs.

La rencontre de cellules T avec les APC présentant l'antigène dépend d'une navigation des cellules T à l'intérieur du dLN, grâce à l'expression du récepteur de chimiokines CCR7. De plus, l'engagement spécifique de l'antigène par les lymphocytes $CD4^+$ et $CD8^+$ avec les cellules dendritiques (DC) induit un relargage du ligand du récepteur de chimiokines CCR5 permettant d'attirer des lymphocytes $CD8^+$ spécifiques de l'antigène naïf supplémentaires vers le conjugué (Castellino et al., 2006).

Une réponse immunitaire efficace dépend d'une séquence dynamique d'évènements caractérisés par l'induction d'un signal « stop » avec une interaction lymphocyte T/APC stable et dépendante d'ICAM1 dans les ganglions. La mobilité des cellules reprend pendant la phase d'expansion (Dustin, 2004) **(Figure2)**.

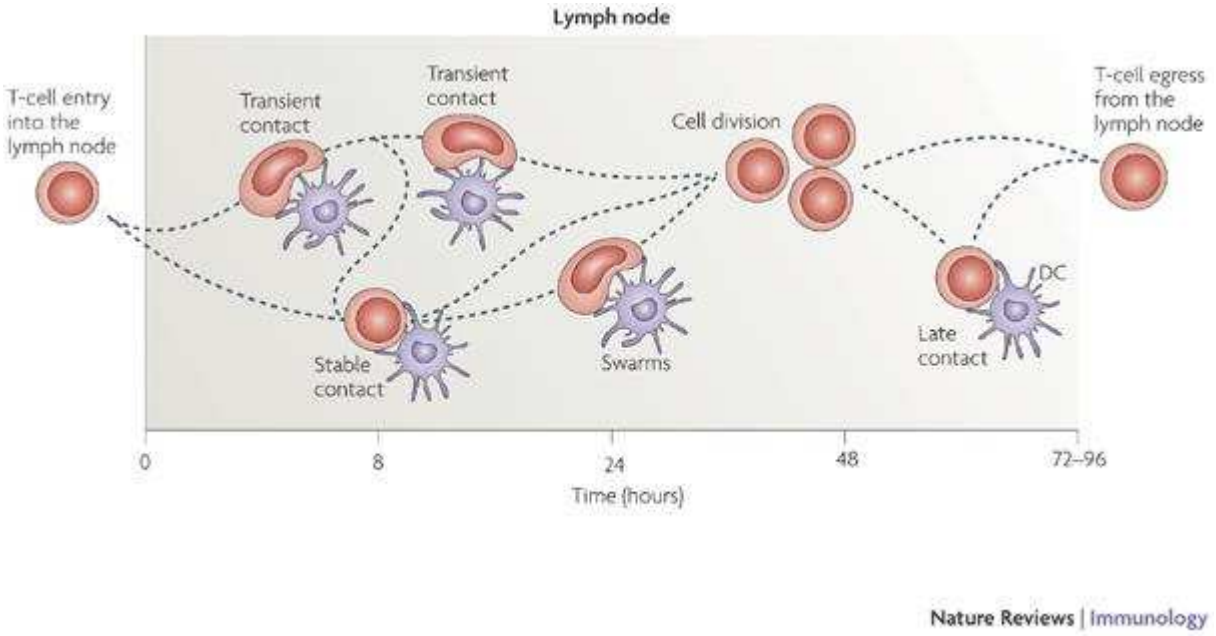


Figure 2: Séquence d'activation des lymphocytes T dans les ganglions.
Les lymphocytes T collectent et intègrent des signaux du TCR et de ligands de co-stimulations à chaque rencontre avec les DC. La reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes T peut avoir lieu par des interactions de courtes ou de longues durées avec les DC, avant l'expansion clonale et la sortie du ganglion. La collection de contacts lymphocytes T-DC qui ont lieu au cours du temps influence probablement la qualité et l'hétérogénéité de la réponse T (Bousso, 2008).

Une réduction de la mobilité peut aussi être observée dans les ganglions drainants les tumeurs EG7 exprimant l'Ovalbumine (OVA), après un transfert adoptif de cellules T $CD8^+$ naïves spécifiques de l'OVA (OT1). Dans ce modèle, le transfert adoptif induit un rejet tumoral, indiquant un environnement immunogène avec une forte expression de l'antigène tumoral (Scholer et al., 2008).

Le nombre d'APC, leur statut d'activation, ainsi que l'affinité peptide-MHC sont des facteurs déterminants pour une bonne activation lymphocytaire. Des agonistes de la voie CD40/CD40L en combinaison avec un ciblage spécifique de DEC205 sur les cellules dendritiques (DC) sont nécessaires pour conférés le signal « stop » (Hugues et al., 2007).

A l'inverse, une délétion génétique de la molécule d'adhésion ICAM1 bloque l'interaction des cellules T spécifiques de la tumeur avec les APC et est associée à un défaut de réponse mémoire aux antigènes tumoraux. Dans un contexte de tolérance, le signal « stop » est absent et seules des interactions courtes entre les lymphocytes T et les DC ont lieu, ce qui se traduit par une délétion clonale ou par l'anergie des lymphocytes T (Scholer et al., 2008).

La reconnaissance de l'antigène dans un contexte de co-stimulation approprié induit une activation et une différenciation des lymphocytes T en cellules effectrices (Teff). Ces cellules sortent du ganglion via les vaisseaux lymphatiques efférents et passent dans la circulation sanguine pour atteindre la tumeur et engager physiquement leurs cibles. Les Teff augmentent l'expression de récepteurs de chimiokines (CCR1, CCR2, CCR3, CCR5, CXCR3) tout en diminuant l'expression de CCR7 qui les retient dans le ganglion. Les chimiokines jouent des rôles majeurs dans le recrutement des effecteurs sur le site tumoral (Franciszkiewicz et al., 2012). L'expression de ligands du CXCR3 (CXCL9 et CXCL10) est notamment associée à une forte infiltration de CTL et de NK et à une meilleure survie de patients atteints de mélanomes (Mullins et al., 2004).

Dans le cadre des immunothérapies, des modifications génétiques qui augmentent l'expression de récepteurs spécifiques de chimiokines fortement exprimées au sein de la tumeur pourraient favoriser la migration des Teff vers le site tumoral (Whilding and Maher, 2015).

D'autre part, les DC matures peuvent sécréter des exosomes présentant des propriétés immunostimulatrices. Ces exosomes peuvent transférer des molécules d'adhésion telles que ICAM-1, les molécules de co-stimulation CD80 et CD86, des ligands activateurs de NKs et transférer des complexes peptide-MHC aux APCs in vivo (Pitt et al., 2014). Ainsi, des exosomes chargés avec des antigènes de la famille MAGE, exprimés par différents types de tumeurs,

induisent des réponses antitumorales T et NK chez des patients atteints de carcinomes pulmonaires (Besse et al., 2016) ou de mélanomes métastatiques (Andre et al., 2004) et pourraient potentiellement être utilisés comme des vaccins thérapeutiques.

En conclusion, l'induction de la réponse T antitumorale dépend d'une accumulation temporelle et qualitative de signaux.

1.3.1. La présentation d'antigènes par les APCs sur le site tumoral

Les processus d'activation des lymphocytes T, naïfs ou effecteurs, au sein de la tumeur elle-même sont moins connus. Différentes cellules infiltrant les tumeurs présentent des capacités phagocytaires et potentiellement de présentation antigénique. Les macrophages associés aux tumeurs (TAMs) sont très largement impliqués dans un affaiblissement de la réponse T antitumorale malgré leur expression de MHC II et leur activité phagocytaire, ce qui fera l'objet du deuxième chapitre. Différents sous-types de DC infiltrent les tumeurs. Les DC inflammatoires dérivés de monocytes présentent une forte capacité de capture d'antigènes tumoraux mais peu de capacité à stimuler la réponse T. Les DC $CD11b^+$ semblent être spécialisés dans l'induction de lymphocytes T $CD4^+$ effecteurs, notamment ceux secrétant de l'IL-17 (Th17), alors que les DC $CD103^+$ sont capables d'activer la réponse $CD8^+$ de manière robuste. Ces deux sous-types nécessitent, respectivement, les facteurs de transcription IRF4 et IRF8 pour leur développement (Laoui et al., 2016)(**Figure 3)**. Les DC $CD103^+$ sont capables d'engager physiquement les lymphocytes T dans les régions distales de la tumeur et dans une moindre mesure dans les régions proximales, afin d'induire un rejet tumoral (Broz et al., 2014). Plus récemment, ces mêmes sous-types d'APC ont été démontrés comme étant capables de transférer l'antigène de la tumeur vers les dLNs en migrant via le CCR7, renforçant l'importance des DC $CD103^+$ dans l'expansion des lymphocytes T (Roberts et al., 2016). L'expression de transcrits associés aux DC $CD103^+$ (Broz et al., 2014) ainsi qu'au CCR7 (Roberts et al., 2016) corrèle avec une meilleure infiltration lymphocytes T ainsi qu'une meilleure survie de patients atteints de mélanome.

L'activation des lymphocytes T sur le site tumoral peut également avoir lieu au sein de structures lymphoïdes tertiaires (TLS). Celles-ci peuvent se former en périphérie ou dans le stroma des tumeurs et sont composées d'un centre germinatif et d'une zone T riche en DC matures. Les TLS peuvent être associés à la production de plasmocytes produisant des anticorps reconnaissant des TAAs (Germain et al., 2014). Chez l'homme les TLS peuvent être quantifiés, notamment par la présence d'agrégats de lymphocytes T et de DC exprimant le marqueur Lamp (Lysome-associated menbrane glycoproteins)(Goc et al., 2014). Des TLS ont été observés dans de nombreux cancers (poumon, mélanome, colon, sein, ovaire, rein ou pancréas) et leur présence corrèle avec un pronostique favorable (Dieu-Nosjean et al., 2016). Les cellules T naïves peuvent directement infiltrer les TLS par des veinules à endothélium épais, sans passer par l'environnement immunosuppressif du TME (Martinet et al., 2011). Ainsi, les lymphocytes T de tumeurs avec une forte densité de TLS présentent une plus forte orientation vers un

phénotype de lymphocytes CD4$^+$ de type Th1 ou de lymphocytes CD8$^+$ mémoires (Goc et al., 2014)

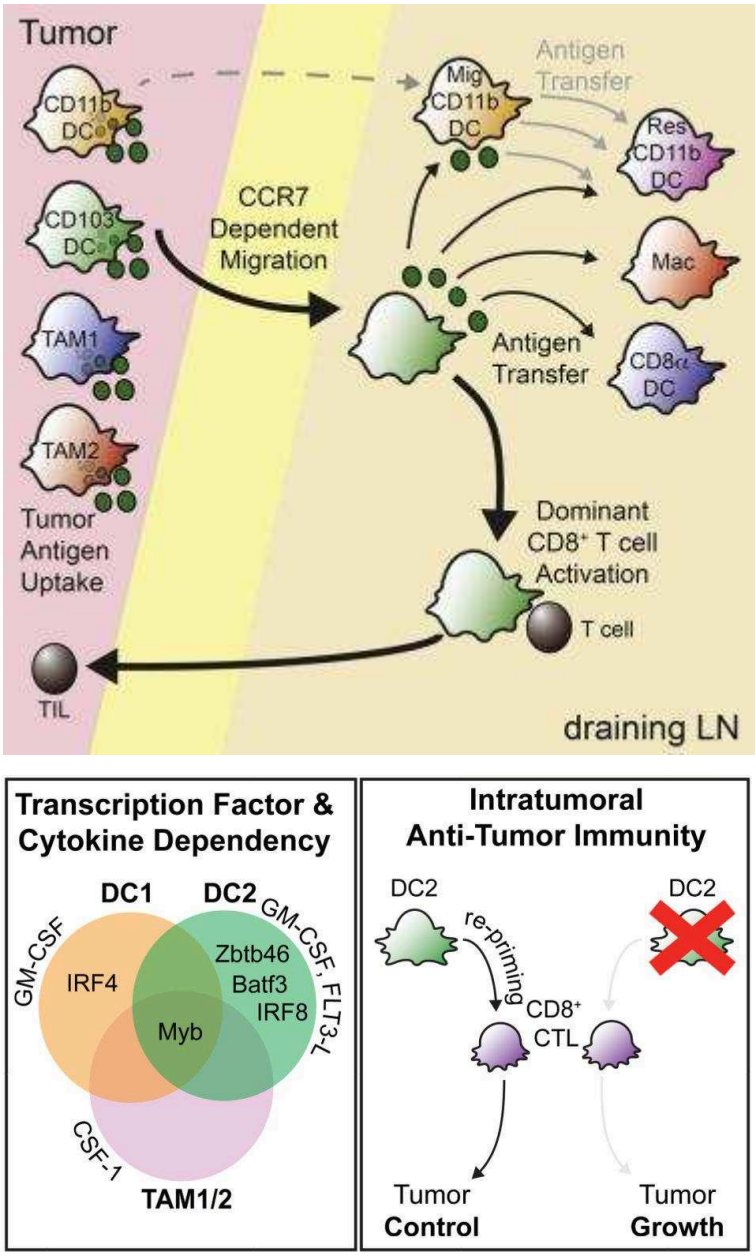


Figure 3 : Les DC CD103+ sont cruciaux pour l'activation des lymphocytes T CD8$^+$.
Les DC CD103$^+$ CD11b$^+$ ont besoin du récepteur de chimiokines CCR7 pour transférer les antigènes tumoraux dans les dLNs. (A) Résumé de l'importance des populations d'APC dans le transfert d'antigènes tumoraux dans les dLNs. (B) Les facteurs de transcription impliqués dans le développement des différents sous-types d'APC de la tumeur (gauche) et l'importance des DC CD103+ (DC2) dans l'activation des CTL et le rejet tumoral (Droite)(Broz et al 2014 ; Roberts et al 2016).

1.4. Rôle de la spécificité antigénique dans le recrutement et la rétention des cellules T dans les tumeurs

Les CTL activés sont capables d'infiltrer les tumeurs de façon non-spécifique mais s'accumulent préférentiellement dans les tumeurs exprimant l'antigène reconnu (Lavergne et al., 2004). Les lymphocytes T spécifiques de l'antigène pourraient être retenus dans le tissu via leur interaction stable avec les APC. Des études sur la dynamique de migration des CTL dans la tumeur ont confirmé cette hypothèse. Les CTL engagent des contacts stables et de longues durées avec les tumeurs exprimant l'antigène, alors que ces contacts sont beaucoup plus brefs et ne causent pas l'arrêt des CTL quand l'antigène n'est pas exprimé (Boissonnas et al., 2007; Mrass et al., 2006)**(Figure 4)**. L'engagement des CTL ne semble pas être dépendant de l'affinité du TCR puisque des CTL avec un TCR de faible affinité présentent les mêmes paramètres de migration (Boldajipour et al., 2016). La persistance de la prolifération des CTL dans la niche tumorale, même après leur expansion clonale dans les dLN, a été observée en temps réel (Boissonnas et al., 2007). Le blocage de la cytokine IL-15 réduit cette prolifération intra-tumorale, alors que la signalisation par la voie TCR/ZAP70 ne semble pas être impliquée (Boldajipour et al., 2016).

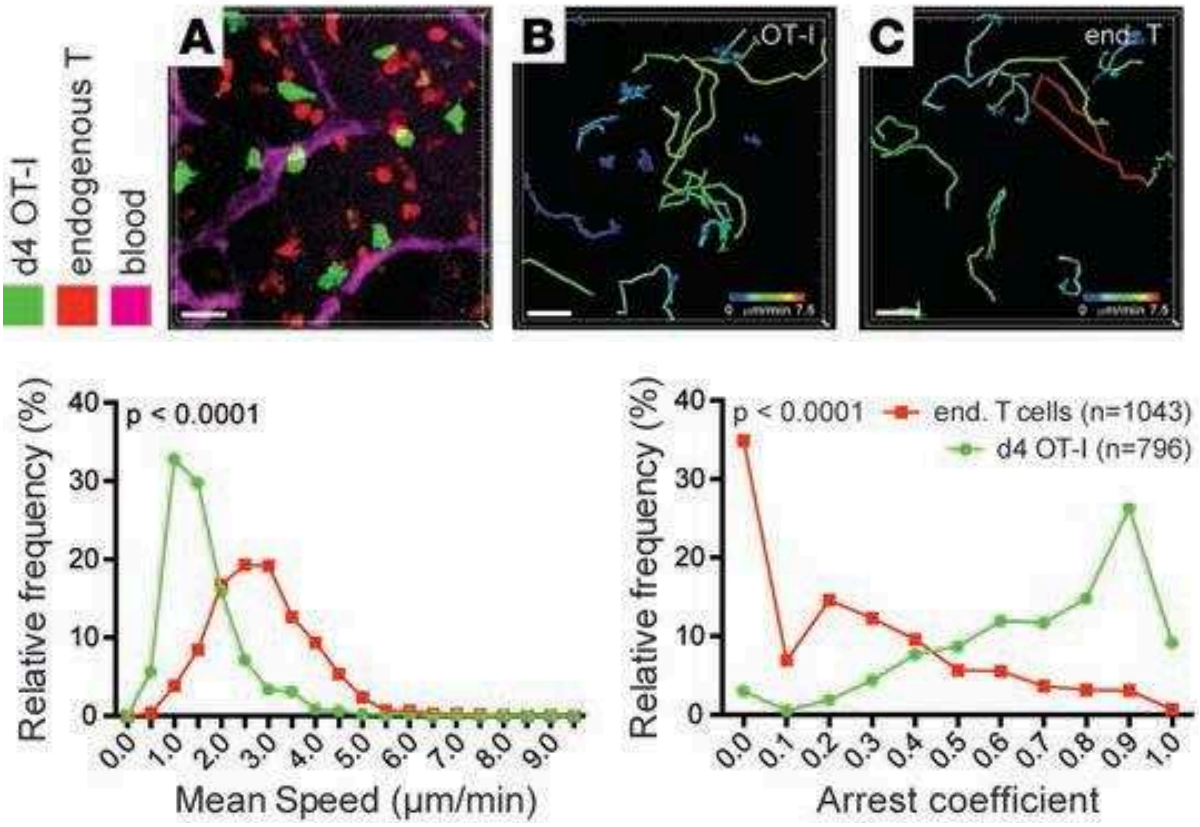


Figure 4 : Imagerie biphotonique intravital des cellules T dans les tumeurs mammaires spontanées PyMT-OVA. Images représentatives de la migration (2h) de cellules T spécifiques de l'antigène tumoral OVA (OT1) comparées aux cellules T endogènes après leur arrivée sur le site tumoral (haut). Analyse de Kolmogorox-Smirnov sur la distribution des vitesses de migration et des coefficients d'arrêt (bas) (Boldajipoor et al., 2016). La majorité des cellules OT1 ont des coefficients d'arrêt prononcés alors que les cellules T endogènes migrent plus rapidement et s'arrêtent moins souvent.

Les lymphocytes $CD4^+$ et $CD8^+$ sont très mobiles au sein du parenchyme tumoral et semblent migrer de manière aléatoire, ce qui exclurait un rôle central de gradients chimiokiniques dans le contrôle de la migration intra-tumorale. En revanche, après la reconnaissance de l'antigène, les cellules T polarisent le récepteur de chimiokines CCR5 vers la synapse immunitaire pour stabiliser l'interaction (Franciszkiewicz et al., 2009).

En conclusion, l'antigène favorise l'accumulation et la rétention des lymphocytes spécifiques dans la tumeur en augmentant leurs engagements avec les cellules tumorales.

1.5. Les mécanismes d'élimination tumorale par les cellules effectrices

1.5.1. Rôle des lymphocytes $CD4^+$ dans le contrôle tumoral

Malgré leur inefficacité à reconnaitre directement la plupart des cibles tumorales, les lymphocytes $CD4^+$ spécifiques de l'antigène peuvent jouer un rôle crucial dans l'orchestration de l'éradication des tumeurs. Les rôles des lymphocytes $CD4^+$ peuvent inclure la stimulation des lymphocytes $CD8^+$ durant les phases d'activation ou d'expansion, la production de cytokines importantes pour le maintien d'une réponse antitumorale sur le long terme et l'activation des lymphocytes B pour la production d'anticorps spécifiques d'antigènes tumoraux (Kumamoto et al., 2011).

L'élimination de tumeurs a d'ailleurs été démontrée comme dépendante de la coopération des lymphocytes $CD4^+$ et $CD8^+$ durant la phase d'induction et la phase effectrice (Brooks et al., 2010). Après reconnaissance de peptides antigéniques présentés par les APC, les lymphocytes $CD4^+$ produisent des cytokines de type Th1, pouvant inhiber directement la croissance tumorale (Corthay et al., 2005) ou induire une phase de senescence des cellules tumorales (Braumuller et al., 2013).

1.5.2. L'élimination des tumeurs par les lymphocytes $CD8^+$

Les CTL peuvent directement induire l'apoptose des cellules tumorales via deux voies principales; la voie cytotoxique (perforine et/ou granzyme) ou la voie de récepteur de mort (FasL/FasR). L'élimination de la tumeur par le biais d'un mécanisme cytotoxique direct nécessite la formation d'un contact stable entre les CTL et les cellules tumorales. La visualisation et l'analyse dynamique de cette interaction ont été assez bien mesurées in vitro depuis plusieurs décennies (Huppa et al., 2003). Les études d'imagerie intravitale (IVM) ont confirmé que les CTL peuvent engager de manière stable des cellules tumorales pendant des heures. In vivo, différents comportements de CTL ont été décrits : des interactions durables avec une seule cible, des interactions multiples mais proximales avec des cellules voisines, de multiples interactions distales et enfin des CTL migrants rapidement dans la masse tumorale sans faire d'interactions visibles (Boissonnas et al., 2007). Une collaboration entre plusieurs CTL a été démontrée dans le cadre de l'élimination de cellules infectées par des virus (Halle et

al., 2016). Une étude a confirmé que les engagements directs de CTL pourraient en effet contribuer à éliminer les tumeurs. Des cellules tumorales exprimant le biosenseur de transfert d'énergie par résonance de type Foster (FRET) sensible à la Caspase3 ont été utilisées pour suivre l'apoptose tumorale in vivo, en temps réel **(Figure 5)**. Ceci a été combiné à un transfert adoptif de CTL préalablement activés in vitro.

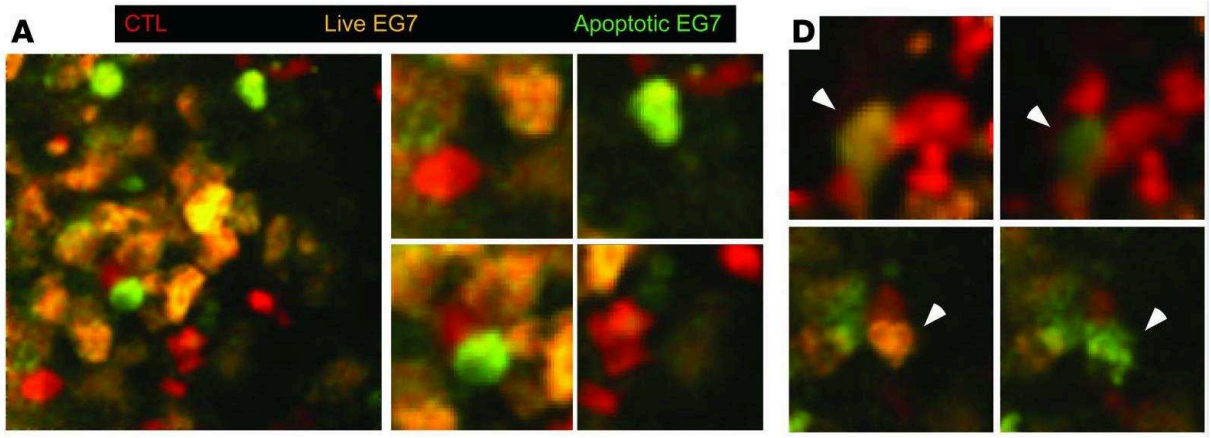


Figure 5 : Imagerie biphotonique intravital de tumeur EG7 exprimant l'OVA et un biosenseur d'apoptose (les cellules tumorales passent du jaune au vert quand elles entrent en apoptose) après transfert adoptif de CTL-OT1. (A) Les OT1 (Rouge) sont juxtaposés à des cellules tumorales en apoptose (Vert). (D) Exemples de cellules tumorales entrant en apoptose (Jaune à Vert) lors d'une interaction avec des CTL (Rouge) (Beart et al 2007).

Les résultats ont pu mettre en lumière une limitation à la réponse efficace des lymphocytes T anti-tumoraux. Le taux de mortalité évalué à partir de cette étude était extrêmement lent (moyenne de 6 heures pour la destruction d'une cible), ce qui suggère que le rapport entre les CTL et les cellules tumorales est crucial pour surmonter la prolifération des cellules tumorales et promouvoir un rejet. L'implication synergique d'autres effecteurs ne pouvait pas être exclue (Breart et al., 2008). In vitro un CTL est capable d'engager séquentiellement plusieurs cibles. (Wiedemann et al., 2006). Le récepteur CD44 est impliqué dans la stabilisation de la migration intra-tumorale des CTL. Ce récepteur pourrait jouer un rôle dans l'ancrage des protéines du cytosquelette à la membrane cellulaire de l'uropode. Ainsi une déficience en CD44 réduit les capacités des CTL à rencontrer leurs cibles et à rejeter la tumeur (Mrass et al., 2008).

Dans certains cas, la stimulation des CTL spécifiques de l'antigène par les cellules stromales et l'augmentation de la libération locale d'IFNγ et de TNFα se sont révélées nécessaires pour l'élimination tumorale (Briesemeister et al., 2011; Gerbitz et al., 2012; Zhang et al., 2008).

1.5.3. L'élimination des tumeurs par les lymphocytes NK

Les cellules de l'immunité innée «Natural Killer » (NK) ont la capacité directe de reconnaitre et détruire des cellules dangereuses pour l'hôte (cellules infectées, cancéreuses ou étrangères) et ont été impliquées dans l'immunosurveillance des tumeurs. De nombreuses études précliniques suggèrent que les NK ont un rôle anti-métastatique. Les NK expriment des récepteurs reconnaissant des ligands induits par le stress à la surface des cellules cibles tels que : NKG2D, NKp46, NKp30, NKp44, CD226. L'expression du récepteur Fc gamma de Type 3a (FcγRIIIa ou CD16) leur permet d'induire une cytotoxicité dépendante de la reconnaissance de la partie constante des anticorps de type IgG. Le granzyme B et la perforine sont très largement impliqués dans leur fonction d'élimination des tumeurs, mais les NK peuvent également utiliser des voies de récepteurs de mort comme FasL et TRAIL. Des cytokines pro-inflammatoires secrétées par les NK (IFN-γ, TNF, IL-6, GM-CSF and CCL5) pourraient également avoir des activités antitumorales directes tout en augmentant les réponses innées et adaptatives (Desbois et al., 2012).

Contrairement aux CTL qui nécessitent une reconnaissance d'antigène, les cellules NK nécessitent une expression de ligand NKG2D par les cellules tumorales (Diefenbach et al., 2000). Les cellules NK sont très mobiles dans les régions tumorales et établissent des contacts de courte durée avec leurs cibles, alors que les cellules T sont retenues dans ces régions par des contacts de longue durée. Le signal d'arrêt des CTL est associé à une élévation du calcium intracellulaire, les NK quant à eux ne subissent qu'un apport de calcium limité lors de la destruction d'une cellule tumorale. Cet afflux est tout de même suffisant pour l'exocytose de granules cytotoxiques (Deguine et al., 2010). Ainsi, des différences existent entre les mécanismes de destruction directs par les CTL et par les cellules NK, ces deux types cellulaires pourraient donc agir de manière synergique pendant le rejet de la tumeur.

1.5.4. L'élimination indirecte des tumeurs

Les cellules tumorales peuvent également être éliminées par un effet indirect dépendant de la sensibilisation du stroma (Spiotto et al., 2004; Zhang et al., 2008). La production d'IFNɣ et/ou de TNFα est impliquée dans ce phénomène. Cet effet indirect est au moins dépendant de la présentation de l'antigène par les APC et a été associé aux interactions CTL-APC (Schietinger et al., 2013). Il a été récemment démontré que la réponse bénéfique à un transfert adoptif de

CTLs dépend de l'expansion d'un sous-type de DC inflammatoires (Tip-DC) produisant du TNF et du NOS2. La différenciation de ces Tip-DC dépend de l'affinité du TCR pour le complexe MHC et de la voie de signalisation CD40/CD40L (Marigo et al., 2016). Ce phénomène pourrait permettre l'élimination de cellules tumorales qui n'expriment pas l'antigène reconnu par les CTL.

En revanche, en utilisant un mélange de tumeurs EL4 porteuses et non porteuses d'antigènes, Breart et al ont montré que les cellules T OTI éliminent spécifiquement les îlots tumoraux porteurs d'antigènes (Breart et al., 2008)(**Figure 6**). Ces résultats sont en accord avec le principe d'immunoediting proposé par Schreiber et suggèrent que l'élimination indirecte de variants tumoraux reste limitée.

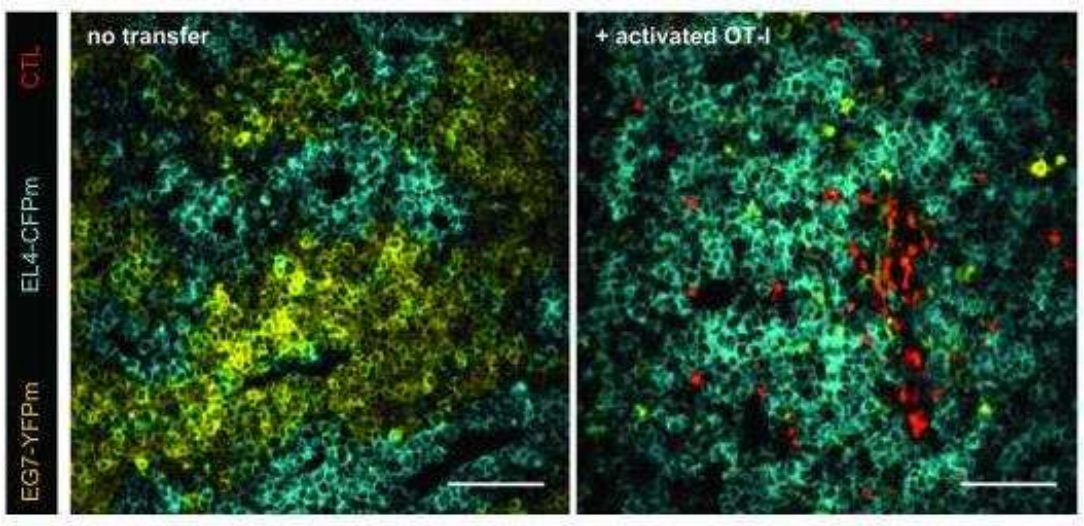


Figure 6 : Les souris injectées avec une mixture de tumeurs exprimant l'OVA (EG7-YFP) ou non (EL4-CFP) développent des tumeurs chimériques composées de patchs individuels d'EL4-CFP ou d'EG7-YFP. Le transfert de CTL-OT1 induit une disparition spécifique des patchs d'EG7-YFP alors que les EL4-CFP ne semblent pas être affectées (Beart et al 2007).

Une augmentation des lésions vasculaires a été observée et coïncide avec l'entrée précoce des lymphocytes T lors de la destruction tumorale. Néanmoins, aucune visualisation directe de la destruction des cellules endothéliales par les CTL n'a été imagée, même si la destruction des vaisseaux dépend de la reconnaissance de l'antigène par les CTL (Schietinger et al., 2013).

Des interactions dépendantes de l'antigène avec les TAM ont été clairement observées dans plusieurs modèles (Boldajipour et al., 2016; Mrass et al., 2006). Jusqu'à présent, aucune cytotoxicité directe contre ce sous-type stromal n'a été identifiée, mais les interactions peuvent conduire à une immunosuppression active des CTL comme nous le verrons plus loin.

En conclusion, ces observations plaident en faveur d'une contribution directe des CTL dans l'élimination tumorale via leurs interactions avec les cellules tumorales, mais il existe également

des preuves d'effet indirect. Outre la seule destruction des cellules tumorales, des réactions complexes, impliquant de multiples sous-types cellulaires, se produisent lors de l'élimination des tumeurs dans le TME.

2. L’échappement tumoral à la réponse immunitaire

Le recrutement de lymphocytes T activés sur le site tumoral dépend de l'expression de récepteurs de chimiokines appropriés pour migrer depuis les ganglions et extravaser à proximité de la tumeur. La localisation et la capacité des lymphocytes T à infiltrer les tumeurs ont un impact majeur sur leurs fonctions antitumorales. Ainsi, des études ont montré que la localisation intra-tumorale, la densité et l'activation des cellules T endogènes permettent d'établir un pronostique appelé "Immunoscore". Ce pronostique se base sur des biomarqueurs immunologiques et apporte des informations supplémentaires à la classification classique TNM (basées sur la tumeur primitive, la propagation aux ganglions lymphatiques et les métastases) permettant ainsi de mieux prédire l'évolution des cancers et la réponse aux thérapies (Galon et al., 2012). Ainsi, une forte infiltration de lymphocytes $CD8^+$ $CD45RO^+$ au centre des tumeurs est associée à une meilleure survie et moins de rechute chez les patients atteints de cancers colorectaux ou ovariens (Galon et al., 2006; Zhang et al., 2003).

En revanche, une forte présence de lymphocytes $CD8^+$ spécifiques d'antigène de la tumeur n'est pas suffisante pour totalement bloquer la progression tumorale, comme observé chez des patients atteints de mélanomes (Rosenberg et al., 2005). Après leur infiltration et avant d’avoir un effet bénéfique, les effecteurs anti-tumoraux doivent surmonter l'immunosuppression locale du TME. Dans ce chapitre nous nous intéresserons aux différents aspects moléculaires, cellulaires et architecturaux qui peuvent limiter la réponse antitumorale.

2.1. Contrôle de l'infiltration des lymphocytes T dans les tumeurs par les vaisseaux

L'infiltration de lymphocytes T est généralement visible à la périphérie des tumeurs solides (Joyce and Fearon, 2015). Les anomalies morphologiques et architecturales de la vascularisation tumorale sont connues pour représenter une barrière contre l'extravasation et l'infiltration profonde de cellules T effectrices (Hamzah et al., 2008). La surproduction de facteurs tels que le facteur de croissance endothéliale vasculaire A (VEGF-A) ou l'endothéline-1 (ET-1), à la fois par des cellules malignes et stromales, conduit à l’augmentation de l’angiogenèse. Cet excès de facteurs angiogéniques entraine la formation de vaisseaux de diamètres anormaux, une diminution de l'afflux de cellules effectrices et de la réponse inflammatoire de l’endothélium associé la tumeur **(Figure 7)**.

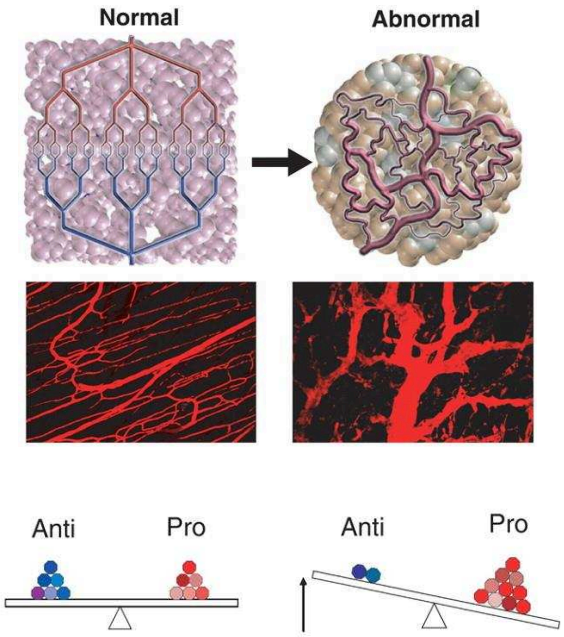


Figure 7 : Image biphotonique de vaisseaux sanguins normaux dans un muscle squelettique (à gauche) et image des vaisseaux sanguins d'un carcinome colorectal de souris (à droite)(Goel et al., 2012).

L'expression d'ET-1 par les cellules tumorales induit une baisse de l'expression des molécules d'adhésion par les lymphocytes infiltrant la tumeur (Buckanovich et al., 2008). Les cellules endothéliales associées aux tumeurs suivent un modèle dynamique d'évolution clonale menant à la baisse d'expression de chimiokines associées à l'infiltration de lymphocytes (CXCL16, CXCL13, CXCL12, CXCL9, CXCL10 et CCL19) et des molécules d'adhésion (SELE, MAdCAM-1, VCAM-1, ICAM-1, et ICAM-4)(Corey et al., 2016).

Le traitement avec un anticorps anti-VEGF induit une « normalisation » des vaisseaux et augmentent l'infiltration de lymphocytes $CD8^+$ (Motz et al., 2014).

Le processus de résistance des vaisseaux tumoraux à l'infiltration lymphocytaire et à la surveillance immunitaire a été appelé anergie des cellules endothéliales. Cette anergie endothéliale aura un impact fonctionnel sur la distribution des lymphocytes et pourrait participer aux mécanismes d'échappement immunitaire.

L'excès de facteurs pro-angiogéniques ainsi que la compression physique entrainent une mauvaise perfusion sanguine des tumeurs. Ainsi des zones hypoxiques et acides se forment au sein du TME. Ce défaut de perfusion sanguine est associé à l'échappement immunitaire, l'invasion, les métastases, une pression de sélection sur les cellules tumorales et un métabolisme altéré (Jain, 2013). L'hypoxie peut reprogrammer les cellules phagocytaires vers un phénotype pro-tumoral et immunosuppressif (Casazza et al., 2014; Colegio et al., 2014). L'activation du hypoxia inducible factor (HIF1α) dans les zones hypoxiques augmente l'expression du

checkpoint immunitaire PD-L1 par les DC et les cellules tumorales et ainsi l'immunosuppression dans le TME (Noman et al., 2014). Pour finir, l'hypoxie semble être impliquée dans les mécanismes de radio- et chimiorésistance et est un facteur prédictif négatif dans les cancers humains (Wilson and Hay, 2011)**(Figure 8)**.

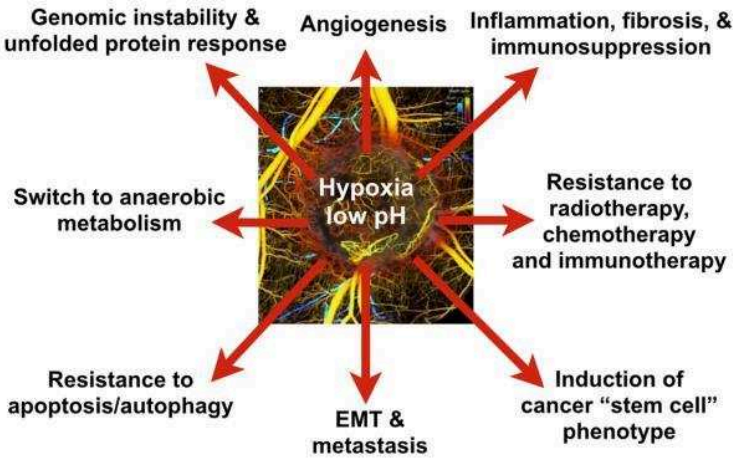


Figure 8 : L'hypoxie et l'acidose dues à une mauvaise perfusion sanguine augmentent la progression tumorale et la résistance aux traitements (Jain, 2013).

2.2. Contrôle de la migration intratumorale des lymphocytes T

Grâce aux études du comportement cellulaire au sein de la matrice extracellulaire tridimensionnelle, deux principaux modes de migration ont été caractérisés (Friedl and Brocker, 2000). Une migration lente couplée aux récepteurs d'adhésion de types intégrines et à des capacités de dégradation et de remodelage de la matrice extracellulaire concerne habituellement les cellules tumorales, les cellules mésenchymateuses et les fibroblastes et est appelée « migration mésenchymateuse ». Le second type de migration, appelée « migration amiboïde », est indépendante des intégrines, concerne principalement les cellules T, les cellules NK et certain APC et est associée à un déplacement beaucoup plus rapide avec une structure amiboïde (Wolf et al., 2003). Durant cette migration, les cellules T adoptent une morphologie fortement polarisée, avec une organisation et une localisation strictes des molécules de membrane et du cytosquelette (Friedl and Brocker, 2000). Certaines protéines se localisent préférentiellement au front de migration (LFA-1, CD45RO, récepteurs de chimiokines, protéine d'adhésion focale), au compartiment central (MTOC, PKC, MARCKS) ou vers l'uropode (CD44, CD43, ICAM-1, ICAM-3 et intégrines β1)(Friedl et al., 2011). Un comportement similaire des CTL

a été observé. La modification de ces compartiments pourrait avoir un impact important sur les réponses chimiotactiques, la rencontre avec les cellules cibles et les interactions avec l'ECM. La visualisation par microscopie biphotonique des différents composants du stroma a confirmé que l'architecture du TME contrôle l'infiltration des lymphocytes. La densité de collagène, de cellules tumorales, de cellules stromales et les vaisseaux sanguins influencent la navigation interstitielle des cellules T et ainsi l'immunité antitumorale. Au sein du TME, les lymphocytes T interagissent souvent avec les macrophages, qui semblent inhiber l'infiltration des effecteurs et la réponse antitumorale comme nous le verrons plus loin (Boissonnas et al., 2007; Engelhardt et al., 2012). La matrice extracellulaire (ECM) du stroma tumoral est riche en collagène de type I et en fibronectine. Dans les tumeurs, les CTLs migrent souvent en contact étroit avec les fibres de collagène et de fibronectine ou rampent le long de la paroi extérieure des vaisseaux. Cela suggère que l'ECM peut influencer la migration des cellules T et leurs fonctions (Boissonnas et al., 2007; Mrass et al., 2006). Les CTL déficients en CD44 migrent à une vitesse inférieure et sont incapables de maintenir une forme amiboïde polarisée, en présence ou non d'antigène apparenté (Mrass et al., 2008). Dans des expériences d'imagerie de cellules T dans des coupes épaisses de tumeurs humaines viables, la dynamique migratoire des lymphocytes est réduite dans les zones denses en ECM proche des nids tumoraux **(Figure 9)**. La trajectoire des cellules T est dictée par l'orientation et la densité du collagène, empêchant le contact direct avec les cellules néoplasiques. La mobilité des lymphocytes T est rétablie dans les zones pauvres en fibronectine et collagène ou en ajoutant de la collagénase pour réduire la rigidité de la matrice. L'ajout de collagénase permet ainsi d'augmenter le nombre de cellules T en contact avec les cellules tumorales (Salmon et al., 2012). En conclusion, la densité des fibres de l'ECM tumoral influence fortement la localisation et la migration des lymphocytes T. L'ECM fournit une base structurelle nécessaire pour la migration des lymphocytes T, mais les tumeurs pourraient également en bénéficier pour être protégées de l'attaque des lymphocytes T. Les tumeurs représentent donc un exemple de site où les stratégies des CTL pour rechercher et éliminer leurs cibles ne sont plus adaptées à leur environnement.

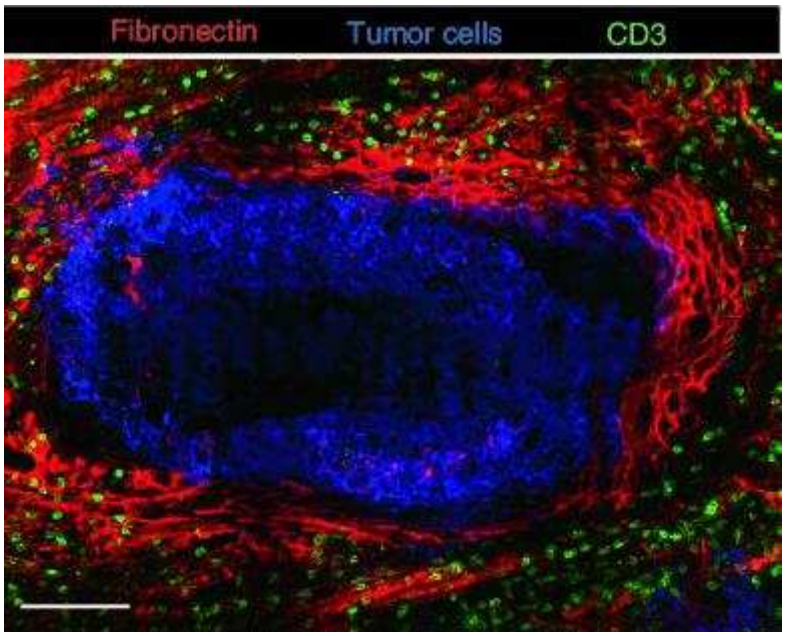


Figure 9 : Distribution de cellules T relative aux fibres de fibronectine et aux cellules tumorales dans une tumeur de poumon humain. Le massif tumoral (Bleu) est entouré de fibres de fibronectine denses et serrées (Rouge). La densité de cellules T (Vert) est faible dans les zones riches en fibronectine adjacentes à la tumeur mais augmente dans les zones moins concentrées en fibronectine (Peranzoni et al., 2013).

2.3. L'immunosubversion dans les cancers

Comme indiqué précédemment, l'efficacité de la réponse antitumorale des cellules T est liée à la régulation de leur activation et peut être limitée par des contraintes spatiales. L'immunoediting des tumeurs pour les rendre moins immunogènes peut conduire à une phase d'échappement tumoral et contribuer à la croissance tumorale. En effet, une perte d'immunogénicité est fréquemment obtenue par une diminution de la régulation ou une perte d'expression de MHCI. La tumeur peut également présenter un défaut dans les mécanismes de traitement de l'antigène ou peut perdre l'expression des antigènes (Blankenstein et al., 2012).

De nombreuses tumeurs établies continuent tout de même d'exprimer des épitopes immunogènes reconnus par les lymphocytes infiltrant la tumeur. La compréhension du rôle de l'immunosuppression dans les cancers permet de mieux expliquer pourquoi les tumeurs très immunogènes continuent de croitre. En 2005, Wilimsky et Blankestein établissent que l'échappement immunitaire peut avoir lieu sans perte d'antigénicité des tumeurs, via la tolérance des lymphocytes T (Willimsky and Blankenstein, 2005). Les contextes immunitaires des dLN et du TME sont favorables à l'induction de cette tolérance. Une mauvaise éducation immunitaire des DC peut également contribuer à ce phénomène. Les études cliniques et précliniques indiquent que les Treg et les macrophages sont des acteurs cellulaires centraux

dans l'échappement à la réponse antitumorale ; ils représentent également des obstacles à l'efficacité optimale des thérapies anticancéreuses. Les macrophages et monocytes peuvent représenter plus de 50% des cellules du stroma tumoral où leurs interactions et communications avec les lymphocytes sont principalement associées à la tolérance immunitaire, mais ils peuvent également avoir des activités trophiques protumorales directes (Mantovani et al., 2017). L'activité suppressive des Treg est quant à elle augmentée à la fois dans les dLN et le TME.

2.3.1. Rôle des DC dans l'immunosuppression

Une accumulation de données suggère que l'environnement des dLN est modifié de sorte que les antigènes tumoraux sont présentés d'une manière à favoriser la tolérance (Munn and Mellor, 2006). Le processus de tolérance centrale qui se produit habituellement pour les auto-antigènes peut également se produire pour les néoantigènes spécifiques de la tumeur. Les DC qui ont capturé les antigènes tumoraux peuvent contribuer à la tolérance centrale en induisant la génération de Treg ou la sélection négative des cellules T spécifiques d'antigènes tumoraux dans le thymus (Baba et al., 2012).

Dans les études humaines, un défaut du nombre et des propriétés fonctionnelles des DC dans les dLN a été observé. L'organisation spatiale des DC dans les dLN ainsi que leur nombre, maturité et co-localisation avec les lymphocytes T se sont révélés avoir un impact sur les résultats cliniques des patients atteints de cancer du sein (Chang et al., 2013). Différents mécanismes ont été décrits pour expliquer ce processus d'immunosuppression actif. Les DC isolées des dLN sont phénotypiquement immatures et de faibles stimulatrices des cellules T. L'utilisation de stimuli classiques de maturation peut, dans certains cas, surmonter ce défaut et permettre aux lymphocytes T $CD8^+$ d'éradiquer les tumeurs dans les modèles murins (van Mierlo et al., 2004). Les cellules tumorales peuvent sécréter des métabolites de stérols qui régulent négativement l'expression de CCR7 par les DC, perturbant ainsi la migration des DC vers les dLN (Villablanca et al., 2010). Certains facteurs dérivés de la tumeur peuvent également induire une expression de récepteurs de scavenger de classe A sur les DC, conduisant à une augmentation de l'assimilation des lipides tout en réduisant leur capacité à traiter les antigènes (Guo et al., 2012). Les DC exprimant l'enzyme immunorégulatrice indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) sont présents dans les dLNs murins et humains (Mellor and Munn, 2004). Les DC provenant des dLNs peuvent également sécréter du TGF-β, augmentant ainsi la prolifération de Treg (Ghiringhelli et al., 2005).

2.3.2. Rôles des checkpoints immunologiques dans l'immunosuppression

Le ciblage des « checkpoints » immunologiques comme le CTLA4 (Cytotoxic T lymphocyte antigen 4), le PD1 (programmed cell death protein 1) ou son ligand PDL1 (programmed cell death ligand) représentent des stratégies immunothérapeutiques prometteuses contre les cancers. Ces molécules sont capables de directement stopper la réponse des lymphocytes T effecteurs et contribuent à l'immunosuppression et à l'évasion tumorale **(Figure 10)**. Le CTLA-4 entre en compétition avec le CD28 pour se lier au CD80 et au CD86, réduisant ainsi le niveau de ligand B7 à la surface des APC et l'activation des lymphocytes T (Topalian et al., 2015). L'Ipilimulab, un anticorps monoclonal dirigé contre le CTLA-4, augmente la survie de patients atteints de mélanomes avancés (Klemm and Joyce, 2015).

Le PDL1 est souvent surexprimé à la surface des cellules cancéreuses et des cellules du TME (myéloïdes ou endothéliales). Cette protéine, en se liant à son récepteur PD1 présent à la surface des lymphocytes T, inhibe la survie de ces dernières. PDL1 peut également jouer un rôle dans l'induction de Treg au sein du TME (Francisco et al., 2009). Le blocage de PDL1 augmente l'efficacité thérapeutique d'un transfert adoptif de CTL dans les modèles murins (Pilon-Thomas et al., 2010). Les thérapies utilisant des anticorps bloquant l'interaction PDL1-PD1 augmentent l'élimination des tumeurs par les lymphocytes $CD8^+$ et des réponses cliniques ont été obtenues dans différents cancers humains (Herbst et al., 2014; Powles et al., 2014). En revanche, de nombreux patients ne répondent pas à ces thérapies, ce qui pourrait être dû à un manque d'immunité antitumorale préexistante ou à la présence d'autres mécanismes immunosuppressifs dans le TME (Tumeh et al., 2014).

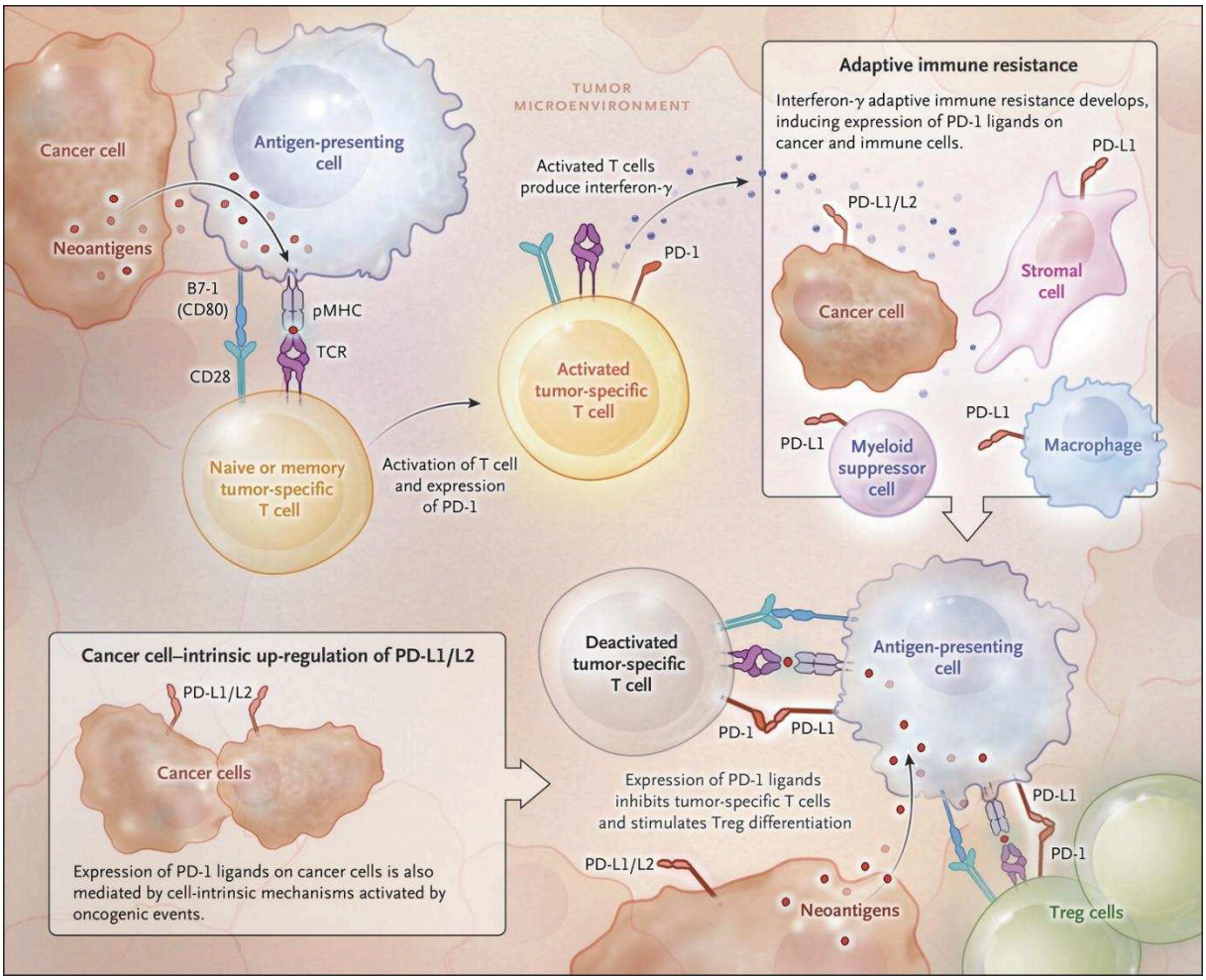


Figure 10 : L'inhibition de lymphocytes T spécifiques de la tumeur par l'expression de PD-1 et ses ligands dans le TME. L'IFNɣ peut induire l'expression de ligand de PD-1 sur les cellules cancéreuses, les macrophages, cellules dendritiques ou d'autres cellules stromales. L'expression du ligand de PD-1 sur les cellules cancéreuses peut aussi être induite par des évènements oncogéniques d'altération de l'expression génique (Transcriptionelle ou Epigénétique) (Boussiotis, 2016).

2.3.3 Les lymphocytes T régulateurs

2.3.3.1. Biologie des lymphocytes T régulateurs

Les lymphocytes T $CD4^+$ régulateurs (Treg) exprimant le facteur de transcription Foxp3 et le récepteur à l'IL-2 (CD25) jouent des rôles essentiels dans le contrôle de l'auto-immunité et le maintien de la tolérance immunologique chez l'homme et la souris. Les Treg sont présents dans les organes lymphoïdes secondaires, le sang périphérique et sont très abondants dans les sites servants de barrière biologique telles que la peau, le poumon, l'appareil digestif ou encore le foie. Les Treg sont principalement dérivés du thymus mais peuvent être induit en périphérie à partir de lymphocytes $CD4^+$ naïfs (Josefowicz et al., 2012). Ces cellules peuvent être activement recrutées ou proliférer en réponse à une insulte tissulaire ou à une inflammation. La mutation

du gène Foxp3 dans les souris 'Scurfy' engendre un défaut généralisé de développement des Treg et s'accompagne d'une pathologie inflammatoire létale (Godfrey et al., 1991). Les interactions entre les Treg et les lymphocytes T effecteurs sont déterminantes dans l'issue de la réaction immunitaire (Matheu et al., 2015). La suppression des fonctions effectrices des lymphocytes $CD4^+$ et $CD8^+$ par les Treg peut se produire via divers mécanismes dépendants de contacts cellulaires ou de facteurs solubles. Ces mécanismes suppressifs incluent :

-La sécrétion de cytokines suppressives (TGF-β, IL-10, IL-35) **(Figure 11A)**

-L'expression de checkpoints immunologiques et de récepteurs inhibiteurs (CTLA-4, PD-1, LAG-3, TIM-3, ICOS, TIGIT, IDO, GITR)

-La cytotoxicité directe (les granules de perforine et granzyme) **(Figure 11B)**

-La perturbation du métabolisme des T effecteurs (consommation d'IL-2)

-L'expression des ectoenzymes, ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (CD39) et l'ecto-5'-nucleotidase (CD73) qui catalysent la génération d'adénosine (Deaglio et al, JexMed 2007) **(Figure 11C)**

-L'induction de cellules dendritiques tolérogènes favorisant l'anergie des lymphocytes **(Figure 11D)**

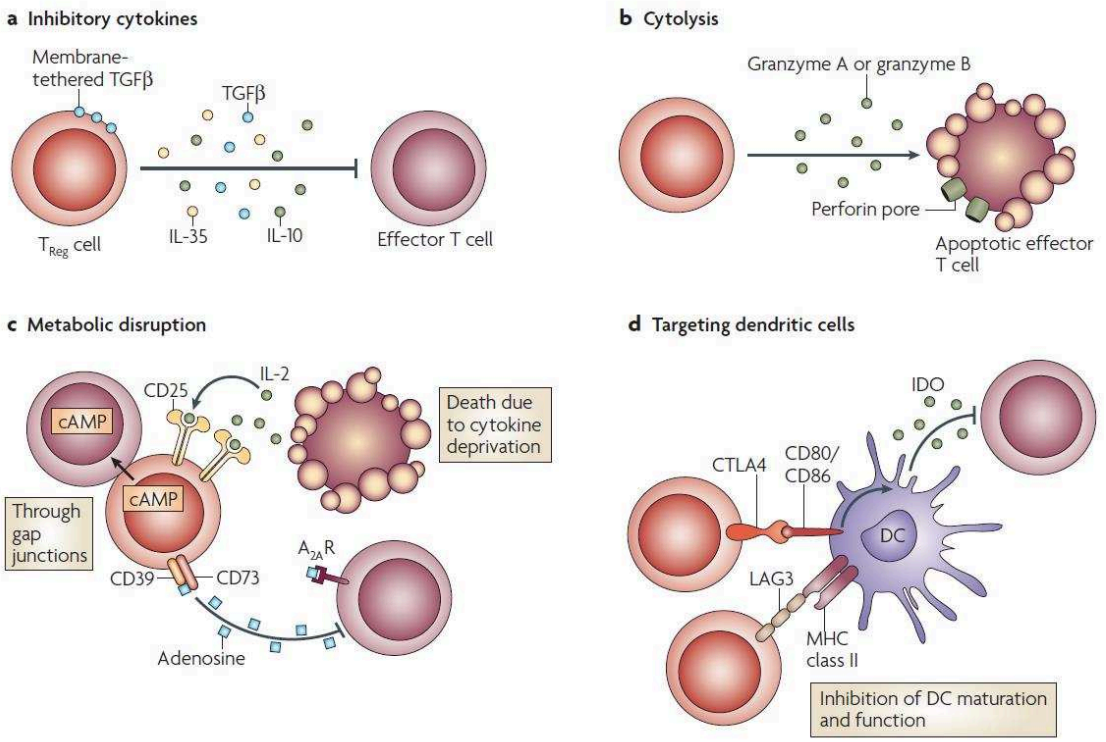


Figure 11 : Les différents mécanismes de suppression des Treg (Vignali et al., 2008).

L'expression du TCR par les Treg est importante pour leur différenciation, maintenance, prolifération et fonctionnalités (Vahl et al., 2014). L'ablation du TCR entraine un disfonctionnement du groupe de gènes associés à la signature suppressive des Treg (Levine et al., 2014). De manière surprenante, de nombreuses fonctions suppressives sont rétablies par l'expression du TCR dans une seule population clonale de Treg, indiquant une possible importance des signaux liés au TCR indépendamment du répertoire d'antigènes reconnus (Levine et al., 2017). Une analyse du répertoire des TCR des Treg suggère que les Treg ont les mêmes capacités que les Th à reconnaitre des antigènes exogènes et ne sont pas forcément spécifiques du soi (Pacholczyk et al., 2007). Les signaux du TCR sont également impliqués dans la formation d'agglomérat de Treg, distribués préférentiellement dans les zones riches en DC migrateurs $CD11b^{+}$. Il a été suggéré que ces co-localisations de Treg et DC servent de plateforme pour le contrôle des lymphocytes T effecteurs cibles (Liu et al., 2015)(**Figure 12**). L'adhérence des Treg aux DC peut induire un phénotype suppresseur dans ces dernières cellules (Chen et al., 2017; Yan et al., 2017).

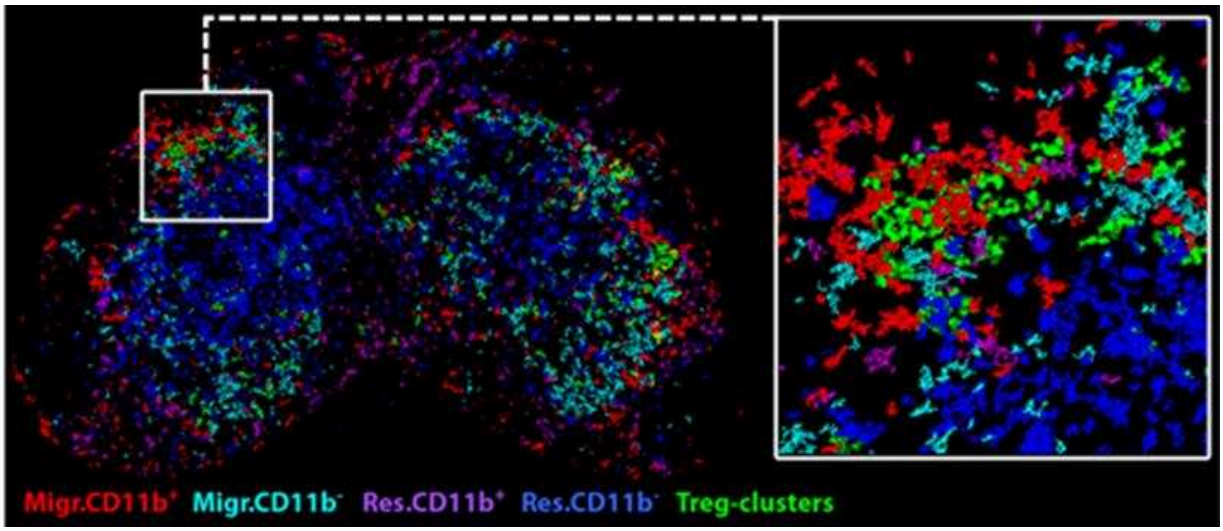


Figure 12 Agglomération préférentielle des Treg avec les sous-types de DC migrateurs dans les ganglions en condition homéostatique (Liu et al, nature 2015).

2.3.3.2. Les Treg dans le cancer

L'équipe de Sakaguchi fut l'une des premières à démontrer que la déplétion des cellules $CD4^+$ $CD25^+$ pouvait augmenter l'immunité et le rejet antitumoral (Onizuka et al., 1999; Shimizu et al., 1999).

Depuis, les Treg ont un rôle bien établi dans la tolérance tumorale et représentent un obstacle dans l'efficacité des immunothérapies antitumorales. Une augmentation du nombre de Treg et de leurs proportions vis-à-vis des Th dans le dLN, la rate et le sang a été décrite dans la plupart des cancers humains. Les Treg sont très largement représentés au sein des tumeurs où ils démontrent de fortes capacités de prolifération. Chez l'homme, un faible ratio Treg/Teff ou un faible nombre de Treg sont associés à un pronostique favorable dans la plupart des cancers (cancers ovarien, mammaire, pulmonaire, cancer du foie, du pancréas et du col utérin) (Shang et al., 2015; Zhao et al., 2016). Il existe en revanche des cancers où le rôle de l'infiltrat de Treg reste controversé et pourrait améliorer le pronostique (Cancers colorectaux et cancers des voies aérodigestives supérieurs)(Fridman et al., 2013). Ces différences pourraient être liées à la nature très inflammatoire de ces cancers, où l'IL-17 joue un rôle (Roychoudhuri et al., 2015). Il est également important de prendre en compte les stratégies d'association des Treg à la survie des patients (Densité de Treg vs ratio Treg/CTL) ainsi que les hétérogénéités moléculaires et cellulaires de différentes tumeurs qui pourraient avoir un impact sur le rôle des Treg (Shang et al., 2015).

Les mécanismes précis menant à l'augmentation de la densité et de l'activité suppressive des Treg lors des processus néoplasiques sont le sujet d'intenses recherches et ont concerné une partie de mon travail de thèse.

Les Treg contribuent de manière substantielle à l'induction de l'immunosuppression dans les dLNs (Darrasse-Jeze and Podsypanina, 2013), notamment via leur capacité à interférer avec les interactions stables entre les cellules T effectrices et les APC (Tadokoro et al., 2006). Dans les modèles murins, l'infiltration massive de Treg dans les tumeurs bloque l'activation des lymphocytes T $CD4^+$ et ainsi le que développement des CTLs (Chaput et al., 2007a).

Dans un modèle de tumeur expérimentale, l'inhibition de la fonction des Treg totaux en utilisant des anticorps anti-CD25, ou une déplétion spécifique en utilisant la souche de souris transgénique DEREG, conduit à une motilité réduite et une meilleure activation et expansion des CTL dans les dLN. Ce phénomène s'accompagne d'une forte inhibition de la croissance tumorale (Boissonnas et al., 2010). La reconnaissance des antigènes tumoraux par les Treg transférés au même moment que l'injection de la tumeur, induit leur expansion dans les dLN, puis dans la tumeur. Ce transfert adoptif de Treg inhibe l'effet bénéfique d'un transfert adoptif de CTL reconnaissant le même antigène **(Figure 13)**. Ces Treg spécifiques d'antigènes tumoraux établissent des interactions dynamiques avec les DC de la tumeur et réduisent l'expression de molécules de co-stimulation, tout en augmentant l'expression des checkpoints immunologiques PD-1 et TIM-3 par les CTL (Bauer et al., 2014). Plus d'études sont nécessaires afin de distinguer les rôles des Treg endogènes spécifiques ou non-spécifiques de l'antigène lors du développement tumoral ou en réponse aux thérapies.

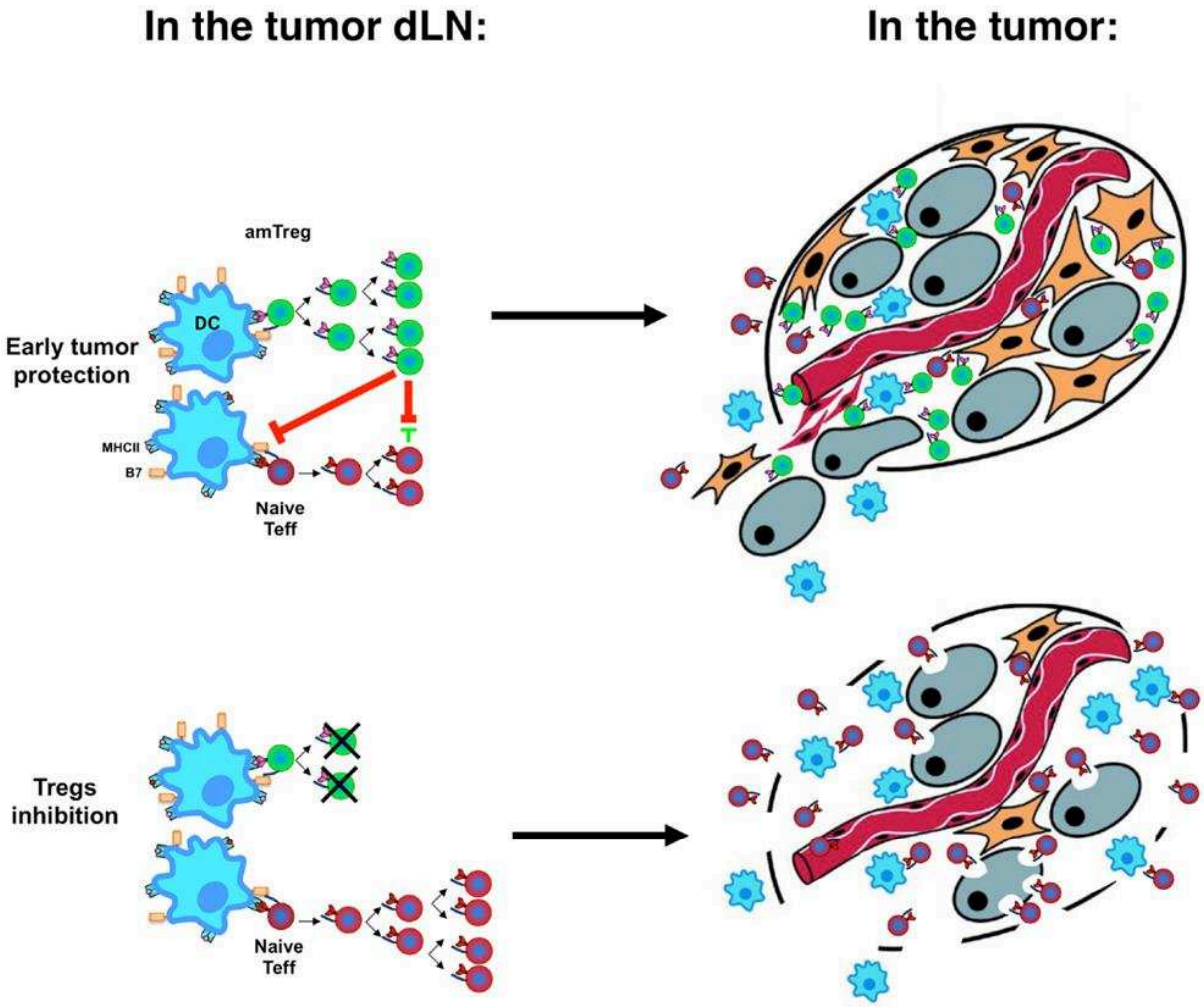


Figure 13 : La tolérance versus le rejet immunitaire. La cinétique d'activation des Treg (Vert) et des lymphocytes T effecteurs (Rouge) dans le ganglion drainant la tumeur (dLN) après stimulation par les cellules dendritiques (Bleu) est déterminante pour l'infiltration de différents sous-types cellulaires dans la tumeur et l'élimination des cellules tumorales (Gris)(Darrasse-Jeze and Podsypanina, 2013).

2.3.4 Les macrophages

2.3.4.1. Le système des phagocytes mononuclées (MPS)

Les cellules du système des phagocytes mononuclées (qui inclut les macrophages, monocytes et DC) en coopération avec les neutrophiles constituent les premières lignes de la défense innée contre les microbes. Les marqueurs F4/80, CD68 et le récepteur Fc-gamma de type 1 (CD64) permettent d'identifier les macrophages chez l'homme et la souris (Guilliams et al., 2014). Leur forte capacité de phagocytose et de changement morphologique leur permet de participer activement au nettoyage de cellules mortes, débris et pathogènes qui sont reconnus via les récepteurs PRR (pattern recognition receptors), scavenger ou Fc (Gordon, 2002). Un environnement acide généré via les complexes enzymatiques V-ATPase et une forte activité

protéolytique lysosomale au sein des phagosomes permettent aux macrophages de rapidement détruire les particules phagocytées. En comparaison, les DC présentent une protéolyse lysosomale réduite et la capacité d'exporter les protéines du phagosome vers le cytosol, afin de libérer des antigènes pour la reconnaissance par les lymphocytes T et d'effectuer la présentation croisée (Savina et al., 2006).

Différents mécanismes permettent aux macrophages de distinguer les cellules viables ou mourantes. Le récepteur CD47 est considéré comme un marqueur du soi et son expression est perdue dans les cellules endommagées ou mourantes (Gardai et al., 2005; Reinhold et al., 1995). La reconnaissance de CD47 par le récepteur SIRPα permet d'inhiber la phagocytose afin de maintenir l'homéostasie. Différents cancers humains présentent une expression de CD47 augmentée comparée à celle de tissus sains, ce qui a été suggéré comme les protégeants de la phagocytose. L'utilisation d'anticorps anti-CD47 augmente la phagocytose des cellules tumorales et réduit fortement la croissance de différentes tumeurs humaines in vitro et dans des modèles murins humanisés (Chao et al., 2012; Weiskopf et al., 2016).

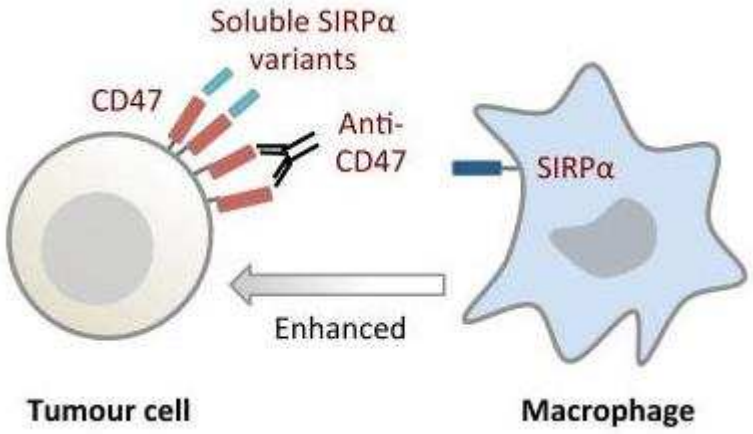


Figure 14 : Le ciblage des cellules tumorales avec un anticorps anti-CD47 ou avec du SIRPα soluble inhibe l'interaction CD47-SIRPα et facilite la phagocytose des cellules tumorales par les macrophages (Chao et al., 2012).

La phagocytose de cellules apoptotiques ou nécrotiques est cruciale dans différents processus développementaux mais aussi pour l'homéostasie et la régénération tissulaire (Hochreiter-Hufford and Ravichandran, 2013). La phagocytose de cellules apoptotiques exposant la phosphatidylserine à leur surface s'accompagne d'une réaction non-immunogène avec notamment une sécrétion de TGF-b et de VEGF par les macrophages, afin de favoriser respectivement, la résolution de l'inflammation et la régénération (Huynh et al., 2002; Xiong et al., 2013). A l'inverse la calreticuline, préférentiellement exposée par les cellules nécrotiques induit une réponse pro-inflammatoire par les macrophages (Gerbitz et al., 2012).

2.3.4.2. La polarisation fonctionnelle des macrophages

La prolifération, différenciation et survie des macrophages dépend du facteur de transcription PU.1 et du facteur de croissance CSF-1 qui agit via le récepteur à tyrosine kinase CSF-1R. La majorité de l'expression du récepteur au CSF-1 (CSF-1R) est restreinte aux macrophages et aux monocytes (Sauter et al., 2014b). Les macrophages sont largement absents des tissus de souris déficientes pour PU.1, CSF-1 ou CSF-1R, dès le début de l'hématopoïèse issue du sac vitellin jusqu'à l'adulte. Ces animaux présentent des défauts développementaux (Wiktor-Jedrzejczak et al., 1990), une augmentation de la mortalité périnatale et un réduction de la survie postnatale (McKercher et al., 1996).

Présents dans la quasi-totalité des organes, les macrophages sont des cellules très plastiques dont le phénotype et le profil cytokinique répond à des signaux de courte ou de longue distance. Les signaux que les macrophages peuvent reconnaitre, tels que les facteurs de croissance (CSF-1 et GM-CSF), les cytokines, les microbes, des dérivés de nucléotides, la liaison d'anticorps à des récepteurs Fc, les glucorticoïdes ou la phagocytose elle-même, ont la capacité de changer leur statut d'activation (Biswas and Mantovani, 2010; Gordon and Martinez, 2010). Introduit par Charlie Mills en 2000, le modèle d'activation M1/M2 a été inspiré par le fait que la stimulation par l'IFNɣ et le LPS induit une forte production d'oxyde nitrique (NO) par les macrophages isolés d'une souche Th1 (C57BL/6), alors que les macrophages isolés d'une souche Th2 (Balb/c) métabolisent l'arginine après le même stimulus (Mills et al., 2000). Plus tard, le modèle d'un spectre d'activation, avec les macrophages M1 et M2 à chaque extrémité, a été le plus prévalent. Les macrophages considérés comme M1 sont associés à la production de NO synthase, IL-1, TNF-α, IL-6 et aux processus inflammatoires. A l'inverse, les marqueurs associés à la résolution de l'inflammation comme IL-10, TGF-β, VEGF, CD206 sont considérés comme M2 et sont typiquement obtenus après une stimulation avec de l'IL-4. Murray et al ont proposé un système de marqueurs exprimés par les macrophages en fonction de différentes conditions de stimulations (Murray et al., 2014)**(Figure 14)**.

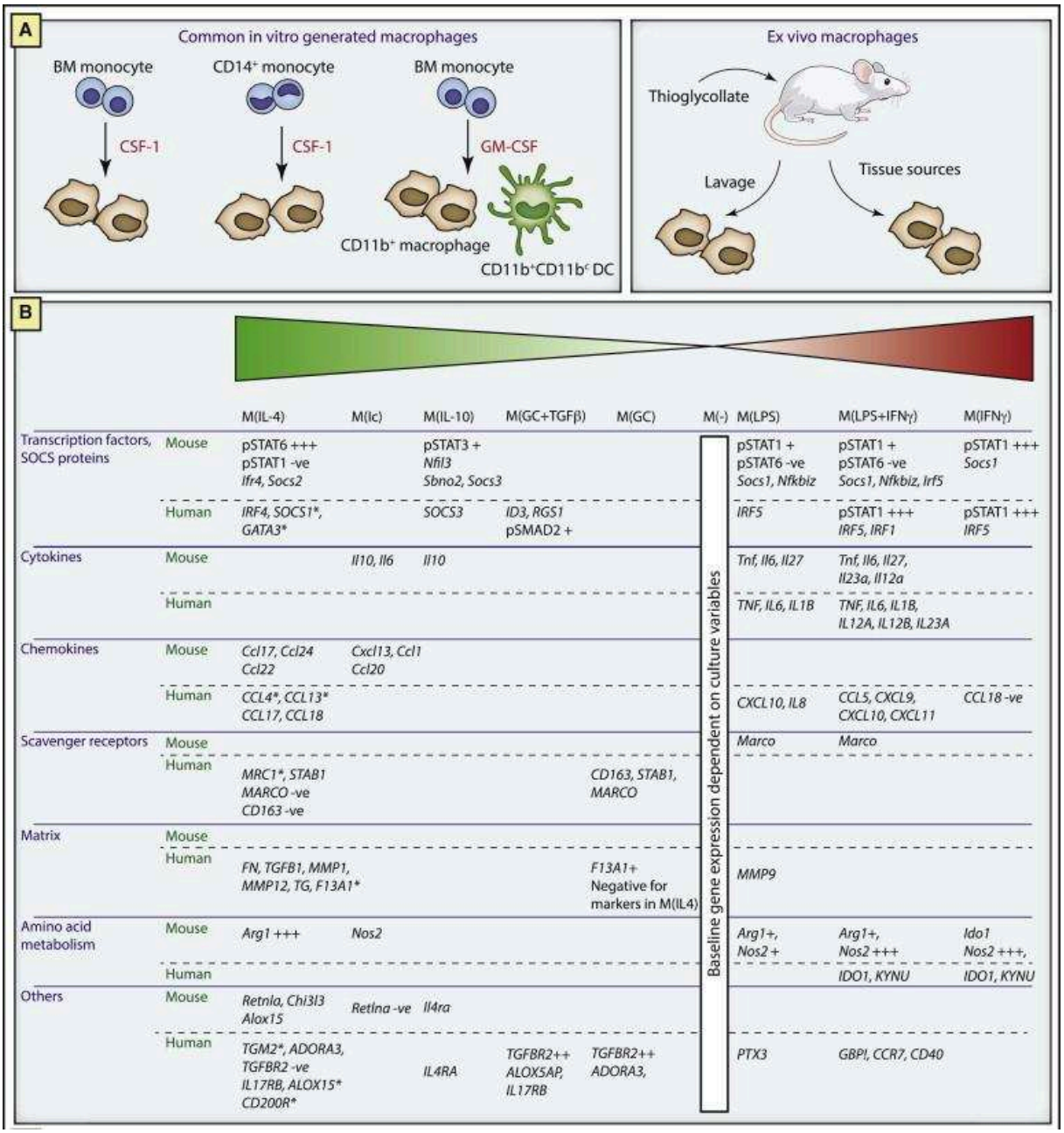


Figure 15 A. Exemple de différentes préparations de macrophages. Des macrophages dérivés de monocyte CD14+ après culture avec de CSF-1 sont utilisés pour l'évaluation des marqueurs et la standardisation des conditions d'activation. Les macrophages peuvent aussi être générés avec du GM-CSF, ce qui peut également conduire à une population CD11c+. Chez la souris, l'injection de thioglycollate permet de générer des macrophages après un lavage péritonéal. Chez l'homme et la souris, différentes sources de tissus peuvent être utilisées pour isoler des macrophages. B. Système de marqueurs pour les macrophages activés. La figure représente les sous-types fonctionnels en fonction de la stimulation de macrophages de souris ou d'humains générés avec du CSF-1. Les conditions de stimulation sont : IL-4, complexes immuns (Ic), d'IL-10, glucocorticoïde seul, glucocorticoïde + TGFβ, LPS, LPS+IFNɣ et IFNɣ seul. Les marqueurs sont issus de données publiées ou non, afin de générer un consensus (Murray et al., 2014).

Le modèle M1/M2 sert de guide pour décrire les fonctionnalités des macrophages mais peut se révéler insuffisant en fonction du contexte. Ainsi, des études de transcriptomiques révèlent que l'état d'activation des macrophages peut s'étendre au-delà des extrêmes M1/M2 (Xue et al., 2014). Leurs activités non-canoniques telles que le recyclage du fer dans la rate (Kohyama et al., 2009), l'élimination de synapses défectueuses dans le cerveau (Hong et al., 2016), le

contrôle de l'hématopoïèse (Dutta et al., 2015) ou la surveillance de complexes immuns dans le rein (Stamatiades et al., 2016) reflètent cette idée.

2.3.4.3. L'ontogénie des macrophages

Dans les années 60, Van furth et Cohn ont utilisé une technique de marquage à la thymidine radioactive tritiée (H3) pour suivre le devenir des monocytes circulants. Les monocytes persistaient dans le sang pendant des périodes de moins de 24h et étaient rapidement mobilisés dans différents tissus tels que le péritoine enflammé (van Furth and Cohn, 1968). A l'époque, il été conclu que les monocytes réapprovisionnent continuellement le stock de macrophages résidents des tissus. Le concept est étayé par la relative facilité avec laquelle les monocytes deviennent des macrophages en culture (van Furth and Cohn, 1968) et des données plus récentes pointent spécifiquement vers le sous-type de monocytes Ly6C^{high} (Wynn et al., 2013) comme précurseur de macrophages. Ces informations proviennent en revanche de scénarios impliquant un contexte inflammatoire.

L'inflammation est caractérisée par un recrutement de monocytes Ly6C^{high} qui se différencient en macrophages dans le tissu. Ces macrophages peuvent être remplacés par des macrophages régénératifs de type 'M2' lors de la résolution de l'inflammation. Les dérèglements de ces processus sont associés à des pathologies telles que les infections, l'athérosclérose ou l'infarctus (Frantz et al., 2013).

Des études en condition non-inflammatoire ont changé ce dogme sur l'origine des macrophages. Celles-ci indiquent que les macrophages de nombreux tissus n'ont pas besoin d'apport de l'hématopoïèse adulte pour leur maintien. L'exemple le plus évident est celui de la microglie dans le cerveau, où les macrophages sont directement dérivés du sac vitellin et se maintiennent chez l'adulte. Les macrophages tissulaires peuvent être dérivés de monocytes du foie fœtal (macrophages alvéolaires dans le poumon, cellules de Kupffer dans le foie), à la fois du sac vitellin et de monocytes du foie fœtal (Cellules de Langerhans dans l'épiderme) et se maintenir par auto-renouvèlement. Un apport de monocytes issus de l'hématopoïèse adulte est en revanche nécessaire pour maintenir les macrophages de l'intestin, du cœur et du derme (Perdiguero et al., 2015)(**Figure 16**).

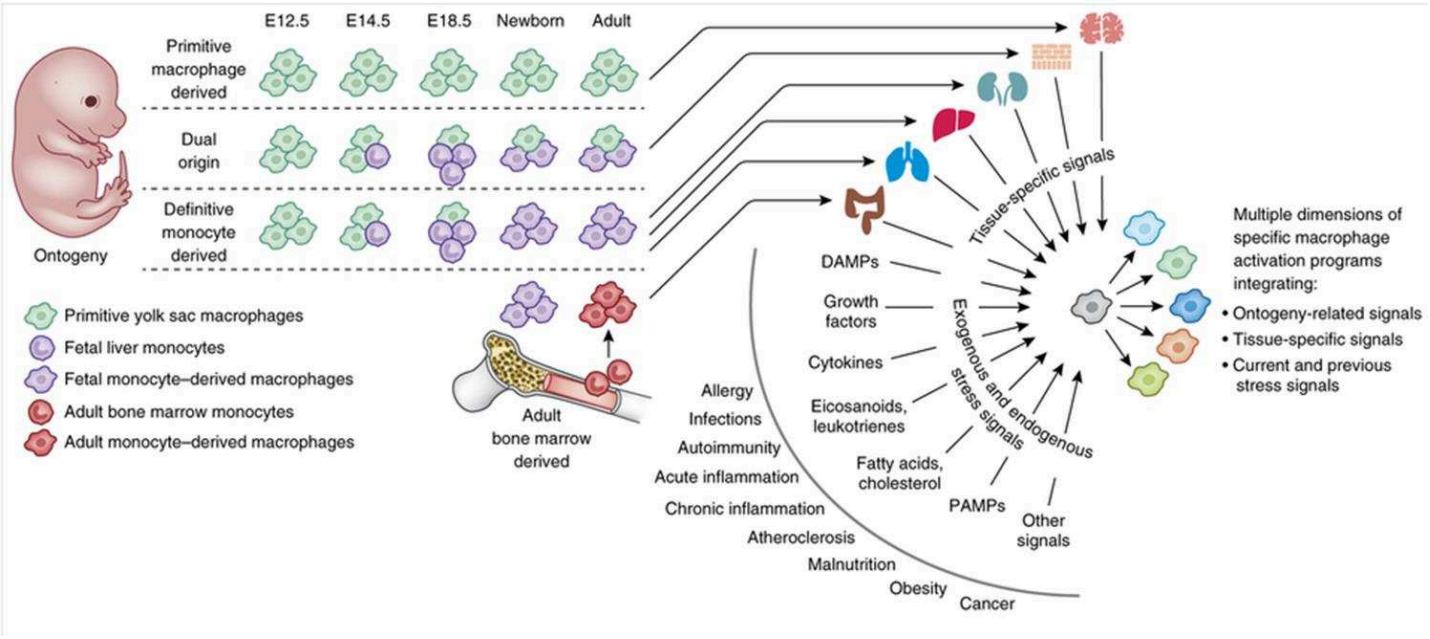


Figure 16 : L'ontogénie, l'environnement tissulaire et des signaux de stress conditionnent la réponse des macrophages et leur activation. Le même signal de stress peut avoir un effet différent sur des macrophages de différentes origines ou des macrophages préalablement conditionnés par le même ou d'autres signaux. Ainsi, les macrophages ont des contributions variables aux pathologies (Ginhoux et al., 2016).

La composition en macrophages dans chaque tissu ou niche pathologique peut donc être dépendante d'une balance dynamique de macrophages recrutés et résidents. Le rôle des macrophages résidents dans l'inflammation ou dans des pathologies tel que le cancer reste peu étudié. Il serait intéressant de remettre dans le contexte actuel les études établies au moment où la présence des macrophages d'origine embryonnaire n'était pas encore connue.

Les analyses spatiotemporelles du développement des macrophages permettront d'identifier des régulateurs clés dans le développement des macrophages résidents de chaque tissu, comme il a été le cas pour le régulateur Id3 dans le développement des cellules de Kupffer (Mass et al., 2016).

Les signaux de l'environnement agissent dans le contexte particulier de chaque sous-type de macrophages pour établir une signature d'amplificateur de transcription spécifique à chaque tissu **(Figure 16)** (Gosselin et al., 2014; Lavin et al., 2014). Ainsi, pour mieux définir la fonction des macrophages, il est nécessaire d'intégrer simultanément leur origine, les signaux environnementaux, leur stade de développement ainsi que les interactions avec différents sous-types cellulaires.

2.3.5. Les monocytes

Les monocytes sont composés de deux principaux sous-types dans le sang: les monocytes inflammatoires et les monocytes patrouilleurs, ayant des comportements et des fonctions différentes. Chez la souris, ces sous-types peuvent être différenciés sur la base de l'expression de l'antigène Ly6C et des récepteurs de chimiokines CCR2 et CX3CR1, en combinaison avec d'autres marqueurs de surface. Les monocytes inflammatoires Ly6C^{high} CCR2^{high} CX3CR1^{low} (monocytes classiques CD14^{+} CD16^{-} chez l'homme) se développent principalement dans la moelle osseuse à partir de progéniteurs monocytaires communs (cMoP)(Hettinger et al., 2013). Les cMoP sont eux-mêmes dérivés de progéniteurs de macrophages et de DC (MDP). La sortie des monocytes Ly6C^{high} de la moelle osseuse est contrôlée par le récepteur de chimiokine CCR2 (Tsou et al., 2007). En condition homéostatique, les monocytes inflammatoires circulent dans le sang pendant de courtes périodes de temps (demi-vie estimée à 20h), avant d'entreprendre leur programme de différenciation en monocytes Ly6C^{low}, ces derniers ayant une plus longue durée de vie (demi-vie estimée à 48h) (Mildner et al., 2013; Varol et al., 2007). La différenciation des monocytes Ly6C^{high} en Ly6C^{low} est contrôlée par le ligand de Notch delta-like 1 (DLL1), exprimé par certaines cellules endothéliales et a lieu dans des niches vasculaires particulières de la moelle osseuse et de la rate (Gamrekelashvili et al., 2016). Le récepteur nucléaire NR4A1 (Nur77) est impliqué dans ce programme de différenciation et son expression permet de définir spécifiquement les monocytes Ly6C^{low} (Thomas et al., 2016).

Les monocytes Ly6C^{low} CCR2^{low} CX3CR1^{high} ou patrouilleurs (non-classiques CD14^{low} CD16^{+}chez l'homme), rampent le long des parois luminales où ils assurent un rôle de surveillance et de nettoyage de microparticules (Auffray et al., 2007) ou de cellules endothéliales mortes (Carlin et al., 2013). Ils participent à la surveillance des métastases grâce à leur capacité à phagocyter les cellules tumorales dans la circulation pulmonaire avant l'invasion et à recruter des cellules NK (Hanna et al., 2015).

Les monocytes Ly6C^{high} peuvent également devenir des précurseurs définitifs de certains macrophages tissulaires (intestin, peau et rate)(Yona et al., 2013).Les interactions avec les cellules endothéliales permettent également le recrutement rapide des monocytes Ly6C^{high} sur un site inflammatoire ou ils peuvent se différencier en macrophages ou en cellules dendritiques et orchestrer la réponse inflammatoire. Nous verrons plus loin que les monocytes inflammatoires sont principalement impliqués dans le développement tumoral en se

différenciant en TAMs. Les rôles des monocytes Ly6C^{high} dans les tissus, autres que celui de précurseur de DC ou de macrophages, sont peu étudiés. Ils peuvent dans certain cas moduler la réponse immunitaire avant de se différencier en macrophages, comme il été démontré pour les cellules myéloïdes suppressives monocytaires (M-MDSC).

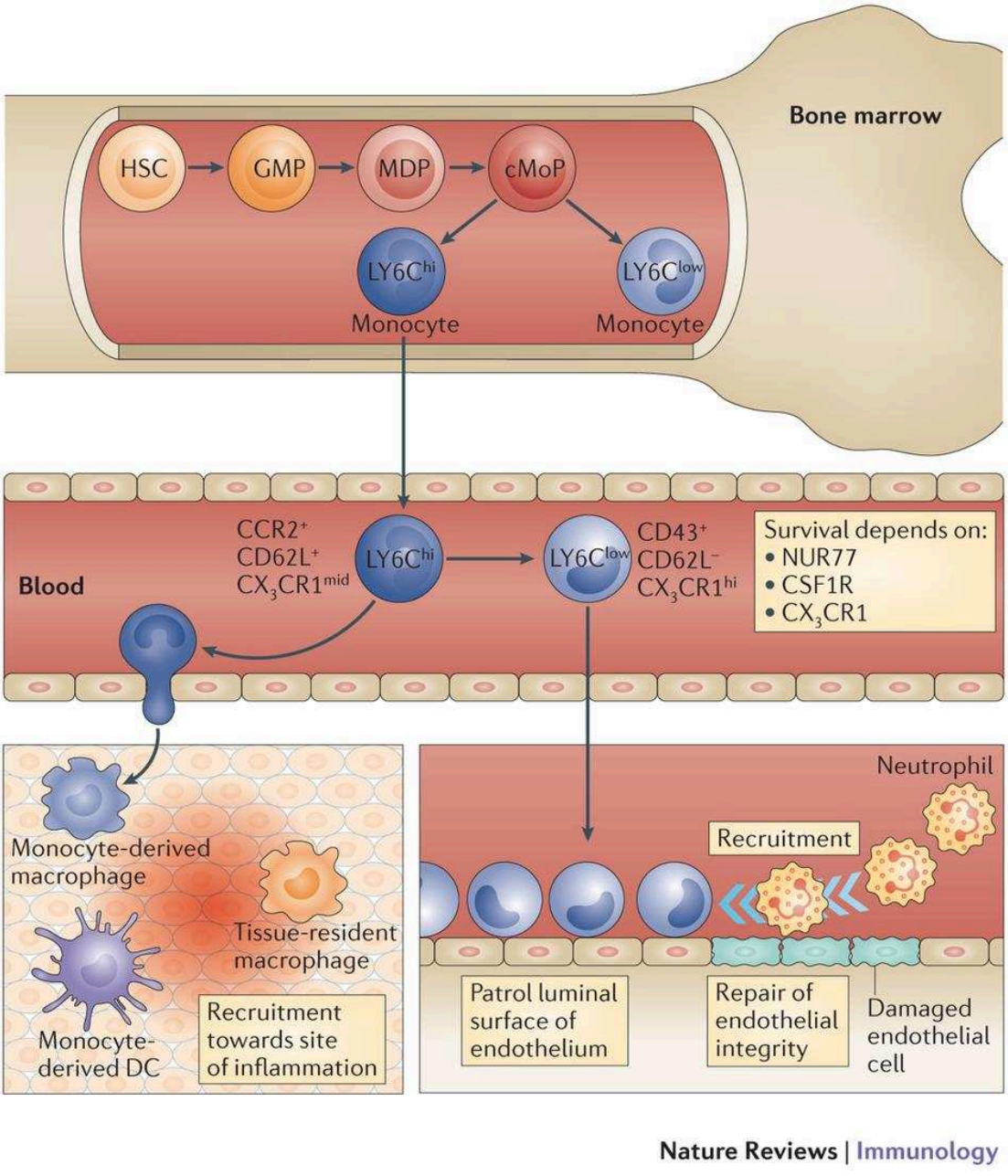


Figure 17 : Les monocytes sont constamment générés dans la moelle osseuse à partir de cellules souches hématopoïétiques (HSC) via les progéniteurs de macrophages et de DC (MDP) et les progéniteurs monocytaires communs (cMoP). En condition homéostatique, les monocytes Ly6Chigh et Ly6Clow circulent dans le sang et sont fonctionnellement différents. Les monocytes Ly6Clow patrouillent le long des cellules endothéliales pour coordonner la réparation de ces dernières ou le recrutement de neutrophiles. Les monocytes Ly6Chigh sont rapidement recrutés sur le site inflammatoire où ils extravasent et peuvent se différencier en macrophages ou en DC (Ginhoux and Jung, 2014).

2.3.6. Les cellules myéloïdes suppressives (MDSC)

Les stress inflammatoires tels que les infections et les cancers induisent une hématopoïèse « d'urgence » afin de garantir l'apport de cellules immunitaires. Ce phénomène est associé à une accumulation de cellules myéloïdes immatures. Le G-CSF, GM-CSF, CSF-1, IL-6 ou encore les chimiokines sont d'importants facteurs régulant la production de progéniteurs de neutrophiles et macrophages dans ces conditions. Les facteurs de transcription c-EBPβ (Akagi et al., 2008) et STAT3 (Zhang et al., 2011) sont impliqués dans la granulopoïèse induite par le G-CSF alors que PU-1 et IRF8 permettent la différenciation de monocytes sous l'influence de CSF-1 (Yeamans et al., 2007).

Les cellules myéloïdes suppressives (MDSC) représentent une population hétérogène de cellules à différents stades de maturation. De nombreuses études indiquent que les MDSC contribuent à la progression tumorale via leurs fonctions d'immunosuppression. Les MDSC sont composés de deux principaux sous-types polymorphonuléaires (PMN-MDSC) et monocytaire (M-MDSC). Les PMN-MDSC sont phénotypiquement et morphologiquement similaire aux neutrophiles ($CD11b^+Ly6G^+$ $CXCR2^+$chez la souris, $CD11b^+CD14^-CD15^+$ chez l'homme) alors que tout comme les monocytes inflammatoires les M-MDSC sont CD11b+ $Ly6C^{high}$ $CCR2^+$ ($CD11b^+$, $CD14^+$, $HLA^{-/low}$ chez l'homme) (Bronte et al., 2016).

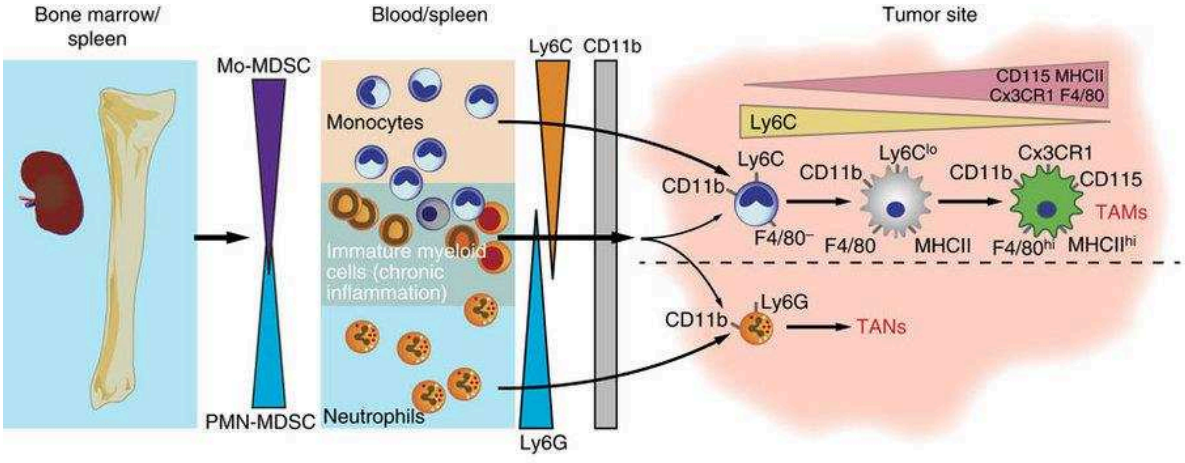


Figure 18 : Dans le cancer et les inflammations chroniques la moelle osseuse et la rate augmentent la production de cellules myéloïdes immatures suppressives. Chez la souris, les MDSC monocytiques (M-MDSC) sont CD11b+Ly6G-Ly6C+ alors que les MDSC polymorphonucleaire sont CD11b+Ly6C-Ly6G+. Durant la différenciation en macrophage des M-MDSC, l'expression de Ly6C est progressivement réduite alors que le MHCII, F4/80 et CX3CR1 sont augmentés (Gabrilovich et al., 2012).

Les MDSC sont distingués des monocytes et des neutrophiles uniquement sur la base de leur capacité à inhiber la prolifération et la production d'IFNɣ par lymphocytes T. Le terme MDSC pourrait donc simplement refléter une activité suppressive des monocytes et neutrophiles. Il est important de développer des marqueurs robustes des MDSC afin standardiser leur phénotypage dans les cancers humains.

L'activité suppressive des MDSC met en jeu différentes molécules, notamment la production de L-argininine 1 (substrat de deux enzymes : l'arginase 1 et l'iNOS), de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) et péroxynitrites (NO). Ces molécules jouent un rôle important dans les fonctions pro-tumorales des MDSC part l'inhibition fonctionnelle des lymphocytes T (Bronte and Zanovello, 2005; Rodriguez and Ochoa, 2008). Une augmentation du nombre de MDSC corrèle avec la présence de Treg et l'augmentation de cytokines de type Th2 dans le plasma de patients atteints de cancers gastrique et hépatocellulaire (Hoechst et al., 2008).

Une accumulation de MDSC a été observée dans le sang, les organes lymphoïdes et les tumeurs dès les phases précoces du développement tumoral de différents modèles précliniques. La durée de vie des MDSC ainsi que leur devenir sont peu connus. Certaines études jugèrent que comme les monocytes, les M-MDSC peuvent se différencier en TAM ; un processus impliquant le facteur induit par l'hypoxie (HIF-1α) (Ceasar Corzo et al 2010). Les MDSC s'accumulent dans la circulation de patients atteints de différents cancers (cancer du sein, colon, pancréas, foie) et corrèlent avec une réduction de la survie (Marvel and Gabrilovich, 2015). A l'inverse, ces cellules sont quasiment absentes dans la circulation d'individus sains. L'infiltrat tumoral de MDSC a été moins étudié mais une accumulation de ces cellules a été observée dans des patients atteints de cancer du pancréas (Parker et al., 2015) ou de cancer des voies aérodigestives supérieures (Younis et al., 2016).

La fréquence de chaque sous-type de MDSC peut être influencée par le type de cancer. Ainsi une accumulation préférentielle de M-MDCS a été observée chez les patients atteints de mélanome, carcinome hépatocellulaire ou cancer des voies aérodigestives supérieures, alors que les PMN-MDSC sont plus représentés chez les patients atteints de cancer du rein (Solito et al., 2014). Ces disparités pourraient être liées aux différences de sécrétions de facteurs spécifiques au développement des M-MDSC ou des PMC-MDSC par différents types de tumeurs.

2.3.7. Les fonctions protumorales des macrophages

Les macrophages associés aux tumeurs (TAM) représentent les cellules les plus abondantes du TME (Mantovani et al., 2017). Il a été démontré que les monocytes et les M-MDSC (Corzo et al., 2010) de la moelle osseuse (Franklin et al., 2014) et de la rate (Cortez-Retamozo et al., 2012) peuvent être recrutés via l'axe CCR2 et se différencier dans les tumeurs pour contribuer à une forte accumulation de TAM. Cette accumulation est caractéristique de la pluparts des tumeurs solides.

Au sein des tumeurs solides, les macrophages résidents des organes affectés pourraient participer au pool de TAM, en revanche, cette possibilité a été difficile à démonter jusqu'à présent. Les TAM démontrent, en revanche, de fortes capacités de prolifération dans les tumeurs (Tymoszuk et al., 2014).

Les TAM produisent de nombreuses cytokines, chimiokines, facteurs de croissance, hormones, protéases et métabolites possédant des propriétés protumorales. Les études cliniques indiquent une forte corrélation entre un mauvais pronostique et une forte infiltration de macrophages dans la plupart des tumeurs solides (Ruffell and Coussens, 2015). Une méta-analyse de la littérature a pu notamment illustrer l'effet négatif de l'infiltration de TAM sur la survie de patients atteints de cancer de sein, de la vessie, des ovaires, des voies aériennes et de la thyroïde (Zhang et al., 2012).

Comme nous l'avons vu précédemment, CSF-1 est un facteur central dans le développement et l'homéostasie des macrophages, indépendamment de leur origine. Chez les patients atteints de cancer du sein, une surexpression de CSF-1 et de CSF-1R corrèle avec un mauvais pronostique (Qian and Pollard, 2010). De la même manière, la surexpression transgénique du CSF-1 est associée à une accélération de la progression tumorale et à l'augmentation des métastases dans le modèle murin spontané PyMT-MMTV (où l'expression de l'oncogène polyomavirus middle T (PyMT) est dirigée dans l'épithélium mammaire grâce au promoteur mouse mammary tumor virus (MMTV LTR)) (Guy et al., 1992). Au contraire, les souris présentant des mutations récessives invalidantes du gène codant pour CSF-1 ont un développement de cancers invasifs et métastatiques retardés (Lin et al., 2001).

2.3.7.1. Rôle des macrophages dans les tumeurs primaires

Dans les modèles tumoraux murins, les macrophages présentent un profil transcriptionnel et cytokinique immunosuppressif et suppriment directement la prolifération des lymphocytes T

$CD8^+$ (DeNardo et al., 2011; Doedens et al., 2010; Ruffell et al., 2014). Les TAM issus de carcinomes hépatocellulaire et ovarien humains sont également capables de supprimer la prolifération de cellules T autologues ainsi que leur production d'IFNɣ (Kryczek et al., 2006). La production de radicaux libres et le métabolisme de l'arginine via l'expression d'arginase-1 par les TAM sont très largement impliqués dans leur fonction de suppression de la réponse T (Gabrilovich and Nagaraj, 2009). De plus, les TAM ont été démontrés comme étant des producteurs des cytokines immunosuppressives IL-10 et TGFβ (Lin and Pollard, 2004) et expriment les ligands des récepteur PD-1 et CTLA-4 au sein du TME (Noy and Pollard, 2014).

Dans de nombreux modèles tumoraux, les TAM augmentent l'angiogenèse, notamment via la sécrétion de VEGF ou de WNT7b (Welford et al., 2011).

Les TAM sont capables d'induire la migration directionnelle et l'invasion des cellules tumorales. La synthèse de CSF-1 par les tumeurs et du facteur de croissance épidermique (EGF) par les TAM créent une boucle paracrine induisant l'accumulation des cellules tumorales autour des vaisseaux sanguins (Wyckoff et al., 2004). Les TAM sont ensuite capables de promouvoir l'intravasation des tumeurs dans la circulation (Wyckoff et al., 2007).

L'osteonectine produite par les TAM augmente les interactions des cellules tumorales avec l'ECM (Sangaletti et al., 2008).

Les TAM produisent des protéases telles que la cathepsine ou des métalloprotéases matricielles (MMPs) afin de remodeler l'ECM et relarguer les facteurs de croissance séquestrés (Quail and Joyce, 2013).

Plus récemment, les TAM ont été démontrés comme participant activement à la construction et à l'assemblage de la matrice de collagène en sécrétant du collagène de type I, VI et XIV et en augmentant les fonctions des fibroblastes (Afik et al., 2016).

Le phénotype des TAM est hétérogène et peut varier en fonction de différentes tumeurs ou de différentes zones de la même tumeur. Ainsi, des marqueurs de type M2 sont enrichis dans les macrophages des zones hypoxiques du TME. Ces TAM sont associés à des activités pro-tumorales et suppressives augmentées (Chittezhath et al., 2014; Movahedi et al., 2010).

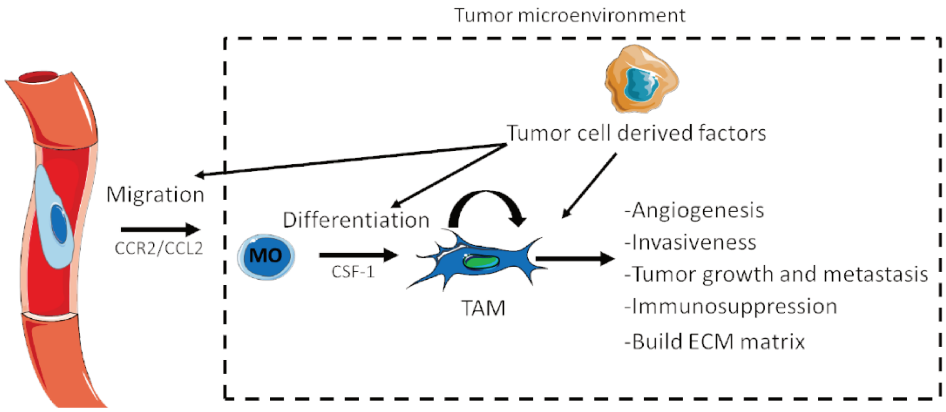


Figure 19 : Résumé du développement des TAM et de leurs fonctions protumorales. Sous l'action de différents facteurs dérivés des tumeurs, les monocytes ou M-MDSC circulants sont recrutés dans les tumeurs via l'axe CCR2/CCL2 et se différencient en TAM qui ont la capacité de proliférer. Via différents mécanismes, les TAM augmentent l'angiogenèse, l'invasion, la croissance tumorale, les métastases, l'immunosuppression et participent à la construction de la matrice extracellulaire associée à la tumeur.

2.3.7.2. Rôle des macrophages dans les métastases

Une fois dans la circulation les cellules tumorales peuvent établir des métastases dans des sites distants. Les métastases sont les principales causes de mortalité de patients atteints de tumeur solides. Les monocytes et les macrophages sont des acteurs essentiels à la fois pour préparer le site métastatique et pour promouvoir l'extravasation, la survie et le maintien des cellules métastatiques. Il a été proposé que sous l'influence de la tumeur primaire, des niches pré-métastiques se forment. Ces dernières favorisent la migration des cellules métastatiques et la formation de métastase dans des tissus particuliers. Les niches pré-métastiques pulmonaires sont peuplées de cellules myéloïdes $CD11b^{+}$ $VEGFR1^{+}$. Il a été proposé que le VEGF joue un rôle dans le recrutement de ces cellules myéloïdes puisqu'un antagoniste du VEGFR inhibe leur accumulation et la formation de métastases (Kaplan et al., 2005). L'éducation des macrophages via des exosomes dérivés de la tumeur primaire (Zomer et al., 2015) ou encore le dépôt de fibrine par les plaquettes qui attirent de nouveaux macrophages (Gil-Bernabe et al., 2012) sont d'autres facteurs pouvant favoriser la formation des niches métastatiques. L'imagerie intravitale du poumon a pu confirmer que les macrophages ou monocytes sont en contact avec les premières cellules métastatiques qui atteignent le poumon (Headley et al., 2016). Ces agrégats de cellules tumorales et macrophages permettent de recruter d'autres cellules tumorales circulantes et favoriser la persistance des métastases. Une fois établies, les métastases sécrètent du CCL2 afin de générer un gradient chimioattractant pour les monocytes $Ly6C^{high}$. Le VEGF sécrété par les monocytes et les macrophages peut également augmenter la perméabilité des vaisseaux et l'extravasation des cellules tumorales (Qian et al., 2011). L'ablation des populations de macrophages du poumon permet d'inhiber à la fois la formation de métastase et

la croissance de métastases établies (Qian et al., 2011). La signalisation par le CSF1 et l'engagement des cellules tumorales via VCAM1 sont impliqués dans ces phénomènes (Chen et al., 2011).

Les cellules myéloïdes peuvent également promouvoir la transition épithélio-mésenchymateuse en inhibant la signalisation du TGFβ dans les cellules épithéliales pré-métastatiques (Gao et al., 2012).

Les ostéoclastes ou 'macrophages des os' sont souvent activés par les cellules métastatiques afin de dégrader les os et relarguer des facteurs de croissances pour le développement des métastases osseuses (Camacho and pienta 2014).

En conclusion, les macrophages sont recrutés dans des niches pré-métastatiques en réponse à des facteurs produits par la tumeur primaire. Une fois que les cellules tumorales arrivent au site métastatique et extravasent, d'autres macrophages sont recrutés à partir de monocytes circulants. Ces macrophages augmentent l'habilité d'autres cellules tumorales à extravaser mais également la survie et la croissance des métastases. Différents facteurs de croissances et voies de signalisation tels le VEGF et le CSF1 sont importants dans les fonctions pro-métastatiques des macrophages **(Figure 20)**.

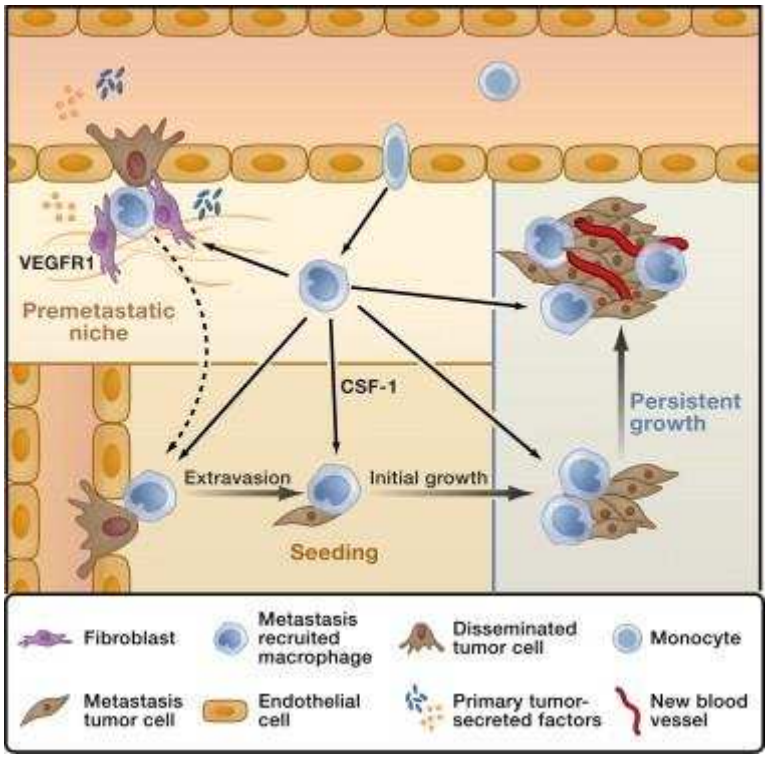


Figure 20 : Les macrophages participent à l'établissement et à la croissance des métastases (Qian and Pollard, 2010)

3. Impacts des thérapies conventionnelles sur la réponse antitumorales.

3.1. L'induction de l'immunité antitumorale par les thérapies anticancéreuses

En 2002, l'équipe de Steven Rosenberg décrit la régression de mélanomes métastatiques chez des patients ayant reçu un transfert adoptif de lymphocytes T après un traitement de 7 jours au cyclophosphamide et fludarabine. Les lymphocytes T transférés pouvaient représenter jusqu'à 80% des lymphocytes périphériques 5 mois après le transfert, indiquant un repeuplement clonale et une réponse antitumorale durable (Dudley et al., 2002). Chez la souris, la chimiothérapie et la radiothérapie sont également capables d'augmenter la génération, l'infiltration et l'effet antitumoral de CTL après un transfert adoptif (Boissonnas et al., 2013; Takeshima et al., 2010). Une des hypothèses pouvant expliquer ces phénomènes serait l'augmentation de l'immunogénicité des tumeurs après le traitement. Par exemple, une augmentation de l'expression de MHCI par les cellules tumorales a été observée après traitement au 5-fluorouracil (5-Fu)(Khallouf et al., 2012), gemcitabine (Xu et al., 2011) ou après une radiothérapie (Lugade et al., 2008) dans des modèles murins.

L'augmentation de l'immunogénicité permet d'induire une réponse adaptive uniquement en présence de signaux immunostimulateurs appropriés. Dans un contexte infectieux, ces signaux peuvent être des structures microbiennes conservées appelées 'microbe-associated molecular patterns' (MAMP) tels que le lipopolysaccharide bactérien ou l'ARN double brin des virus. Dans le contexte de thérapies anti-cancéreuses conventionnelles, des molécules libérées ou exposées à la surface de cellules tumorales mourantes ou stressées, appelées 'damage-associated molecular patterns' (DAMP) peuvent avoir des effets immunostimulateurs. En favorisant l'apparition de ces DAMP, la radiothérapie et les chimiothérapies telles que les anthracyclines et l'oxaliplatine sont considérés comme de puissants inducteurs de mort immunogène **(Figure 21)**.

Les DAMP tels que la calréticuline (CRT), les protéines de choc thermique HSP70 et HSP90, qui sont des chaperons du réticulum endoplasmique, sont capables de stimuler la phagocytose par les DC et semblent induire une réponse contre les antigènes dérivés des cellules tumorales mourantes (Chaput et al., 2007b; Obeid et al., 2007). L'ATP et l'annexine A1 ont des propriétés

chimiotactiques et immunostimulatrices sur les APC lorsqu'ils sont sécrétés dans l'environnement extracellulaire. Les cellules cancéreuses relarguent de l'ATP après un traitement à la doxorubicine, ce qui peut induire un recrutement, une différenciation de cellules myéloïdes en APC et une réponse antitumorale adaptative (Ma et al., 2013). Les interférons de type I peuvent induire une augmentation de la sécrétion de la chimiokines CXCL10 pour augmenter le recrutement de lymphocytes T (Sistigu et al., 2014). La protéine nucléaire HMGB1 pour « high–mobility group box 1» exerce des activités immunostimulatrices durables lorsqu'elle est libérée par les cellules cancéreuses en apoptose (Apetoh et al., 2007).

Les DAMP se lient à des récepteurs de reconnaissances de motifs moléculaires ou PRR exprimés à la surface des cellules immunitaires. Une expression différentielle de PRR pourrait expliquer la diversité des réponses immunitaires induites par différents sous-types d'APC (Segura et al., 2010). D'autre part, des déficiences pour les récepteurs PRR P2x7 (principal récepteur purinérgique reconnaissant l'ATP)(Ghiringhelli et al., 2009), TLR4 (impliqué dans la reconnaissance de HMGB1)(Apetoh et al., 2007) ou pour le peptide N-formyle Frp1 (impliqué dans la reconnaissance de l'annexine A1)(Vacchelli et al., 2015) entrainent un défaut de réponse à des agents chimiothérapeutiques dans les modèles tumoraux. Des pertes fonctionnelles dans les gènes codants pour ces mêmes récepteurs sont associées à une réduction de la survie de patients atteints de carcinomes mammaires après traitement aux anthracyclines (Vacchelli et al., 2016). Certains DAMP peuvent servir de ligand du NKG2D et sont donc important pour la reconnaissance et l'élimination des tumeurs par les cellules NK (Raulet et al., 2013).

Pour finir, certaines chimiothérapies peuvent avoir une action directe sur les cellules immunosuppressives. De nombreuses études indiquent que le cyclophosphamide à faible dose permet de dépléter préférentiellement les lymphocytes T régulateurs comparés aux lymphocytes T $CD4^+$ conventionnels ou $CD8^+$, aussi bien in vivo dans des modèles murins que chez des patients (Le and Jaffee, 2012). La doxorubicine peut également réduire le nombre de MDSC afin d'augmenter et d'améliorer l'action antitumorale de CTL transférés (Alizadeh et al., 2014).

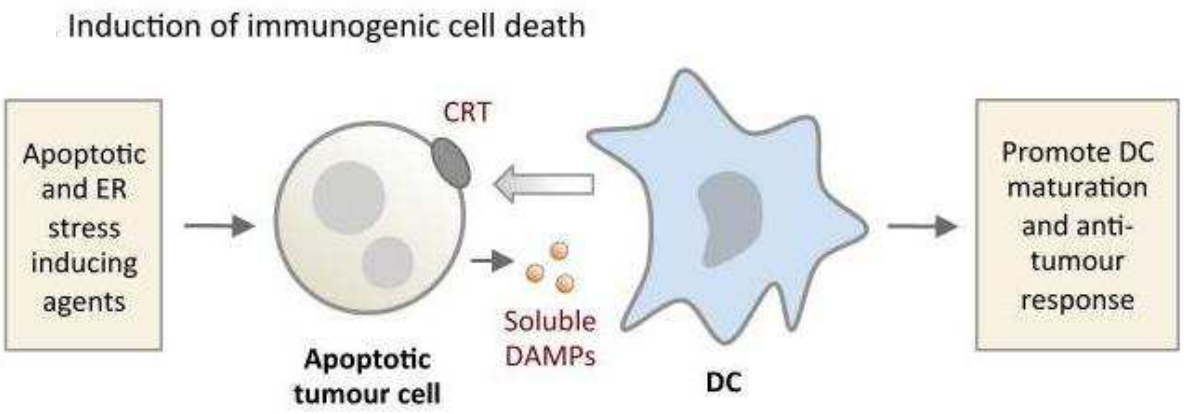


Figure 21: L'exposition de la calréticuline (CRT) à la surface des cellules tumorales apoptotiques ou le relargage de DAMP après certains traitements anti-cancéreux peuvent augmenter la phagocytose et la maturation des DC afin d'initier une réponse antitumorale.

3.2. Rôles protumoraux des macrophages et MDSC en réponse aux thérapies anticancéreuses

La chimiothérapie et les radiothérapies restent les principales modalités de traitements pour de nombreux cancers. Ces traitements peuvent en revanche être associés à une phase de rechute et/ou de résistance qui représentent des problèmes cliniques majeurs, particulièrement pour les patients atteints de tumeurs inopérables. Chez des patients atteints de cancer ovarien (Hughes-Davies et al., 2003), pulmonaire (El Sharouni et al., 2003) ou oropharyngé (Day et al., 1994), une repopulation accélérée des cellules tumorales après chimiothérapie a même été observée. La rechute après chimio- ou radiothérapie est également observable dans les modèles murins (Durand, 1989).

3.2.1. Rôle des macrophages et MDSC dans la réponse à la chimiothérapie

La chimiothérapie induit la mort des cellules qui se divisent rapidement ; elle est donc administrée avec des intervalles de 1 à 3 semaines entre chaque cycle pour permettre la reconstitution des cellules hématopoïétiques.

Les chimiothérapies inhibent ou activent la réponse antitumorale en fonction du contexte et peuvent directement affecter les monocytes et les macrophages. Comme nous l'avons vu précédemment, certaines chimiothérapies peuvent rapidement induire une réponse antitumorale adaptative, notamment via l'induction d'une mort immunogène. Sur le long terme, la balance semble en revanche revenir en faveur de fonctions protumorales. De nombreuses études

s'accordent sur le fait que la chimiothérapie peut augmenter les fonctions protumorales et pro-métastatiques des cellules saines de l'hôte, augmentant ainsi les risques de rechute.

L'effet synergique de la combinaison d'un transfert adoptif de CTL avec de la chimiothérapie peut être transitoire. Une phase d'immunosuppression des CTL transférés est observable 7 jours après l'injection de cyclophosphamide dans le modèle de tumeur MCA. Cette phase d'immunosuppression a été associée à un piégeage des CTL par les TAM dans les régions distales de la tumeur, empêchant ainsi l'infiltration profonde des CTL. Il a été ainsi proposé que les interactions TAM-CTL sont impliquées dans la phase de rechute post-chimiothérapie et que les TAM représentent une barrière physique à l'infiltration des CTL (Boissonnas et al., 2013).

Une mobilisation et un influx dans la tumeur de cellules dérivées de la moelle osseuse est observé après des fortes doses de chimiothérapie (Bertolini et al., 2003). Cette mobilisation implique différentes cytokines, chimiokines, facteurs de croissance et enzymes. En particulier, le MMP-9, le G-CSF, le VEGF et l'IL-6 sont élevés dans le plasma de souris après chimiothérapie (Shaked and Kerbel, 2007). Ce phénomène pourrait augmenter le nombre de monocyte circulant pouvant être recruté par la tumeur pour se différencier en TAM.

Des évidences sur un rôle protecteur de la tumeur par les macrophages lors de traitements chimiothérapeutiques sont issues d'expériences in vitro, in vivo et d'études cliniques.

Des macrophages $CD206^{+}$, $Tie2^{high}$ s'accumulent autour des vaisseaux tumoraux après traitement au cyclophosphamide, où ils participent à la revascularisation et à la rechute. L'ablation génétique du VEGF spécifiquement dans les monocytes et/ou les macrophages permet de prévenir la rechute (Hughes et al., 2015).

L'augmentation de l'activité des TAM via le CSF-1 est impliquée dans leurs fonctions protumorales après chimiothérapie. Ainsi, des patients atteints de cancer du sein ont une infiltration de TAM et une expression des cytokines CSF-1 et IL-34 augmentée après traitement au paclitaxel. L'utilisation d'antagonistes du CSFR permet de réduire le nombre de macrophages et d'augmenter l'efficacité du paclitaxel, la survie et la réponse antitumorale des lymphocytes T $CD8^{+}$ dans le modèle PyMT (DeNardo et al., 2011). Dans ce même modèle, l'IL-10 dérivé des macrophages bloque la réponse à la chimiothérapie dépendante des lymphocytes T $CD8^{+}$ en supprimant la sécrétion d'IL-12 induite par les DAMP dans les DC de la tumeur **(Figure 22)**. Des résultats similaires sur l'augmentation de l'efficacité du

carboplatine et paclitaxel sont obtenus après blocage du récepteur à l'IL-10 ou la neutralisation du CSF-1 (Ruffell et al., 2014).

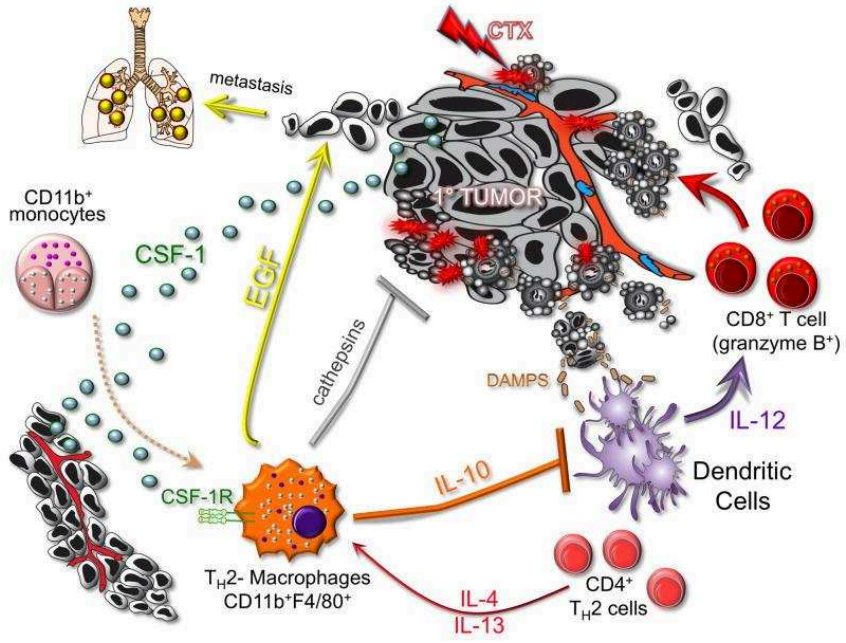


Figure 22 : Modèle de suppression de la réponse antitumorale par les macrophages en réponse à la chimiothérapie. La chimiothérapie induit un influx de monocytes dans la tumeur, ces derniers se différencient en macrophages sous l'influence du CSF-1. Les TAM peuvent stimuler la rechute et la résistance des tumeurs, notamment via la sécrétion de cathepsine. Les TAM limitent l'activité des CTL ainsi que la réponse à la chimiothérapie. L'IL-10 produit par les macrophages bloque la production d'IL-12 par les DC en réponse aux DAMP. En absence d'IL-10, l'IL12 induit une meilleure réponse T CD8+ et augmente l'efficacité de la chimiothérapie (Ruffell et al., 2014).

Dans un modèle de cancer du pancréas l'inhibition de la survie des TAM par un anticorps anti-CSF-1 ou un inhibiteur du CSF-1R et/ou l'inhibition du recrutement de TAM grâce à un inhibiteur du CCR2 permet de lever l'immunosuppression et d'augmenter la réponse à la gemcitabine (Mitchem et al., 2013). Le traitement de 10 lignées différentes de cancers ovariens ou des cervicales au cisplatine ou au carboplatine augmente la production d'IL-6 par les cellules tumorales, favorisant ainsi la différenciation de macrophages M2 producteur d'IL-10 (Dijkgraaf et al., 2013).

La sécrétion de cathepsines par les cellules myéloïdes semble avoir un rôle chimioprotecteur sur les cellules tumorales dans le modèle PyMT (Ruan et al., 2015). La cathepsine B peut également induire une production d'IL-1β par MDSC, ce qui a été montré comme réduisant l'efficacité antitumorale d'un traitement à la gemcitabine ou au 5-Fu (Bruchard et al., 2013).

Chez des patients atteints de tumeur du pancréas, une augmentation du nombre de cellules myéloïdes dans la tumeur a été observée après traitement gemcitabine. L'expression de GM-CSF dans ces tumeurs est associée à un mauvais pronostique. Une forte infiltration de TAM chez les patients de cancer oropharyngé ou VADS corrèle avec une mauvaise réponse aux

chimiothérapies telles que le 5-Fu, le cisplatine ainsi qu'à la radiothérapie (Matsuoka et al., 2016; Mori et al., 2011). Dans le cancer du poumon, une accumulation de M-MDSC circulants est négativement corrélée avec la réponse aux chimiothérapies standards (Sharma et al., 2012; Vetsika et al., 2014).

3.2.2. Rôles des macrophages et MDSC dans la réponse à la radiothérapie

L'impact de la radiothérapie sur les macrophages est moins connu. Dans des modèles de cancer du pancréas et de mélanome, de faibles doses d'irradiation gamma peuvent induire la différenciation des macrophages vers un phénotype M1 exprimant l'iNOS. L'iNOS permet notamment d'induire la production de cytokines de type Th1 permettant à ces macrophages d'améliorer le rejet tumoral par les lymphocytes T (Klug et al., 2013). Le traitement des tumeurs par des fortes doses de rayons X favorise en revanche l'apparition de zones hypoxiques et un phénotype M2 des macrophages (Chiang et al., 2012). L'augmentation de la production d'IL-6 dans le TME est associée à une infiltration de macrophages après radiothérapie ciblée de cancers du poumon chez la souris (Wang et al., 2017). Le blocage pharmacologique de l'axe CCR2/CCL2 (Connolly et al., 2016) ou de la signalisation par le CSF-1R (Mok et al., 2014) réduit l'infiltrat de TAM et augmente l'efficacité de la radiothérapie dans les modèles murins.

En conclusion, différents facteurs induits par les thérapies anticancéreuses contribuent à la rechute des tumeurs. Le ciblage des réponses cellulaires et moléculaires générées par la chimiothérapie ou la radiothérapie chez l'hôte permet d'améliorer l'effet antitumoral. Le CSF-1 et le recrutement de monocytes via l'axe CCR2/CCL2 jouent des rôles prépondérants dans ces contextes. Les TAM semblent engager un programme de régénération tissulaire induit par les thérapies anticancéreuses conventionnelles. Ce programme est associé à la rechute des tumeurs et limite l'efficacité des traitements.

4. L'axe chimiokinique CCR2/CCL2

4.1 Biologie de CCL2 et CCR2

Les chimiokines peuvent être classées en 4 sous-familles CXC, CC, CX3C et C basées sur le nombre et la localisation des résidus cystéines à l'extrémité N-terminale. Plus de 50 chimiokines et 20 récepteurs de chimiokines ont été identifiés. Les chimiokines dirigent la migration des cellules exprimant les récepteurs de chimiokines couplés aux protéines G appropriés le long de gradients chimiokiniques (Rollins, 1997). La migration et le recrutement préférentiel de différents types cellulaires sont déterminants pour les interactions, communications et les fonctions cellulaires. Le contrôle de la migration des cellules par les chimiokines est impliqué dans des mécanismes d'organogénèse, d'homéostasie cellulaire, de régulation de la réponse immunitaire et de l'inflammation aiguë et chronique. Au-delà de leur rôle dans la migration, les chimiokines peuvent contrôler la prolifération, la survie, la sécrétion de cytokine et les capacités phagocytaires (Griffith et al., 2014). Comme nous l'avons vue précédemment, les chimiokines et récepteurs de chimiokines sont très largement impliquées dans la mise en place de la réponse antitumorale et dans l'échappement des tumeurs à cette réponse.

La chimiokine CCL2 (Chemokine ligand 2), aussi appelée MCP1 pour « monocyte chimioattractant protein 1 », est la première chimiokine a motif CC découverte chez l'homme. Deux équipes indépendantes ont purifié le CCL2 en 1989 à partir de lignées monocytaires (Matsushima et al., 1989) et de myélomes humains (Yoshimura et al., 1989), sur la base de sa capacité à faire migrer les monocytes. Le gène CCL2 de souris présente 75% d'homologie avec le gène humain. En plus des monocytes, le CCL2 présente des activités chimioattractantes pour les cellules NK et les cellules T mémoires.

Le CCL2 se lie préférentiellement et avec forte affinité au CCR2, ce récepteur étant exprimé dans différents tissus tels que le sang, le cerveau, le cœur, le foie, le poumon, les ovaires, le pancréas, la moelle épinière, la rate ou le thymus. Les deux isoformes CCR2A et CCR2B diffèrent de 50 paires de bases dans leur extrémité C-terminale et sont issus de l'épissage alternatif du Ccr2. Le CCR2B est l'isoforme le plus exprimé (90% de l'expression)(O'Connor et al., 2015). La liaison du CCL2 aux CCR2A ou CCR2B pourrait déclencher des réponses biologiques différentes, comme démontré dans la lignée de lymphocyte T Jurkat (Sanders et

al., 2000). L'expression préférentielle des isoformes de CCR2 par différentes cellules pourrait servir de mécanisme de régulation fonctionnelle.

Le CCL2 peut se lier à d'autres récepteurs de chimiokines que le CCR2. Le CCL2 a été reporté comme étant capable se lier au CCR4 et aux deux récepteurs de chimiokines atypiques ACKR1 et ACKR2 (O'Connor et al., 2015). Ces récepteurs atypiques ne sont pas couplés à des protéines G et sont donc considérés comme des récepteurs leurres qui n'engendrent pas d'activité chimiotactique. Les ACKR entre en compétition avec les récepteurs couplés aux protéines G pour la liaison avec le CCL2 et peuvent ainsi moduler les niveaux de CCL2 libre. Les autres chimiokines de la famille MCP, MCP-2(CCL8), MCP-3(CCL7) et MCP-4 (CCL13) ont des similarités structurelles avec le CCL2 et sont probablement issus d'une duplication génique. Ils peuvent se lier au CCR2, suggérant une possible redondance dans la fonction des chimiokines. Le fait que le CCL2 et le CCR2 se lient à d'autres récepteurs et ligands respectivement, rend la compréhension de l'effet spécifique de la signalisation via CCL2-CCR2 difficile. En revanche, l'interaction CCR2-CCL2 semble être dominante in vivo, puisque les souris déficientes en CCL2 ont le plus souvent un phénotype similaire aux souris déficientes en CCR2 (Zhang et al., 2010).

L'axe CCR2/CCCL2 joue un rôle crucial dans le recrutement et le trafic des monocytes $Ly6C^{high}$ au cours d'une infection ou dans le recrutement au niveau d'une lésion inflammatoire (Serbina and Pamer, 2006). Les souris $Ccr2^{-/-}$ sont caractérisées par une accumulation médullaire des monocytes $Ly6C^{high}$. A l'opposé, elles présentent un défaut de ces cellules dans le sang et dans les organes lymphoïdes périphériques (Nahrendorf et al., 2007; Swirski et al., 2009). D'un point de vue physiopathologique, les souris déficientes pour CCR2 ont une susceptibilité d'infection accrue vis à vis de nombreux pathogènes (Listeria Monocytogenes, Cryptococcus Neoformans, virus de West Nile) (Shi and Pamer, 2011). A l'inverse, les souris $Ccr2^{-/-}$ sont protégées dans un certain nombre de pathologies inflammatoires comme l'athérosclérose (Boring et al., 1998), ainsi que dans un modèle expérimental de sclérose en plaque, l'EAE (Experimental Autoimmune Encephalitis) (Fife et al., 2000).

4.2 L'axe CCR2/CCL2 comme cible thérapeutique contre les cancers

Dans les modèles murins, l'axe CCR2/CCL2 est très largement impliqué dans le recrutement de monocytes qui se différencient en TAMs avec des fonctions protumorales, pro-métastatiques et de chimiorésistance comme nous l'avons vue précédemment. De plus, cet axe peut directement augmenter la migration et l'invasion de cellules de différentes lignées tumorales (Lim et al., 2016).

Des variations génétiques de CCR2 ou CCL2 sont associées à divers cancers. Un polymorphisme d'un seul nucléotide dans le promoteur du CCL2, substituant une adénine par une guanine en position -2518 (CCL2-2518G), est associé à une augmentation de la sécrétion de CCL2. Le polymorphisme CCL2-2518G présente une fréquence allélique de 30% et est associé à une augmentation du développement de cancers du sein et gastriques. Ce polymorphisme est également associé à un mauvais pronostique après radiothérapie des cancers VADS (Sun et al., 2011). Le polymorphisme V64I du Ccr2 est plus rare, mais une méta-analyse indique qu'il est associé à une augmentation du risque de cancer des cervicales, VADS de la vessie ou de la prostate (Huang et al., 2013).

Des niveaux élevés de CCL2 ont été décrit chez des patients atteints de cancer du sein, du colon, de la prostate, de l'intestin, des ovaires ou de la peau (Lim et al., 2016). Une méta-analyse de base de données d'expression génique a identifié le CCL2 comme favorisant le développement du cancer de la prostate (Tsaur et al., 2015). Dans les cancers ovariens, les niveaux sanguin de CCL2 corrèlent avec le grade histologique et permet de différencier les kystes bénins des cancers ovariens. Le CCL2 est surexprimé dans les tumeurs, les effusions pleurales et dans le sérum de patients atteints de cancers mammaires (Saji et al., 2001; Valkovic et al., 1998). Une augmentation du niveau de CCL2 dans la circulation sanguine et dans le TME corrèle avec la progression tumorale, l'agressivité et la rechute après thérapies et un mauvais pronostique dans ces cancers. Le CCL2 est également élevé de manière significative dans le sérum et dans les tumeurs de patients atteints de cancers gastriques et colorectaux (Zhang et al., 2010). Le CCL2 peut donc servir de marqueur pronostique indépendant du développement des cancers et des réponses aux thérapies.

Pour toutes ces raisons, des essais cliniques ont été mis en place afin de tester la tolérabilité et l'efficacité de blocage pharmacologique de CCR2 ou CCL2. L'anticorps, Carlumab est un

anticorps monoclonal qui se lie au CCL2, inhibant ainsi sa liaison au CCR2. Cet anticorps a été testé seul ou en combinaison avec des chimiothérapies standards, chez des patients atteints de différentes tumeurs solides (essai clinique NCT005373680). Chez la plupart des patients le traitement est bien toléré et n'engendre pas d'effets secondaires additionnels. Malheureusement, le niveau de CCL2 circulant dans ces patients, bien qu'initialement réduit, ré-augmente rapidement pour atteindre des niveaux supérieurs à ceux observés avant le traitement. De plus, le traitement ne semblait pas engendrer de réponse clinique significative. Il a donc été conclu que le Carlumab n'est pas efficace pour une inhibition durable du CCL2 chez l'homme. Chez la souris, l'arrêt d'un traitement par l'anti-CCL2 accélère la formation de métastases de cancer mammaire (Bonapace et al., 2014). Un anticorps humanisé (MLN1202) a été démontré comme spécifique du CCR2. Cet anticorps est testé dans un essai clinique de phase 2 (essai clinique NCT01015560) incluant des patients ayant différents cancers avec des métastases osseuses. Comme le Carlumab, le MLN1202 a été bien toléré par la plupart des patients. L'impact précis du MLN1202 sur la réponse antitumorale n'a pas encore été révélé.

D'autres inhibiteurs de CCR2 ont été développés (Carter et al., 2015; Doyon et al., 2008) et la structure cristalline du CCR2 avec ses antagonistes a été récemment révélée. Le BMS-681 empêche la liaison de chimiokines dans une poche orthosterique du récepteur. L'antagoniste CCR2-RA-[R] occupe une nouvelle poche allostérique intracellulaire. Ce site de liaison est superposé au site de liaison de la protéine G, empêchant ainsi de manière non-compétitive sa liaison mais également le changement conformationnel associé à l'activation du récepteur. Cette découverte pourrait être exploitée pour le « design » de nouvelles molécules ciblant l'axe CCR2/CCL2. Le CCR2 en présence du BMS-681 et du CCR2-RA[R] présente la structure la plus inactive d'un récepteur couplé aux protéines G observé jusqu'à présent (Zheng et al., 2016)(**Figure 23)**. Cette double inhibition pourrait représenter une nouvelle voie thérapeutique.

De nombreuses données cliniques indiquent que l'axe CCR2/CCL2 a un rôle protumoral; cet axe pourrait servir de puissant biomarqueur de l'évolution des tumeurs et de la réponse aux thérapies. Les études mécanistiques indiquent que l'axe CCR2/CCL2 agit principalement sur le compartiment de TAM et de monocytes, mais il n'est pas exclu qu'il agisse de manière directe sur d'autres types cellulaires. Nous décrivons d'ailleurs un rôle additionnel du CCR2 dans le recrutement de Treg dans le TME dans le troisième article de cette thèse.

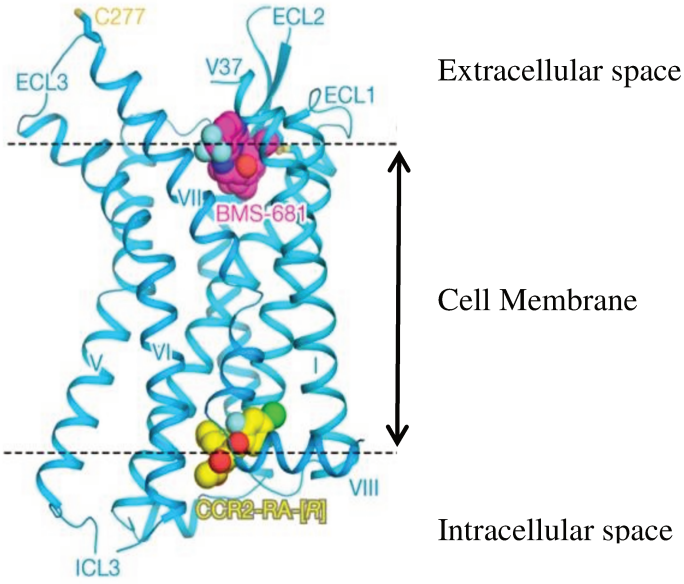


Figure 23 : Structure du CCR2 en présence des antagonistes BMS-681 et CCR2-RA[R]. Le BMS-681 se localise dans une poche extracellulaire orthostérique alors que CCR2-RA[R] est localisé dans une poche intracellulaire allostérique. Adapté de Yi Zheng et al Nature 2016.

Objectifs de la thèse

En raison de l'importance clinique de l'axe CCR2/CCL2, cette thèse s'oriente autour du rôle de ce couple dans la colonisation du TME par les cellules immunitaires immunosuppressives (Treg et TAM) et leurs fonctions; plus particulièrement dans le contexte de thérapies anticancéreuses conventionnelles (Chimio- ou Radiothérapie). Notre hypothèse est que l'expression spécifique de CCR2 par différents types cellulaires immuno-régulateurs joue un rôle majeur sur l'impact de la chimio- ou radiothérapie et sur les mécanismes de rechute.

La thèse s'oriente autour de trois projets de recherches principaux :

1. Dans ce premier projet nous nous intéressons aux réseaux de cellules de l'immunité innée (Monocytes, macrophages et cellules dendritiques), à leur fonction au sein de l'environnent pulmonaire, ainsi qu'à leur contribution à la réponse chimiothérapeutique dans des modèles de métastases pulmonaires.

2. L'étude du rôle de CCR2 en contexte tumoral a jusqu'à présent été focalisée sur les monocytes et macrophages. En raison des résultats préliminaires indiquant une réduction du compartiment de Treg dans le TME des souris $Ccr2^{-/-}$, ce projet vise à explorer le rôle de l'expression de CCR2 par les Treg en contexte tumoral.

3- Dans le troisième projet nous nous intéressons au rôle de CCR2 dans le recrutement à la fois de Treg et de macrophages et aux interactions TAM-Treg en réponse à la radiothérapie de tumeurs VADS.

Les objectifs de cette thèse sont les suivants :

-Déterminer le rôle de CCR2 dans l'aplasie et le recouvrement des cellules immunosuppressives après chimiothérapie ou radiothérapie en contexte tumoral.

-Caractériser phénotypiquement et fonctionnellement les compartiments myéloïdes et Treg dans nos différents modèles expérimentaux.

-Analyser le comportement, les propriétés migratoires, les interactions et distributions spatiales des cellules d'intérêts in situ.

-Caractériser la dépendance différentielle de l'axe CCR2/CCL2 pour les types cellulaires étudiés au cours des thérapies antimorales conventionnelles.

Résultats

Article 1

« Immune surveillance of the lung by migrating tissue monocytes » Elife 2015.

Article 2

«Anti-VEGF targets tissue-resident and recruited macrophage recovery to limit pulmonary metastasis relapse after chemotherapy» Manuscript en preparation.

Article 3

«CCR2 Influences T Regulatory Cell Migration to Tumors and Serves as a Biomarker of Cyclophosphamide Sensitivity» Cancer research 2016.

Travaux collaboratifs

« Rôle de CCR2 dans le co-recrutement de Treg et monocytes en réponse à la radiothérapie »

Article 1: « Immune surveillance of the lung by migrating tissue monocytes »

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

Elife 2015

Contexte de l'étude

Le poumon est un organe constamment exposé à des agents pathogènes ou des particules nocives, il contient un large répertoire de cellules phagocytaires participant au maintien de l'homéostasie (Macrophages, DC et Monocytes). De nombreuses études se sont intéressées à la fonction et à l'origine des macrophages alvéolaires (AM). Ceux-ci se développent initialement à partir de monocytes fœtaux via le GM-CSF, ont une longue durée de vie, sont capables d'auto-renouvèlement chez l'adulte et ne sont que faiblement remplacés par les monocytes circulants en conditions homéostatiques (12% au bout de 4 mois). Les AM jouent un rôle essentiel dans le nettoyage du surfactant et de particules et microbes inhalés (Guilliams et al., 2013). De nombreuses fonctions ont été attribuées aux DC du poumon dans l'induction de la réponse adaptative au cours de diverses pathologies respiratoires et dans la régulation de l'inflammation des voies aériennes (Thornton et al., 2012). Le rôle et l'origine des macrophages interstitiels sont moins connus, ils pourraient potentiellement participer à la régénération du poumon après des dégâts tissulaires. Concernant les monocytes, de récentes études indiquent qu'en plus de leur rôle de précurseur, ces cellules pourraient être impliquées dans la surveillance immunitaire du poumon sans se différencier en macrophages (Jakubzick et al., 2013).

Différentes lignées de souris rapporteuses de fluorescence ont été développées sur la base de gènes exprimés par les cellules myéloïdes et permettent de suivre par imagerie fonctionnelle le comportement de ces cellules in siu (Sauter et al., 2014a). Dans les souris CSF-1R^{ECFP} (MacBlue) un transgène binaire composé d'éléments du promoteur du CSF-1R dirige l'expression de gal4-VP16. Le facteur de transcription gal4-VP16 active à son tour l'expression d'un transgène UAS-ECFP. Le promoteur du transgène des souris MacBlue est modifié de telle sorte à éliminer l'expression de la fluorescence dans les trophoblastes, les ostéoclastes, les granulocytes. Cette modification élimine également l'expression du transgène dans de

nombreux macrophages tissulaires (Ovchinnikov et al., 2008). Tous les monocytes sanguins chez ces souris MacBlue sont fortement $ECFP^+$, alors que la plupart des macrophages tissulaires n'expriment pas la protéine fluorescente (Sauter et al., 2014a).

Le récepteur de chimiokines CX3CR1 est quant à lui largement exprimé par tous les sous-types de macrophages et monocytes lors de leur développement, incluant les macrophages résident des tissus (Mass et al., 2016), mais son expression peut être perdue dans certains macrophages chez l'adulte (Alvéolaire, péritonéaux, cellules de Kupffer). L'expression du CX3CR1 peut être suivie par l'expression de EGFP dans les souris $Cx3cr1^{egfp/+}$ (Jung et al., 2000).

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la contribution des monocytes comparés aux macrophages et DC dans la surveillance innée du poumon. Pour ce faire, nous avons combiné les rapporteur de fluorescents myéloïdes des souris MacBlue avec les souris transgéniques $Cx3cr1^{egfp/+}$ ce qui nous a permis d'analyser par imagerie la dynamique migratrice des monocytes du poumon in situ, ainsi que leur activité phagocytaire et de les comparéer avec celles des autres cellules phagocytaires du poumon.

Principaux résultats

1-Les souris $Cx3cr1^{egfp}$ X MacBlue permettent d'étudier la dynamique, distribution spatiale et origine de différentes populations mononuclées phagocytaires du poumon

Nous avons montré que l'expression de l'EGFP et de l'ECFP dans les souris $Cx3cr1^{egfp/+}$ X MacBlue permet de discriminer différents sous-types de cellules mononucléés phagocytaires du poumon. Ces résultats ont été confirmés par cytométrie en utilisant une combinaison de marqueurs de surface. Ainsi, les cellules $EGFP^+$ dans ce modèle de souris ont un phénotype correspondant aux macrophages interstitiels ($CD11b^+Ly6C^-CD64^+$) ou aux DC ($CD11b^+CD11c^+MHCII^+$ $Ly6C^-$). La population $EGFP^+ECFP^+$ a un phénotype correspondant aux monocytes $Ly6C^{high}$ et $Ly6C^{low}$, alors que les cellules $ECFP^+$ $EGFP^{low}$ ont un phénotype de macrophages alvéolaires (Figure 2 et 8).

Ces différents sous-types cellulaires présentent également des localisations spécifiques, en accord avec leur phénotype. Les cellules exprimant seulement l'EGFP sont localisées le long de la plèvre du poumon et proches des larges voies aériennes bronchiques. Les AM sont facilement distinguables de pars leur localisation dans lumière alvéolaires et leur signature de fluorescence ($ECFP^+EGFP^{low}$). Les autres cellules $ECFP^+EGFP^+$ peuvent être différenciées des AM de par leur petite taille, morphologie amiboïde et leur localisation au sein du parenchyme

pulmonaire (Figure 1). L'étude de l'organisation spatiale des cellules myéloïdes du poumon a été approfondie en injectant un anticorps anti-CD45 par voie intraveineuse 2 min avant le sacrifice des souris, afin distinguer les cellules vasculaires des cellules extravasculaires par cryométrie (Technique de « Blood/tissue partitioning »). Les monocytes été marqués par l'anti-CD45 I.V à plus de 90%, indiquant qu'ils résident principalement dans les vaisseaux pulmonaires. Bien que largement vasculaire, les monocytes du poumon présentent des différences phénotypiques comparés aux monocytes circulants. Les macrophages interstitiels, alvéolaires et cellules dendritiques n'étaient quasiment pas marquées par l'anti-CD45 I.V, ce qui est en accord avec leur localisation dans le parenchyme ou dans les alvéoles du poumon (Figure 9).

Grace à l'imagerie biphotonique des poumons de souris Cx3cr1$^{egfp/+}$ X MacBlue nous avons caractérisé le comportement et les fonctions des différentes cellules phagocytaires composant le poumon en condition homéostatique. Nous avons pu observer que les petites cellules ECFP$^+$ seules avec une forme amiboïde présentaient deux types de comportements migratoires. Elles sont soit très mobiles avec des mouvements d'aller-retour vers les alvéoles (définies comme ECFP$^+$ patrouilleurs) ou soit relativement immobiles mais projetant des protrusions vers la lumière des alvéoles (définies comme ECFP$^+$ interstitielles) (Figure 5). L'injection de rhodamine dextran a permis de déterminer que les cellules ECFP$^+$ étaient localisées à l'intérieur des vaisseaux ou à l'interface parenchyme/vaisseaux (Vidéo 3). Les AM sont très peu mobiles et effectuent des protrusions uniquement vers la surface luminale des alvéoles. Les macrophages interstitiels EGFP$^+$ ont également des activités protrusives et une dynamique migratrice réduite (comparable à celle des AM) au sein du parenchyme pulmonaire (Figure 5).

Pour étudier l'origine des cellules phagocytaires du poumon, nous avons effectué des expériences de parabiose entre des souris WT (C57BL/6) et des souris Cx3cr1$^{egfp/+}$ X MacBlue. Ainsi les cellules fluorescentes retrouvées dans la souris WT proviennent nécessairement d'une migration par la circulation sanguine. En accord avec leur faible reconstitution monocytaire, les AM n'étaient pas reconstitués dans ces expériences. De plus, la proportion d'AM n'est pas affectée par la déficience en CCR2. De manière intéressante, les macrophages interstitiels exprimant EGFP n'étaient pas non plus repeuplés, indiquant un possible renouvellement indépendant de l'hématopoïèse adulte. Les cellules interstitielles ECFP$^+$EGFP$^+$ sont quant à elles retrouvées dans le poumon des souris WT et présentaient toujours leurs deux types de comportements migratoires, la proportion de ces cellules est en revanche largement réduite dans les poumons des souris Ccr2$^{-/-}$, confirmant leur origine monocytaire (Figure 3 et 4).

2-Les monocytes inflammatoires participent à la surveillance du poumon sans se différencier en macrophages

Afin d'analyser les capacités phagocytaires des différentes populations myéloïdes du poumon, nous avons injecté aux souris des billes de carboxylate fluorescentes, d'une taille de 200nm, par voies aériennes ou intraveineuses. La capacité de capture des billes fluorescentes a été ensuite analysée 4 heures après leur injection par cytométrie de flux. Les monocytes étaient les cellules avec la plus forte capacité de capture de billes injectées par voie intraveineuse, en accord avec leur localisation intravasculaire. De manière surprenante, même si les AM présentaient la plus forte capacité de phagocytose de particules aériennes en nombre, les monocytes ont des capacités de phagocytose similaire à celles des DC et macrophages interstitiels. Les monocytes phagocytaires ou non présentent le même phénotype et niveau de marquage par l'anti-CD45 in vivo, indiquant qu'ils sont capables de capturer des particules aériennes depuis l'intérieur des vaisseaux du poumon (Figure 8 et 9F).

Discussions et perspectives

Dans l'ensemble, notre étude a fourni d'importantes connaissances fondamentales sur le comportement des monocytes tissulaires au cours du processus de surveillance immunitaire innée d'un tissu biologique clé. Bien qu'il ne fût pas possible de différencier les monocytes Ly6C^{high} des monocytes Ly6C^{low} par imagerie biphotonique, l'énumération des cellules indique que ces deux populations sont représentées de manière égale au sein du poumon. D'autre part, les monocytes Ly6C^{high} phagocytaires étaient plus représentés que les monocytes Ly6C^{low}. L'injection d'un anti-Ly6C fluorescent in vivo nous permettrait de distinguer les deux sous-types de monocytes dans des expériences d'imagerie in situ. Le laboratoire a pu également démontrer un rôle direct des monocytes Ly6C^{high} vasculaires dans la protection des dégâts tissulaires rénaux induits par le sepsis (Chousterman et al., 2016). Nos résultats indiquent que comme démontré pour les monocytes Ly6Clow, les monocytes inflammatoires n'ont pas pour seul rôle de se différencier en macrophages. Le nombre de monocytes marqués par l'anticorps anti-CD45 I.V est peu affecté par un « flush » du poumon, ce qui pourrait être dû à une margination à l'endothélium pulmonaire. Le laboratoire a pu en effet démontrer que les monocytes sont marginés aux vaisseaux du poumon et de la moelle osseuse servent de réservoir pour un déploiement rapide en cas d'inflammation (Hamon et al., 2016).

Les différences phénotypiques des monocytes vasculaires du poumon comparés aux monocytes de la circulation systémique indiquent une possible éducation de ces cellules par l'endothélium

du tissu. Il serait intéressant d'étudier le rôle et le phénotype de ces populations de monocytes dans le système vasculaire d'autres tissus.

L'injection de billes par la voie intranasale afin d'étudier la phagocytose peut présenter des limites. Premièrement, il est difficile de distinguer la localisation exacte des particules (collées à la membrane ou dans des vacuoles phagocytaires). L'utilisation de l'imagerie confocale ou d'un cytomètre capable de prendre simultanément des images de haute résolution de chaque cellule qui passent dans le flux (ImageStream), permettrait de répondre à cette question. D'autre part, il serait intéressant d'effectuer la même expérience avec des billes de plus grosses tailles afin d'exclure une migration passive des particules dans les vaisseaux due à leur perméabilité. Néanmoins, nous avons pu observer que les monocytes sont stratégiquement localisés à l'interface des alvéoles et des capillaires pulmonaires et sont capables de projeter des extensions cytoplasmiques jusqu'à l'intérieur de la lumière alvéolaire. Ceci devrait leur permettre de phagocyter des particules présentes à la fois dans les voies vasculaires et les voies aériennes. Ainsi, les monocytes participent ainsi à la surveillance du poumon sans se différencier en macrophages.

Nous n'avons pas pu détecter de particules fluorescentes dans les ganglions médiastinaux 4 heures après injection intranasale. En revanche, Jakubzick et al ont pu démontrer que les DC avaient de plus fortes capacités de transport de particules inhalées dans les ganglions comparés aux monocytes après 24h. Cela suggère que la majorité des monocytes peuvent capturer les particules pour nettoyer les tissus et filtrer le sang, alors que les DC sont plus spécialisés dans le transport de l'antigène vers les ganglions lymphatiques drainants.

Nos données démontrent que les monocytes participent activement à la surveillance de l'espace interstitiel du poumon. L'organisation spatiale des monocytes tissulaires leur permet de représenter une première ligne de cellules phagocytaires dans le poumon. Comprendre ces activités est une étape clé vers l'amélioration du traitement d'un large éventail de maladies inflammatoires.

eLIFE elifesciences.org

RESEARCH ARTICLE

Immune surveillance of the lung by migrating tissue monocytes

Mathieu P Rodero[1,2,3†], Lucie Poupel[1,2,3†], Pierre-Louis Loyher[1,2,3†], Pauline Hamon[1,2,3], Fabrice Licata[1,2,3], Charlotte Pessel[1,2,3], David A Hume[4], Christophe Combadière[1,2,3], Alexandre Boissonnas[1,2,3*]

[1]Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses, University Pierre et Marie Curie, Sorbonne Universities, Paris, France; [2]Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses, Institut national de la santé et de la recherche médicale, U1135, Paris, France; [3]Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses, Centre national de la recherche scientifique, ERL 8255, Paris, France; [4]Royal (Dick) School of Veterinary Studies, The Roslin Institute, Midlothian, United Kingdom

Abstract Monocytes are phagocytic effector cells in the blood and precursors of resident and inflammatory tissue macrophages. The aim of the current study was to analyse and compare their contribution to innate immune surveillance of the lung in the steady state with macrophage and dendritic cells (DC). ECFP and EGFP transgenic reporters based upon *Csf1r* and *Cx3cr1* distinguish monocytes from resident mononuclear phagocytes. We used these transgenes to study the migratory properties of monocytes and macrophages by functional imaging on explanted lungs. Migratory monocytes were found to be either patrolling within large vessels of the lung or locating at the interface between lung capillaries and alveoli. This spatial organisation gives to monocytes the property to capture fluorescent particles derived from both vascular and airway routes. We conclude that monocytes participate in steady-state surveillance of the lung, in a way that is complementary to resident macrophages and DC, without differentiating into macrophages.
DOI: 10.7554/eLife.07847.001

***For correspondence:** alexandre.boissonnas@upmc.fr

[†]These authors contributed equally to this work

Competing interests: The authors declare that no competing interests exist.

Funding: See page 21

Received: 01 April 2015
Accepted: 10 July 2015
Published: 13 July 2015

Reviewing editor: Ronald N Germain, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, United States

Copyright Rodero et al. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use and redistribution provided that the original author and source are credited.

Introduction

The mononuclear phagocytic system (MPS) consists of a family of cells—including monocytes, macrophages, and dendritic cells (DC)—that are derived from common committed bone marrow progenitors and perform related functions (***Hume, 2006***; ***Hashimoto et al., 2011***). The lung is a mucosal surface of the body, exposed constantly to inhaled particles including pathogens, as well as other potential toxins (***Nelson et al., 2012***). Lung mononuclear phagocytes have been shown to adapt specifically to the lung environment, and contribute to lung homeostasis, scavenging, and immune surveillance (***Kopf et al., 2014***; ***The lungs at the frontlines of immunity, 2014***). Monocytes were originally considered to be circulating precursors of macrophages, participating in renewal of tissue-resident macrophages in steady state and recruited in large numbers in response to inflammatory stimuli (***Auffray et al., 2009***; ***Geissmann et al., 2010***). Fate mapping approaches and parabiosis experiments have been used to argue that tissue-resident macrophages such as alveolar macrophages (AM) may be seeded from the yolk sac or foetal liver during embryonic development and can be maintained in the absence of monocyte recruitment (***Guilliams et al., 2013***; ***Hashimoto et al., 2013***; ***Yona et al., 2013***). However, others have suggested the models used in these studies may disturb the availability of the key growth factor, CSF1, and do not necessarily reflect the steady state (***Jenkins and Hume, 2014***). Whatever their normal contribution to the resident macrophage pool, monocytes derived from the bone marrow (***Chow et al., 2011***) and spleen (***Swirski et al., 2009***) can

eLife digest White blood cells form part of the immune system, which protects the body against infectious diseases and other harmful agents. Some of these cells, including 'mononuclear phagocytes', can reside within different tissues of the body, such as the lungs. Other less specialized cells, called monocytes, circulate in the bloodstream. It had long been thought that once these monocytes had taken up residence in a tissue, they could only develop into tissue-resident phagocytes. Several researchers, however, recently reported that monocytes can also reside within tissues without becoming more specialized. Nevertheless, it remained unclear what these cells did when they were in these tissues.

Rodero, Poupel, Loyher et al. investigated the activities of tissue-resident monocytes found in the lungs of mice. First, mice were genetically engineered to produce fluorescent markers that meant that their monocytes could be easily distinguished from the mononuclear phagocytes in their lungs when viewed under a microscope. Rodero, Poupel, Loyher et al. then showed that the monocytes and the other mononuclear phagocytes localized to different regions of the lung. Further experiments showed that these two groups of cells also moved around the lungs in different ways. The tissue-resident monocytes surveyed both the blood vessels and airways, while the other tissue-resident mononuclear phagocytes only surveyed the airways.

These findings show that lung-resident monocytes perform a different role to those found in the bloodstream. The findings also open the way to improving our understanding of what tissue-resident monocytes do in other organs, and in healthy or diseased animals.

DOI: 10.7554/eLife.07847.002

clearly replenish tissue macrophages after their cytotoxic depletion. Beyond this precursor role, monocytes carry out specific effector functions during infection (**Serbina et al., 2008**) and may be involved in steady-state tissue surveillance by capturing and transporting antigen from tissue to lymphoid organs (**Jakubzick et al., 2013**).

Macrophages isolated from different organs have distinct expression profiles which can be distinguished further if the cells are separated according to their surface markers (**Gautier et al., 2013**). Unfortunately, no available surface marker is well correlated with any other marker, at either the protein or mRNA level (**Hume, 2008**, **2012**; **Hume et al., 2010**), so the number of macrophage subsets definable by flow cytometry is essentially infinite (**Becher et al., 2014**). Peripheral blood monocytes, on the other hand, can be subdivided into two broad functional classes. In the mouse, one subset called classical monocytes, expresses high levels of both Ly6C and the chemokine receptor CCR2 but a low level of the fractalkine (CX3CL1) receptor CX3CR1, while the second, the so-called non-classical monocytes, lacks Ly6C but expresses a high level of CX3CR1 (**Geissmann et al., 2003**).

In contrast to what we know about tissue macrophages, very little information is available on how monocytes behave after entering tissues. Myeloid-restricted fluorescent reporter genes based upon various lineage-restricted genes have been used in live imaging and functional genomics (**Hume, 2011**). A *Csf1r*-EGFP reporter gene serves as a definitive marker of MPS cells (**Sasmono et al., 2003**), while a *Cx3cr1*-EGFP reporter labels the non-classical monocytes as well as subsets of tissue macrophages, including microglia, as well as a subset of natural killer (NK) lymphocytes (**Jung et al., 2000**). The *Itgax*-YFP transgenic mouse was considered to provide a marker for classical 'dendritic cells' (**Lindquist et al., 2004**) and has been used to image so-called interstitial DC in the lung (**Looney et al., 2011**; **Thornton et al., 2012**). However, this reporter is rather uniformly expressed in tissue macrophages associated with mucosa and in the lung provides a generic MPS marker (**Hume, 2008**, **2012**). The deletion of a conserved distal element of the *Csf1r* promoter in the *Csf1r-ECFP*$^{tg/+}$ mouse (MacBlue) ablates expression of a reporter gene in trophoblasts, osteoclasts, granulocytes, and many tissue macrophages (**Ovchinnikov et al., 2008**). This deleted promoter was used to construct an amplified binary transgene in which *Csf1r* promoter elements direct the expression of gal4-VP16, which in turn activates expression of a UAS-ECFP transgene. All blood monocytes in these MacBlue mice are strongly ECFP^{+}, whereas most tissue macrophages do not express the reporter protein (**Sauter et al., 2014**). In the current study, we combined the myeloid-specific fluorescent reporters from MacBlue mice with either *Cx3cr1*$^{gfp/+}$ or *Itgax*-YFP transgenic mice to support in situ imaging of lung monocyte cell trafficking and compare their phagocytic activity with that of resident mononuclear phagocytes.

Results

The MacBlue×*Cx3cr1*$^{gfp/+}$ transgenic mouse discriminates lung mononuclear phagocyte subsets with specific tissue localization

The MacBlue binary transgene (*Csf1r*-gal4VP16/UAS-ECFP) provides a unique marker of blood monocytes (***Jenkins and Hume, 2014***). To confirm this restricted expression in the lung, we generated MacBlue×*Cx3cr1*$^{gfp/+}$ double transgenic mice. Two-photon laser scanning microscopy 3D-reconstruction of fresh explanted lung and histological section of cryo-preserved lungs from these mice identified distinct subsets with distinct morphologies and distributions within the organ (***Figure 1***). Stellar EGFP^{+}ECFP^{neg} cells were seen in the collagen membrane surrounding the lung pleura (***Figure 1A,B***, green squares), deeper in the lung parenchyma with small round shapes or stellar shapes (***Figure 1B***, green squares), and along the basal membranes of bronchial airways (***Figure 1C***, green squares). The luminal side of airways and alveoli contained large round ECFP^{+} cells, likely AM (***Figure 1A–D***, pink squares). Smaller amoeboid-like ECFP^{+} cells were located in the interstitial space

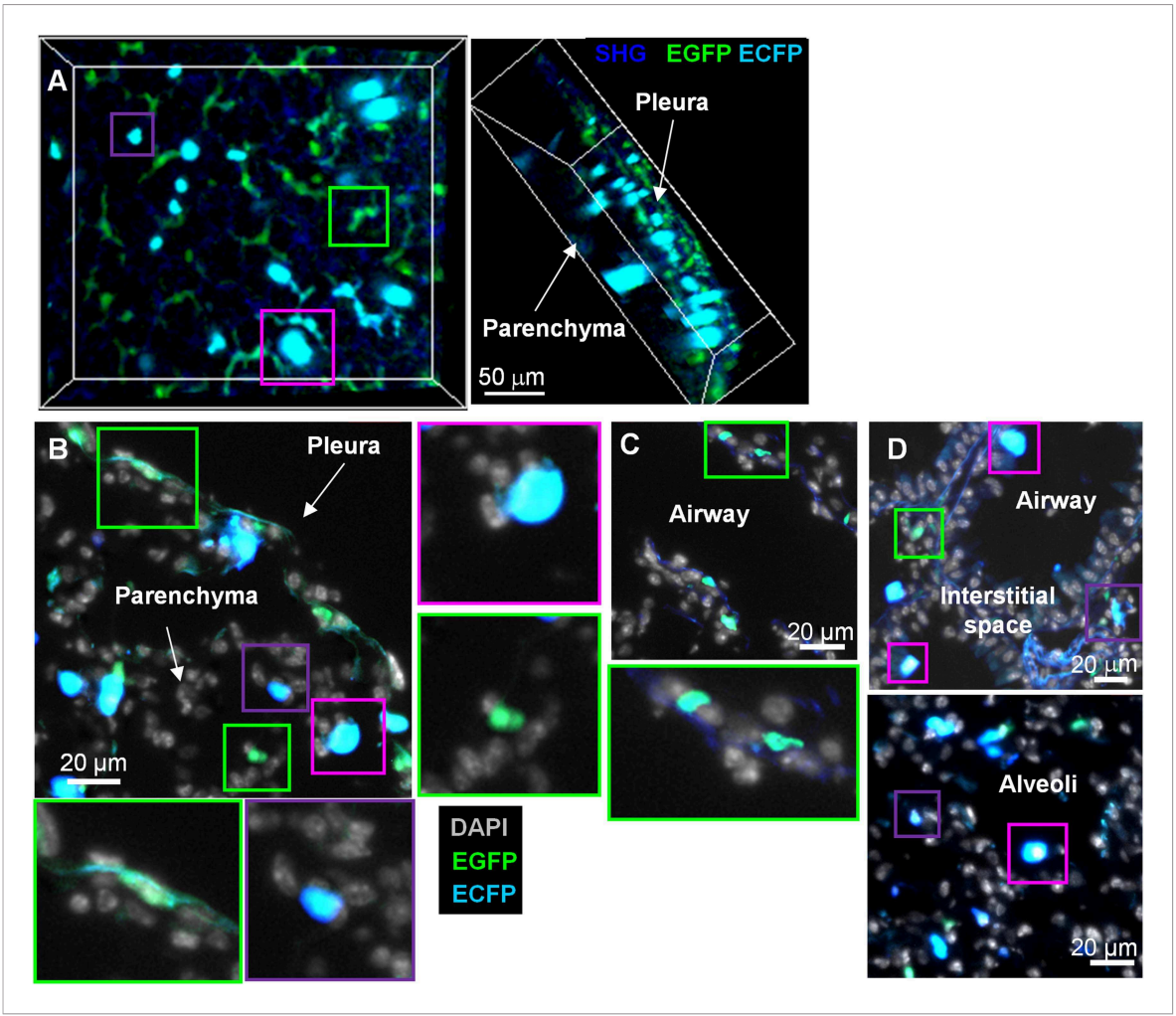


Figure 1. MacBlue×*Cx3cr1*$^{gfp/+}$ transgenic mouse discriminates lung mononuclear phagocyte subsets with specific tissue localization. **(A)** Front and side views of two-photon laser scanning microscopy (TPLSM) 3D reconstruction from pleura to alveolar space of explanted lung from a MacBlue×*Cx3cr1*$^{gfp/+}$ mouse. **(B)** MacBlue×*Cx3cr1*$^{gfp/+}$ mouse lung cryo-section showing lung pleura and parenchyma. **(C)** MacBlue×*Cx3cr1*$^{gfp/+}$ mouse lung cryo-section showing longitudinal view of bronchial airway. **(D)** MacBlue×*Cx3cr1*$^{gfp/+}$ mouse lung cryo-section showing interstitial space near bronchial airways and alveoli. Satellite images represent higher magnification of the corresponding coloured squares for each image. Images are representatives of more than three mice.

DOI: 10.7554/eLife.07847.003

of the lung parenchyma (***Figure 1A–D***, purple squares). In overview, the pattern was consistent with previous evidence that the MacBlue ECFP transgene was expressed only in AM and monocyte-like cells, whereas most interstitial CX3CR1-EGFP expressing cells lacked expression.

Differential fluorescent reporter expression discriminates mononuclear phagocyte subsets

To establish the relationship between the cells that could be imaged in situ and their cellular phenotypes in MacBlue×*Cx3cr1*$^{gfp/+}$ mice, we applied a panel of phenotypic markers including CD11b, CD115, Ly6C, Ly6G, F4/80, CD64, CD11c, IAb, CD62L, NK1.1, and SiglecF to discriminate four different subsets of the lung based on their EGFP/ECFP signature in the double transgenic line (***Figure 2A***) and compared them to blood populations (***Figure 2B*** and ***Table 1***). The lungs contained two ECFP^{bright} populations, either EGFP^{bright} or EGFP^{dim} (***Figure 2A***, purple gate) resembling those observed in the blood (***Figure 2B***). The CX3CR1-EGFP^{low} population was Ly6C^{high}CD11b^{+}Ly6G^{neg}F4/80^{int}NK1.1^{neg}CD64^{+} (blue gate) in both the blood and the lungs (***Table 1***), consistent with identity as 'classical' Ly6C^{high} monocytes (Ly6C^{high} Mo). The CX3CR1-EGFP^{high} population was Ly6C^{low}CD11b^{+} Ly6G^{neg}F4/80^{int}NK1.1^{neg}CD64^{+}CD11c^{+} phenotype (red gate), consistent with the phenotype of the Ly6C^{low} monocyte subset (Ly6C^{low} Mo) (***Guilliams et al., 2014***). For both subsets, the expression of CD115 and CD62L was down modulated in the lung cells compared to their circulating counterparts. Downregulation of surface CSF1R (CD115) could reflect the down-modulation of the surface receptor both by its ligand and by the many inflammatory stimuli present in the lung (***Sester et al., 1999***). As expected, the lung also contained an ECFP^{high}EGFP^{neg} signature (pink gate). These cells were larger than monocytes and CD11b^{+}Ly6C^{neg}Ly6G^{neg}F4/80^{high}NK1.1^{neg}CD11c^{high}CD64^{high}SiglecF^{high} cells, consistent with their identity as AM.

The EGFP^{bright} cells that lacked detectable ECFP (green gate) were a heterogeneous population. A subset of these cells in the lung labelled with NK1.1, but many were CD64^{+}F4/80^{+} (***Figure 2A*** and ***Table 1***) interstitial and pleural macrophages, as observed on histological reconstruction (***Figure 1A***). In the blood, the majority of ECFP^{neg}EGFP^{bright} cells labelled with NK1.1 (***Figure 2B***), but the population also included immature myeloid cells as previously reported (***Sauter et al., 2014***). Note that the ECFP transgene is expressed at low but detectable levels on granulocytes in the blood (cyan gate); these cells were positive for Ly6G (***Figure 2B,C***). In summary, the binary expression of the two transgenic reporters in MacBlue×*Cx3cr1*$^{gfp/+}$ mice permits the identification of monocytes in tissues, and their distinction from other mononuclear phagocyte subsets as well as from NK cells.

Interstitial ECFP^{+} cells are monocyte derived

In order to confirm the monocyte origin of the ECFP^{+}EGFP$^{low/high}$ -Ly6C^{high} and -Ly6C^{low} monocytes, we generated parabionts of the double transgenic MacBlue×*Cx3cr1*$^{gfp/+}$ with C57Bl6 mice and analysed the reconstitution after 1 month of parabiosis. In the lung, donor-derived ECFP cells displayed Ly6C^{high} and Ly6C^{low} monocyte phenotypes (***Figure 3A***), were small in size, with ameboid-like morphologies, and were all located in the interalveolar space (***Figure 3B***). By contrast, neither AM nor interstitial macrophages were derived from the donor as there was no expression of the transgenes in these compartments (***Figure 3B***). The only cells expressing EGFP but not ECFP, were NK cells derived from the donor (***Figure 3A***).

CCR2 and CX3CR1 control the accumulation of lung mononuclear phagocytes

To evaluate the function of chemotactic signals in the lung, we compared the frequency of the different subsets defined above in Ccr2$^{-/-}$, Cx3cr1$^{-/-}$, and Ccr2$^{-/-}$Cx3cr1$^{-/-}$ (dKO) mice in the blood and the lung (***Figure 4***). Consistent with published studies (***Kim et al., 2011***; ***Yona et al., 2013***), the frequency of circulating Ly6C^{high} monocytes was similar in wild-type (WT) and Cx3cr1$^{-/-}$ mice. By contrast, the absence of CX3CR1 did impact on the yield of Ly6C^{high} cells in the lung. As expected, this subset was strongly reduced in Ccr2$^{-/-}$ mice and dKO mice in both the blood and the lungs (***Figure 4B,C***). Ly6C^{low} monocyte frequency was similar in Ccr2$^{-/-}$ mice but significantly reduced in Cx3cr1$^{-/-}$ and dKO mice in both the blood and the lungs compared to WT mice (***Figure 4B,C***). AM frequencies were similar in all strains (***Figure 4C***) consistent with their reported monocyte-independent homeostasis (***Guilliams et al., 2013***). Together, these results showed that CCR2 and

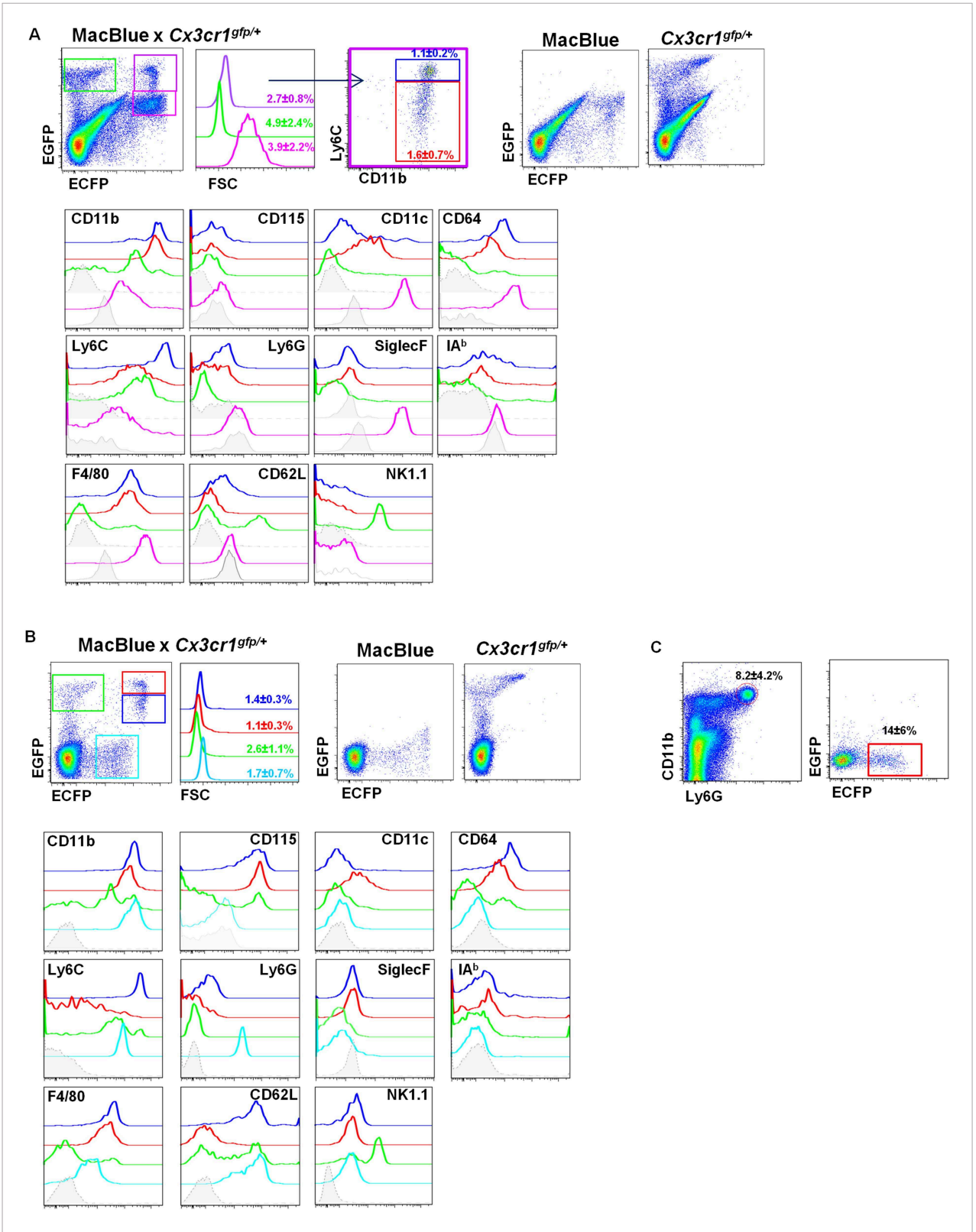


Figure 2. Differential fluorescent reporter expression discriminates mononuclear phagocyte subsets. ECFP and EGFP expression in **(A)** the lungs and **(B)** the blood of MacBlue×*Cx3cr1*$^{gfp/+}$ mice. Colour-coded gating identifies the main subsets according to EGFP/ECFP signature. Percentages ± SD of total cells according to colour code are indicated (n = 6 from two independent experiments). Dot plots showing spectral overlap of EGFP and ECFP fluorescence are depicted using separated MacBlue and *Cx3cr1*$^{gfp/+}$ transgenic mice. Overlay of histogram plots of indicated markers shows the

Figure 2. continued on next page

Figure 2. Continued

phenotype of the respective colour-coded gated cell populations. Grey histograms present the FMO (full minus one) signal gated on total monocytes. For lungs, lower grey histograms present the FMO signal gated on alveolar macrophages (AM) (pink gate). For the blood, the cyan subset expressing a low level of ECFP represents blood neutrophils. **(C)** Dot plots show the intensity and the frequency of ECFP expression on Ly6G$^+$ gated cells in the lungs. Means of percentage ± SD are indicated (n = 6 from two independent experiments).

DOI: 10.7554/eLife.07847.004

CX3CR1 control the steady-state trafficking and survival of both Ly6C^{high} and Ly6C^{low} monocyte-derived cells in the lungs.

Lung mononuclear phagocytes constitutively survey the entire space of the alveolar areas through distinct migratory patterns

Having demonstrated the utility of the MacBlue marker to define monocyte-derived cells, we performed live imaging on explanted lungs to characterize the behaviour of these cells (***Figure 5A*** and ***Video 1***). Small interstitial ECFP$^+$ cells (area 61 ± 17 μm) with an amoeboid-like shape displayed a bimodal behaviour: they were either highly motile, going backwards and forwards between the alveoli, or relatively sessile with protrusions extending towards the lumen of the alveoli (***Figure 5B–C*** and ***Videos 1 and 2***). Based upon these distinct behaviours, we defined 'patrolling' cells with high velocity (10 ± 4.6 μm/min) and a low arrest coefficient (14 ± 13%) and interstitial ECFP$^+$ cells with lower velocity (4 ± 2.2 μm/min) and a higher arrest coefficient (64 ± 21%) (***Figure 5C***). Intravenous injection of rhodamine dextran prior to mouse sacrifice permitted, during a short time frame before vascular leakage, to determine that fast moving patrolling ECFP$^+$ cells were located inside large vessels, whereas slow motile ECFP$^+$ cells appeared to be extravascular but in close contact with the vasculature (***Video 3***). Aside from monocytes, large round ECFP^{bright} AM (area 121 ± 23 μm) were detected in the alveolar lumina, leisurely surveying the surface of the airways with a velocity of 2 ± 1.5 μm/min and a high arrest coefficient (76 ± 19%) (***Video 4***). Interstitial EGFP$^+$ cells also migrated slowly, with comparable velocity and arrest coefficient to AM (***Figure 5C***). To determine their motility coefficient (MC), we plotted the mean square displacement as a function of the square root of time. The MC of patrolling monocytes was 30-fold higher than the MC of interstitial ECFP$^+$ cells (39 vs 1.3 μm/min) and a further fourfold higher than the MC of AM (0.3 μm/min) (***Figure 5D***). This higher MC in interstitial ECFP$^+$ monocytes was attributable to the protrusive activity and slow displacement

Table 1. Comparative phenotype of mononuclear phagocyte (MP) subsets in the blood and the lung

Tissue	Lung	Blood	Lung	Blood	Lung	Blood	Lung
CD11b	++	++	++	++	++/+	++/+	+
CD115	–	++	–	++	–/–	+/–	–
Ly6C	++	++	+/–	+/–	+/+	+/+	–
Ly6G	–	–	–	–	–	–	–
F4/80	+	+	+	+	++/–	+/–	++
CD64	+	+	+	+	++/–	+/–	++
CD11c	–	–	+	+	+/–	+/–	++
IAb	+/–	+/–	+/–	+/–	+/–	–/–	–
CD62L	+	++	–	–	–/+	+/+	–
NK1.1	–	–	–	–	–/++	–/++	–
SiglecF	–	–	–	–	–/–	–/–	++
Conclusion	Ly6C^{high} Mo		Ly6C^{low} Mo		Cx3cr1$^+$ MP/NK		AM

The relative expression of the markers for each subset in the blood and the lungs are compared and specific subsets defined according to the phenotype. ++ : high expression; + : positive expression; – : below FMO (full minus one) signal. AM, alveolar macrophages; NK, natural killer.

DOI: 10.7554/eLife.07847.005

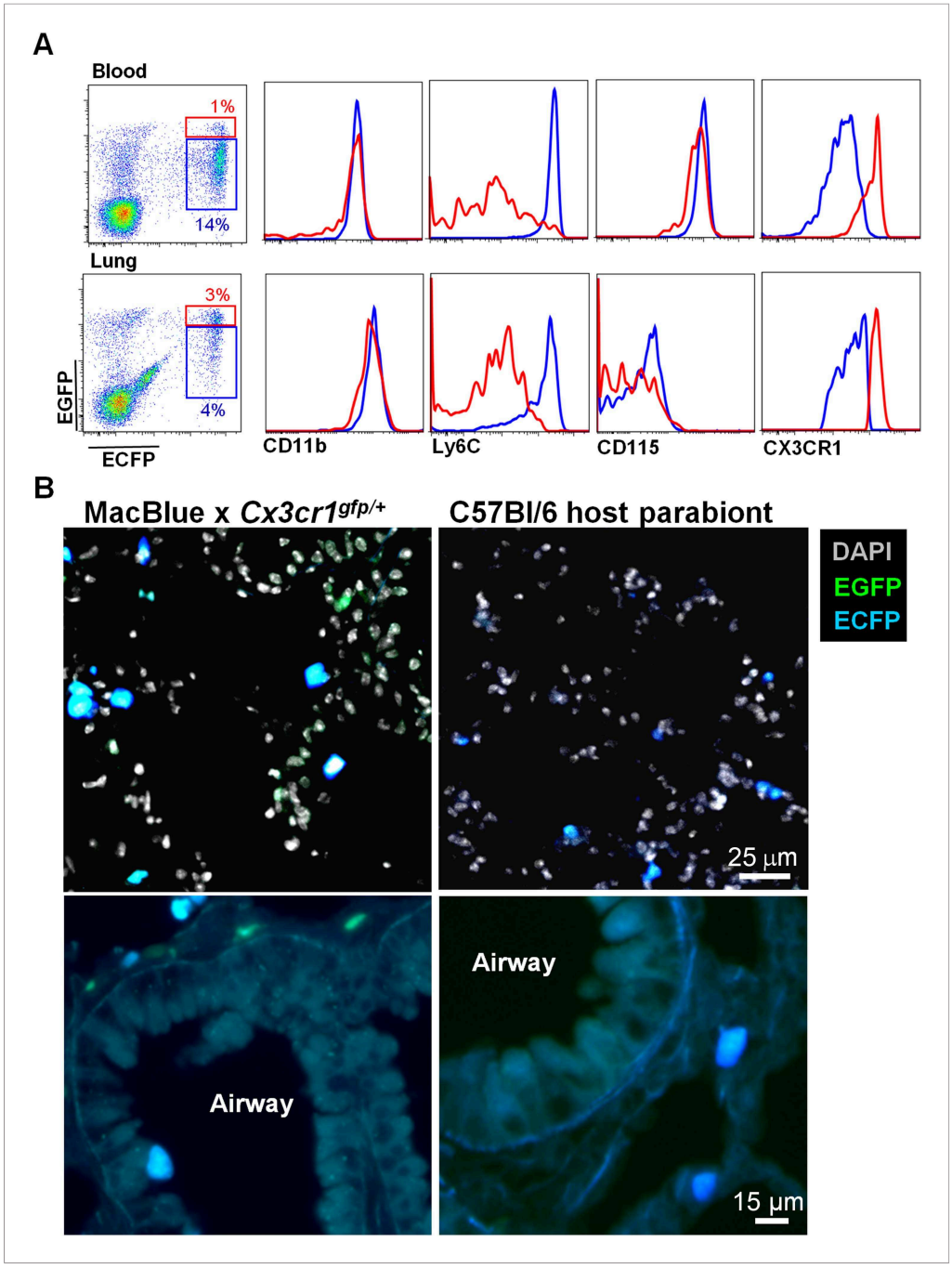


Figure 3. Interstitial ECFP^{+} cells are monocyte-derived. **(A)** Dot plot shows the ECFP/EGFP chimerism in the blood and the lungs of C57Bl6 host parabiont with MacBlue×*Cx3cr1*$^{gfp/+}$ mouse. Histograms represent the expression of monocyte markers on the CX3CR1^{low} (blue gate) and CX3CR1^{high} cells (red gate). **(B)** Pictures compare different magnifications of lung cryo-section from MacBlue×*Cx3cr1*$^{gfp/+}$ mouse (left) with C57Bl6 host parabiont with MacBlue×*Cx3cr1*$^{gfp/+}$ mouse (right). Up to six parabionts were prepared independently.

DOI: 10.7554/eLife.07847.006

suggesting scanning of the interalveolar space (***Video 2***). Time lapse imaging of explanted non-transgenic lungs from parabiont mice showed similar scanning behaviour (***Videos 5 and 6***), supporting the monocyte origin of these cells. In overview, while AM survey the luminal side of the alveoli, interstitial monocyte-derived cells survey the lung tissue through either active patrolling in the vasculature or protrusive activity toward the alveolar space.

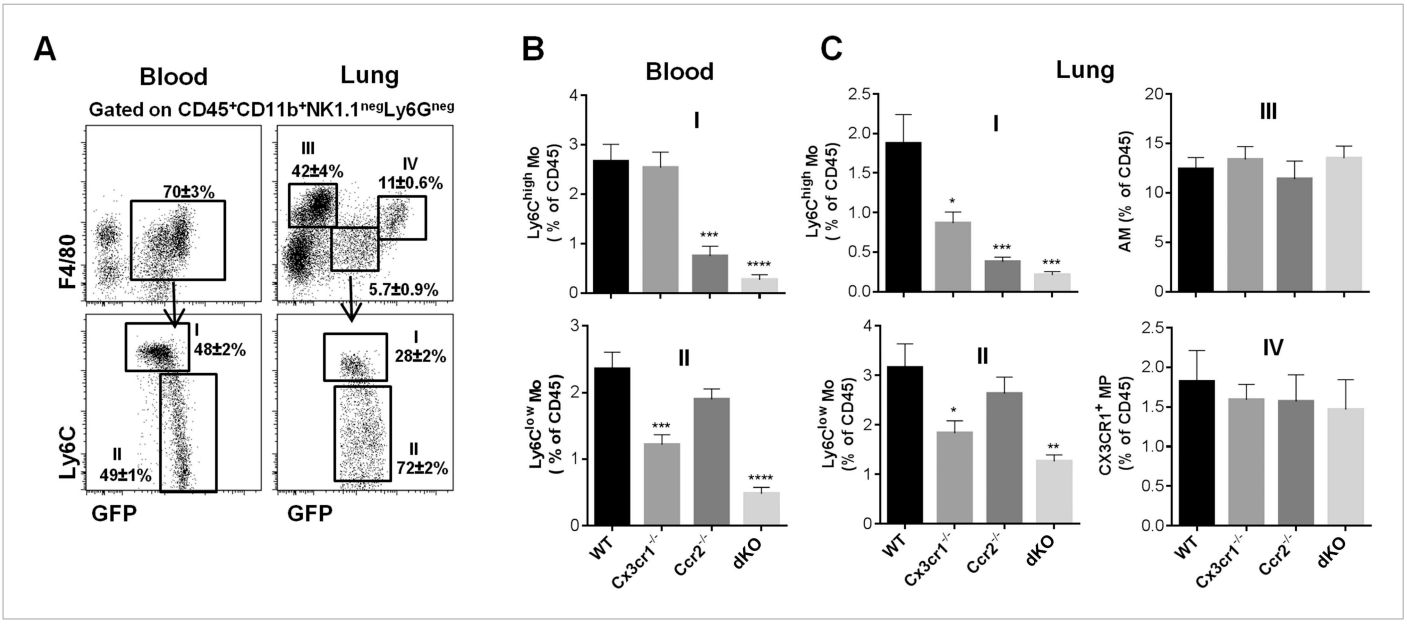


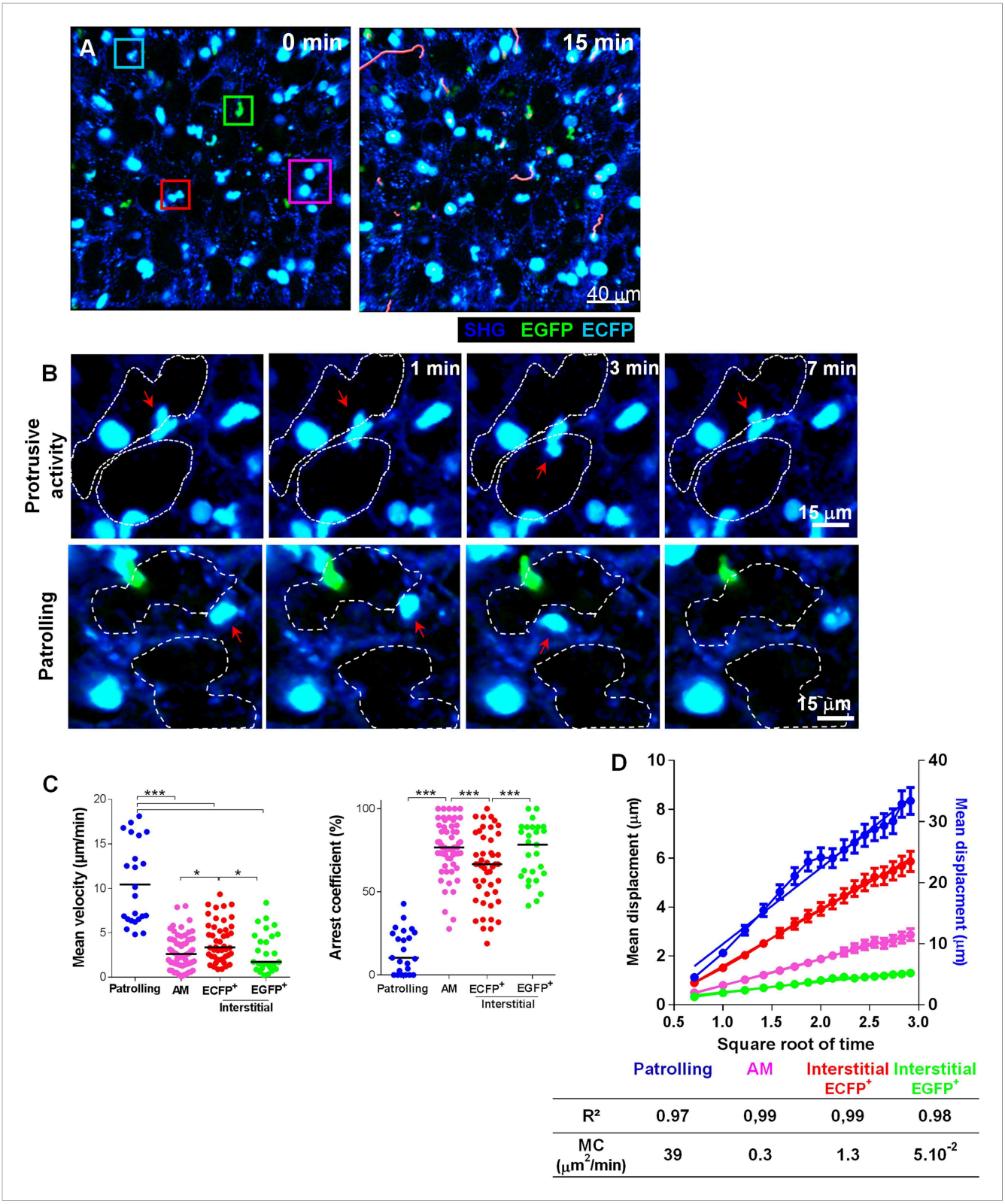
Figure 4. CCR2 and CX3CR1 control the accumulation of lung mononuclear phagocytes. **(A)** Gating strategy defines (I) Ly6C^{high} monocytes, (II) Ly6C^{low} monocytes, (III) alveolar macrophages (AM), and (IV) CX3CR1^{+} lung macrophages gated on CD45^{+}CD11b^{+}NK1.1^{neg}Ly6G^{neg} cells. Bars represent quantification as a percentage of CD45^{+} cells of the defined cell subsets from **(B)** the blood and **(C)** the lungs in *Cx3cr1*$^{gfp/+}$*Ccr2*$^{rfp/+}$ (WT), *Cx3cr1*$^{gfp/gfp}$*Ccr2*$^{rfp/+}$ (Cx3cr1$^{-/-}$), *Cx3cr1*$^{gfp/+}$*Ccr2*$^{rfp/-}$ (Ccr2$^{-/-}$), and *Cx3cr1*$^{gfp/gfp}$*Ccr2*$^{rfp/rfp}$ (dKO) mice. Bars represent means ± SEM (n = 10–13 mice per group from four independent experiments). ANOVA with Bonferroni adjustment was used. Mo, monocytes; MP, mononuclear phagocytes; WT, wild-type.
DOI: 10.7554/eLife.07847.007

Interalveolar space scanning by monocyte-derived cells is CX3CR1 dependent

In order to determine the molecular mechanism involved in the steady-state lung surveillance, we analysed the behaviour of lung mononuclear phagocytes in MacBlue×*Cx3cr1*$^{gfp/gfp}$ mice (***Figure 6A*** and ***Video 7***). The absence of functional CX3CR1 did not change the arrest coefficient (***Figure 6B***) but did slightly reduce the MC of patrolling cells (***Figure 6C***). As might be anticipated given their lack of CX3CR1 expression, AM behaviour was also comparable in WT and Cx3cr1$^{-/-}$ mice (***Figure 6B–C***). On the other hand, deletion of the CX3CR1 clearly altered the behaviour of the interstitial ECFP^{+} cells, which showed a greatly increased arrest coefficient and reduced MC (***Figure 6B–C***). The scanning behaviour was also strongly affected. In the absence of CX3CR1, the remaining interstitial ECFP^{+} cells present had greatly reduced protrusive activity, as indicated by increased global 'sphericity' (***Figure 6D,E***) and reduced sphericity variation (***Figure 6F***).

Interstitial monocyte-derived cells localized in the alveolar space whereas lung dendritic cells preferentially localized near large airways

Lung DC defined by CD11c expression have been previously shown to participate in antigen uptake (***Thornton et al., 2012***). CD11c is expressed on all tissue macrophages in the lung, but is absent from monocytes. To compare the roles of these cells in particle clearance, we combined MacBlue with the *Itgax*-YFP transgene (MacBlue×*Itgax*-YFP) and again compared the fluorescent signatures of different mononuclear phagocyte populations (***Figure 7A***). According to previous phenotyping, Ly6C^{high} monocytes were CD11b^{+}Ly6G^{-}SiglecF^{-}IAb^{low}CD64^{low}Ly6C^{high}, Ly6C^{low} monocytes were CD11b^{+}Ly6G^{-}SiglecF^{-}IAb^{low}CD64^{low}Ly6C^{low}, interstitial macrophages were CD11b^{+}Ly6G^{-}SiglecF^{-}IAb^{high}CD64^{+}, and AM were CD11b^{low}CD11c^{high}SiglecF^{high}CD64^{+}. Based upon published markers (***Guilliams et al., 2014***), two sets of classical myeloid DC have been defined: CD11b^{+} DC that were CD11b^{+}CD11c^{+}Ly6G^{-}SiglecF^{-}IAb^{high}CD64^{-}CD24^{+} and CD11b^{-} DC that were CD11b^{-}CD11c^{+}Ly6G^{-}SiglecF^{-}IAb^{high}CD64^{-}CD24^{+}CD103^{+} (***Figure 7A***). We determined the mean fluorescence intensity (MFI) of EGFP, ECFP, and YFP reporters from the MacBlue×*Cx3cr1*$^{gfp/+}$ and MacBlue×*Itgax*-YFP in these subsets



	Patrolling	AM	Interstitial ECFP+	Interstitial EGFP+
R^2	0.97	0,99	0,99	0.98
MC (μm^2/min)	39	0.3	1.3	5.10^{-2}

Figure 5. Lung mononuclear phagocytes constitutively survey the entire space of the alveolar areas through distinct migratory patterns. **(A)** Time series two-photon laser scanning microscopy (TPLSM) pictures with overlaid tracks of cell motility of the alveolar area from explanted lung. Pink, blue, red, and green squares surround alveolar macrophages, patrolling monocytes, interstitial ECFP+ cells, and interstitial EGFP+ cells, respectively. **(B)** Time series TPLSM pictures show representative protrusive activity (upper panel) and patrolling (lower panel) behaviour by interstitial ECFP+ cells. **(C)** Quantification of

Figure 5. continued on next page

Figure 5. Continued

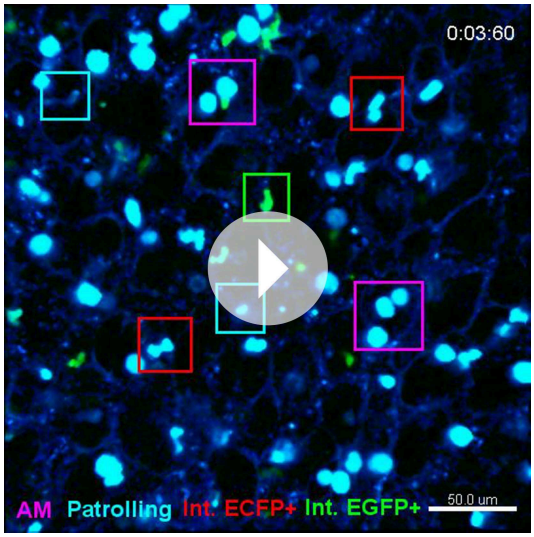
the mean velocity and arrest coefficient of cell subsets. Bars indicate the medians. Data are pooled from six independent mice. Kruskal–Wallis tests followed by Dunn's multiple comparison tests were performed. **(D)** Mean displacement ± SEM as a function of the square root of time for alveolar macrophages (AM) (pink), scanning interstitial ECFP$^+$ cells (red), EGFP$^+$ cells (green) (left scale), and patrolling interstitial ECFP$^+$ cells (blue) (right scale). Coloured lines represent the linear regression of the curves. r^2 and motility coefficients (MC = x/4t) are indicated.

DOI: 10.7554/eLife.07847.008

(***Figure 7B***). EGFP and ECFP fluorescent reporter expressions were mainly restricted to lung macrophage and monocyte subsets as previously described (***Figure 2***). Although CD11c mRNA and surface protein are expressed widely among tissue macrophages in the lung, YFP expression was mainly restricted to the defined classical DC subsets with a brighter expression for CD11b$^-$ DC (***Figure 7C***). Interestingly, AM only express the MacBlue transgene and despite expression of CD11c protein on their surface, YFP was detectable in only a small subset (***Figure 7B–C***). Thus the combination of these different transgenes permits the distinction of lung mononuclear phagocytes and lung DC. AM represented the most abundant mononuclear phagocyte subset of the lung (***Figure 7D***). Lung monocytes represented the second main mononuclear phagocyte subset and were even more numerous than interstitial macrophages, CD11b$^+$ DC and CD11b$^-$CD103$^+$ DC (***Figure 7D***). Histological analysis of a lung section of MacBlue×*Itgax*-YFP showed that YFP^{bright} cells were mainly located along bronchial airways and poorly distributed in the alveolar space in contrast to ECFP$^+$ monocytes and AM (***Figure 7E***).

Lung monocyte-derived cells survey both airways and vascular routes, whereas DC survey only airways

Particle size and the physical properties of inhaled particles are critical in the uptake by lung phagocytes and trafficking to regional lymph nodes (***Jakubzick et al., 2008***; ***Blank et al., 2013***). We hypothesized that regional segregation of monocytes and classical DC could be also important in antigen uptake. We inoculated mice with fluorescent beads either by intravenous or airway routes and compared the proportion of phagocytic cells in different lung subsets 4 hr after bead inoculation (***Figure 8A***). After i.v. inoculation, only monocytic cells appeared to have taken up particles (***Figure 8B–C***). After airway inhalation, AM were the main phagocytic subset (***Figure 8B–C***), but particles were also detected among interstitial cells. The numbers of phagocytic Ly6C^{low} and Ly6C^{high} monocytes were significantly higher compared to the number of phagocytic DC after airway inhalation, showing that lung monocytes are the only subsets that effectively capture both blood-derived and airway-derived fluorescent particles (***Figure 8C***).

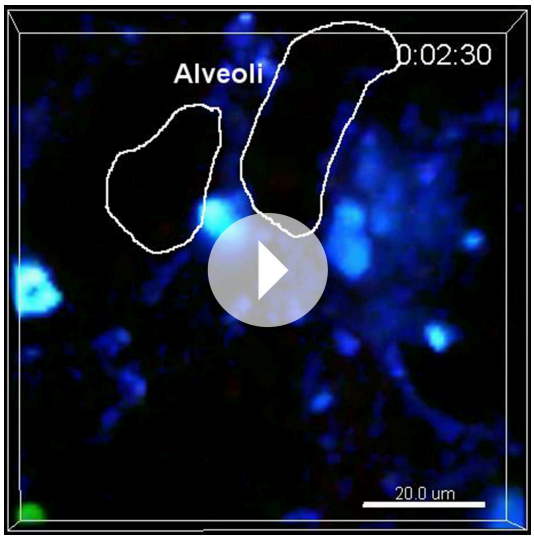


Video 1. Mononuclear phagocyte immune surveillance of alveolar space. Live 3D imaging of mononuclear phagocyte behaviour in the alveolar space of the lung of a MacBlue×*Cx3cr1*$^{gfp/+}$ mouse. The ECFP signal is in cyan, the EGFP signal in green, and the SHG signal (blue) indicates interstitial tissue and defines alveoli. Representative behaviour of alveolar macrophages (AM) (pink squares), patrolling ECFP$^+$ cells (blue squares), interstitial ECFP$^+$ cells (red squares), and interstitial EGFP$^+$ cells (green square) are indicated.

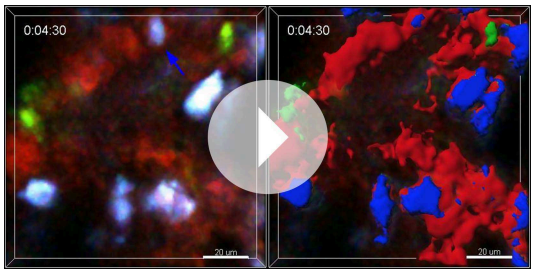
DOI: 10.7554/eLife.07847.009

Lung monocyte-derived cells are located at the interface between blood and airways

In order to further discriminate lung monocytes from circulating monocytes, we performed blood/tissue partitioning using in vivo CD45 labelling as reported by others (***Anderson et al., 2014***; ***Girgis et al., 2014***). This approach was reported to be technically challenging due to the vascular permeability of the lung (***Jakubzick***



Video 2. Migratory behaviour of lung interstitial ECFP$^+$ cells. Live 3D imaging shows interstitial monocyte-derived cells scanning with protrusive activity or patrolling in the steady-state alveolar space of the lung of a MacBlue×*Cx3cr1*$^{gfp/+}$ mouse. The ECFP signal is in cyan, the EGFP signal in green, and the SHG signal (blue) indicates interstitial tissue, while white line drawings define the limits of alveoli.
DOI: 10.7554/eLife.07847.010

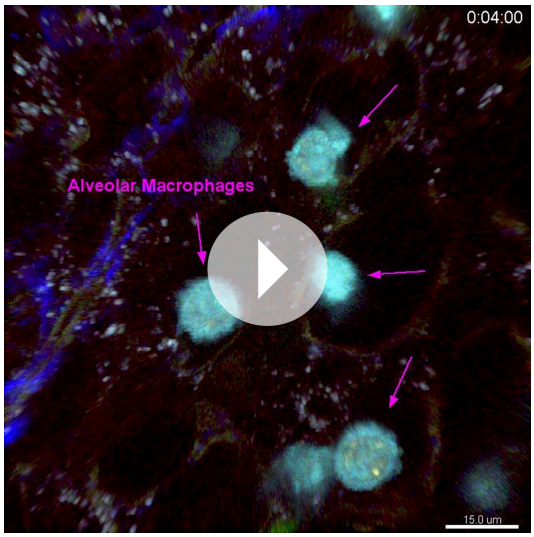


Video 3. Migratory behaviour of ECFP+ cells in lung vasculature. Live 3D imaging shows ECFP$^+$ cells patrolling in the lumen of lung vessels (blue arrow) and interstitial ECFP$^+$ cells in the vicinity of the vasculature. MacBlue×*Cx3cr1*$^{gfp/+}$ mice were injected with 2 MkDa rhodamine dextran 1 min before sacrifice. Lungs were imaged rapidly before leakage of the dye into the alveoli. The ECFP signal is in cyan, the EGFP signal in green, lung capillaries and vessels are in red, and the SHG signal is in blue.
DOI: 10.7554/eLife.07847.011

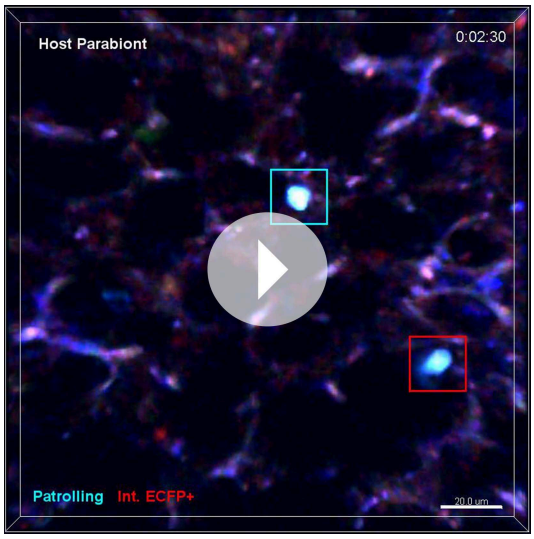
et al., 2013). Lung mononuclear phagocyte subsets and neutrophils were labelled in different proportions (***Figure 9A***). AM were not labelled, confirming that the antibody did not reach the airways. Overall, 27% of interstitial macrophages, 12% of CD11b$^+$ DC, and only 1% of CD11b$^-$ DC were labelled, suggesting a distinct location of these subsets related to the vasculature (***Figure 9A***). Up to 90% of Ly6C^{high} and Ly6C^{low} lung monocytes were labelled by the anti-CD45 antibody in vivo; however, the MFI was significantly lower compared to that of blood monocytes (***Figure 9B***). We excluded that this effect was due to collagen treatment, as similar results were obtained in non-digested lungs (***Figure 9B***). Furthermore, the phenotype of both Ly6C^{high} and Ly6C^{low} monocytes was slightly distinct from their circulating counterparts. Indeed lung monocytes displayed reduced expression of Ly6C, CD62L, and CD115 as previously observed, in addition to a higher level of CD11b, whereas only Ly6C^{low} monocytes displayed higher CD11c expression (***Figure 9C***). The same differences were observed in monocytes isolated from lung without enzymatic digestion (data not shown). These results suggest that monocytes can be either extravascular but in close vicinity to the vessels or still intravascular and trapped in capillaries with reduced access to the bloodstream and submitted to the lung environment. MacBlue×*Cx3cr1*$^{gfp/+}$ mice were inoculated intravenously 5 min before sacrifice with a mixture of 10 µm and 0.2 µm red fluorescent beads to differentiate large vessel areas identified by the presence of both 10 µm and 0.2 µm beads, and lung capillary areas identified by only 0.2 µm beads (***Figure 9D***). In large vessels, ECFP$^+$ cells were mainly round shaped, whereas in the vicinity of capillaries, interstitial ECFP$^+$ cells displayed an elongated or amoeboid-like shape (***Figure 9D***). Confocal analysis of the microvascular area using CD31 staining showed that interstitial ECFP$^+$ cells locate at the interface between the capillaries and the alveoli either intra- or extravascularly (***Figure 9E*** and ***Video 8***). To confirm that this positioning allows the sampling of particles inoculated by the airways route, we performed in vivo CD45 staining of monocytes that had captured beads 4 hr after intranasal inoculation (***Figure 9F***). CD45 in vivo labelling was exactly the same for both Ly6C^{high} and Ly6C^{low} monocytes that had captured the beads compared to non-phagocytic monocytes (***Figure 9F***). This result confirmed that lung monocytes are strategically positioned at the interface between the bloodstream and airways to survey both compartments.

Discussion

Jakubzick et al. (2013) recently reported that monocytes enter and survey non-lymphoid organs (such as the lungs) at steady state. How this property differs from the already known functions of AM

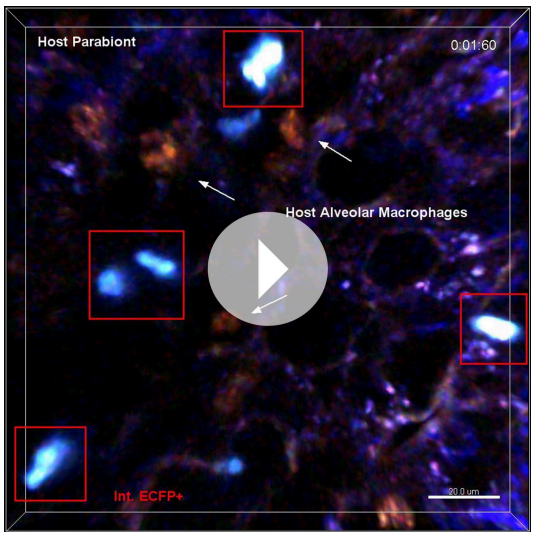


Video 4. Alveolar macrophage surveillance of the alveolar lumen. Live high-resolution 3D imaging of alveolar macrophages (indicated by pink arrows) in the alveoli of a MacBlue×*Cx3cr1*$^{gfp/+}$ mouse. The ECFP signal is in cyan, the EGFP signal in green, and the SHG signal in blue.
DOI: 10.7554/eLife.07847.012



Video 5. Monocyte patrolling behaviour in host parabiont. Live 3D imaging shows interstitial monocyte patrolling behaviour (blue square) in the steady-state alveolar space of the lung of a C57Bl6 host parabiont with MacBlue×*Cx3cr1*$^{gfp/+}$ mouse 1 month after parabiosis.
DOI: 10.7554/eLife.07847.013

and DC was still unknown. Fluorescent myeloid-specific reporter transgenic mice have been widely used to study the behaviour of myeloid cells in vivo, although no transgenic reporter is restricted to a particular myeloid lineage (***Hume, 2011***). LysM reporters can be used to track either neutrophils or monocytes (***Faust et al., 2000***). A wide diversity of cell subsets are labelled in the *Cx3cr1*$^{gfp/+}$ system, including NK cells, which can be excluded only with a specific γc-deficient background (***Auffray et al., 2007***). Similarly, the MacGreen (Csf1r-EGFP) transgene enables labelling of a wide range of mononuclear phagocytes as well as granulocytes (***Sasmono et al., 2003***). The MacBlue binary transgene, based upon a deleted Csf1r promoter, produced a transgenic line in which the reporter gene is extinguished in the majority of mature tissue macrophages and greatly reduced in granulocytes (***Ovchinnikov et al., 2008***; ***Sauter et al., 2014***). Despite the fact that ECFP expression is not directly related to the level of Csf1r mRNA, it provides a unique marker of cells that have recently derived from monocytes.



Video 6. Monocyte cell scanning behaviour in host parabiont. Live 3D imaging shows interstitial monocyte protrusive activity (red squares) in the steady-state alveolar space of the lung of a C57Bl6 host parabiont with MacBlue×*Cx3cr1*$^{gfp/+}$ mouse 1 month after parabiosis.
DOI: 10.7554/eLife.07847.014

In the current study, we intercrossed *Cx3cr1*$^{gfp/+}$ and MacBlue mice to obtain an additional dimension of resolution and specificity. Monocytes were easily distinguishable from other subsets due to their common expression of ECFP. The differential expression of EGFP enabled a further distinction between Ly6C^{high} and Ly6C^{low} monocytes. Although our imaging approach did not allow us to distinguish between the two

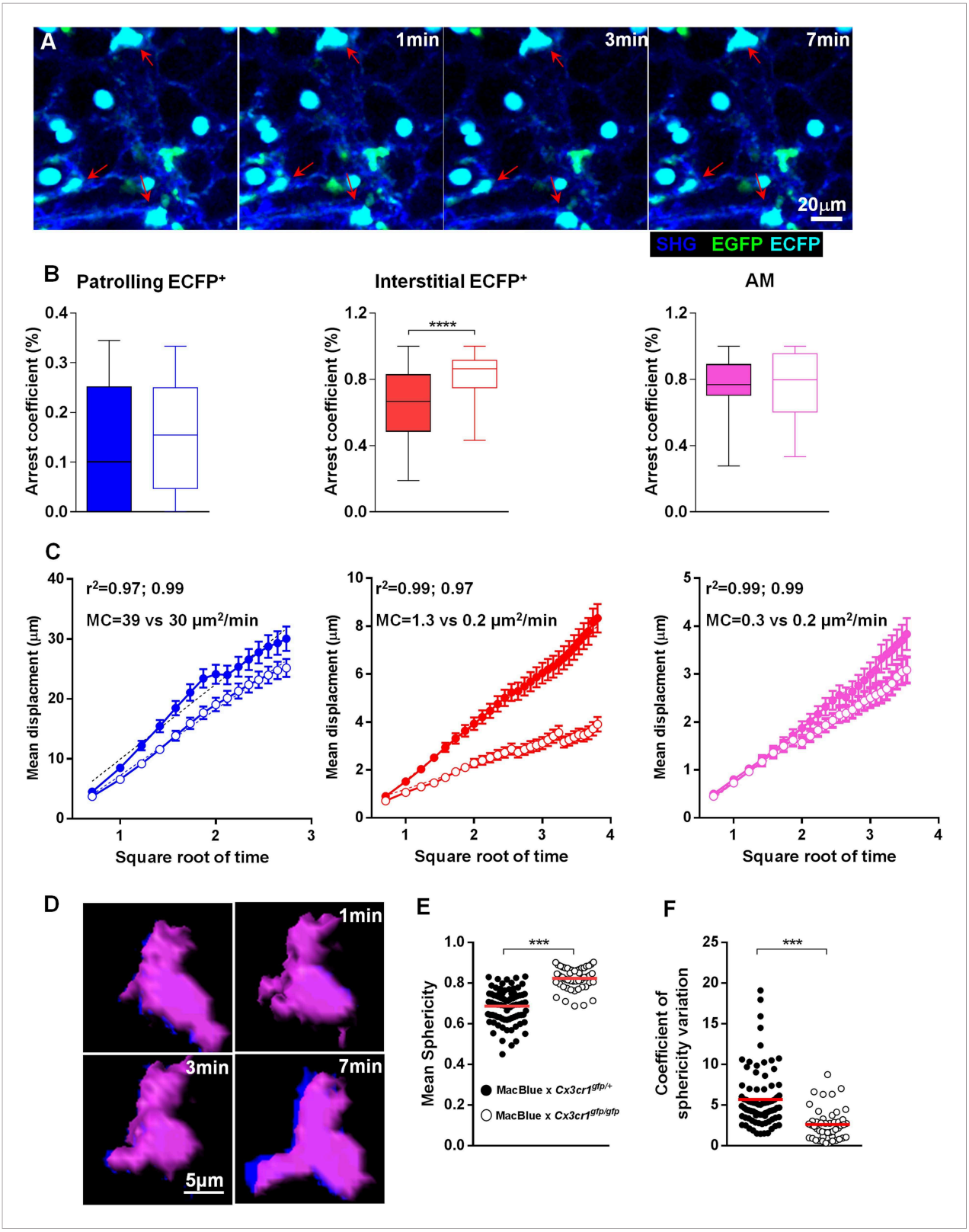


Figure 6. Interalveolar space scanning by monocyte-derived cells is CX3CR1 dependent. **(A)** Time series two-photon laser scanning microscopy (TPLSM) pictures show interstitial ECFP$^+$ cell activity in explanted lungs of MacBlue×*Cx3cr1*$^{gfp/gfp}$ mice. **(B)** Comparative box and whiskers analysis of the arrest coefficient of indicated cell subsets between MacBlue×*Cx3cr1*$^{gfp/+}$ (full boxes) and MacBlue×*Cx3cr1*$^{gfp/gfp}$ (empty boxes). Mann–Whitney tests were performed. Data are pooled from four to six mice from different experiments. **(C)** Comparison of the mean displacement ± SEM as a function of the

Figure 6. continued on next page

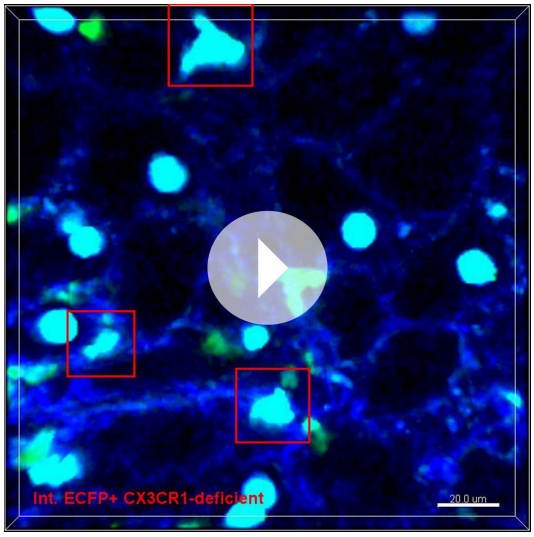
Figure 6. Continued

square root of time for patrolling interstitial ECFP$^+$ cells (blue), scanning interstitial ECFP$^+$ cells (red), and alveolar macrophages (AM) (pink) between MacBlue×*Cx3cr1*$^{gfp/+}$ (full circles) and MacBlue×*Cx3cr1*$^{gfp/gfp}$ (empty circles). Coloured dashed lines represent the linear regression of the curves. r^2 and motility coefficients (MC = x/4t) are indicated for the full versus empty circles, respectively. **(D)** Time series volume rendering image of interstitial ECFP$^+$ cell showing shape modifications. **(E)** Graph representing the mean sphericity of individual cells determined by measuring sphericity at each time point. Red bars represent the mean. **(F)** Graph representing the coefficient of sphericity variation for each cell tracked during 10 consecutive planes (5 min). Data are pooled from different movies from at least three different mice in each group from independent days. Student's t test was used.

DOI: 10.7554/eLife.07847.015

monocyte subsets, the shape, size, tissue localization, and behaviour of the ECFP$^+$ cells provided a unique opportunity to track lung tissue mononuclear phagocytes and to compare their migratory patterns. The dual reporter also avoids potential artefacts created by the γc-deficient background excluding NK cells which we have shown to be highly represented in the CX3CR1-GFP$^+$ fraction within the lungs. The combination of CCR2 and CX3CR1 deficient mice and parabionts permitted a more precise characterization of the nature and origin of the different subsets and confirmed that interstitial ECFP$^+$ were monocyte-derived according to the proposed unified nomenclature (***Guilliams et al., 2014***).

Krummel's group previously performed functional imaging of lung DC using the *Itgax*-YFP reporter (***Thornton et al., 2012***). The combination of this reporter with the MacBlue mouse confirmed that interstitial monocyte-derived cells were distinct from lung DC. Histological analysis showed that monocyte-derived cells and DC share the surveillance activity through distinct regional distribution, the former located in the alveolar space at the interface with the bloodstream and the latter near larger bronchial airways. In vivo CD45 labelling added a new dimension of regional segregation between AM, interstitial macrophages, CD11b$^+$ DC, CD11b$^-$ DC, and lung monocytes. This specific regional segregation at steady state is likely the result of the rapid circulation of monocytes that arrest constitutively in the capillaries of the alveolar space with relatively short life span (***Jakubzick et al., 2013***), whereas DC are slow motile cells (***Thornton et al., 2012***). Of course regional segregation is likely less marked in the allergic asthma model for which important DC recruitment was observed in the vicinity of the alveoli, likely originating from monocytes (***Jakubzick et al., 2008***), where they exert longer transepithelial dendrites formation toward airways (***Thornton et al., 2012***). Our data demonstrate that the interstitial space of the lung is intensively surveyed by monocytes actively migrating or extending processes. The strategic positioning of lung monocytes at the interface allows for efficient capture of both blood and airway-derived particles. Four hours after intranasal inoculation, fluorescent particles remained undetectable in the mediastinal lymph nodes, as previously observed (***Jakubzick et al., 2008***; data not shown), however after 1 d, DC seem to prevail over monocytes in the transport of the inhaled particles. This suggests that the majority of monocytes may scavenge particles to clean up the tissue and filter the blood, whereas the majority of DC aim to transport antigen to the draining lymph node.



Video 7. Migratory behaviour of lung interstitial monocyte-derived cells in a MacBlue×*Cx3cr1*$^{gfp/gfp}$ mouse. Live 3D imaging shows reduced interstitial monocyte-derived cell protrusive activity (red square) in the steady-state alveolar space of the lung of a MacBlue×*Cx3cr1*$^{gfp/gfp}$ mouse. The ECFP signal is in cyan, the EGFP signal is in green, and the SHG signal (blue) indicates interstitial tissue and defines alveoli.

DOI: 10.7554/eLife.07847.016

Due to the vascular permeability of the lung, it is challenging to address the blood/tissue partitioning of the subsets (***Jakubzick et al., 2013***). We combined in vivo CD45 labelling and confocal imaging to determine the precise location of lung monocytes (***Anderson et al., 2014***; ***Girgis et al., 2014***). We determined that lung permeability does not allow it to be definitely concluded that lung

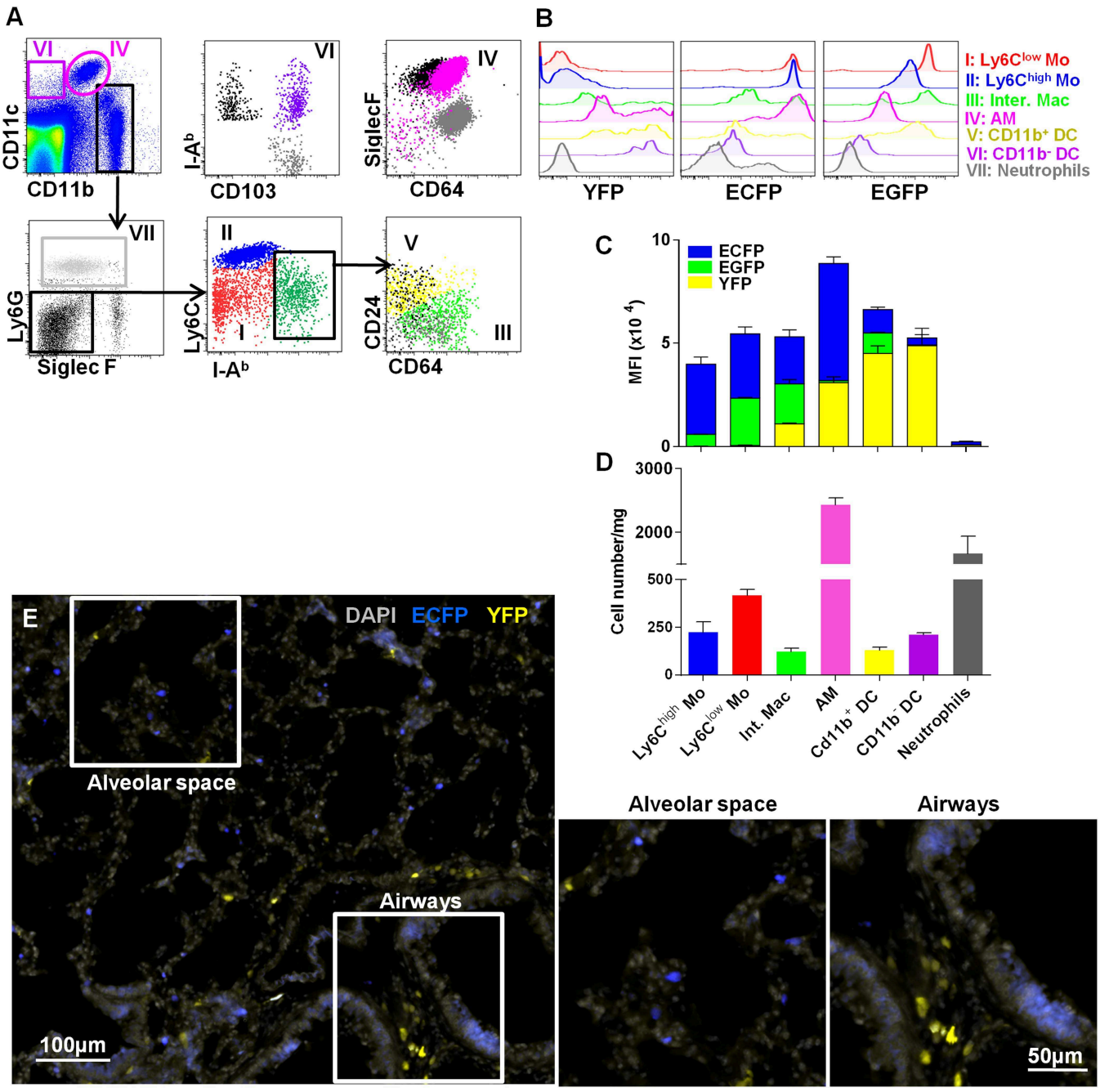


Figure 7. Interstitial monocyte-derived cells localized in the alveolar space whereas lung dendritic cells preferentially localized near large airways. **(A)** Dot plots show the gating strategy to define the different lung mononuclear phagocytes and dendritic cells from either MacBlue×*Cx3cr1*$^{gfp/+}$ or MacBlue×*Itgax*-YFP mice. (I) Ly6C^{low} monocytes (red); (II) Ly6C^{high} monocytes (blue); (III) interstitial macrophages (light green); (IV) alveolar macrophages (AM) (pink); (V) CD11b^{+} DC (yellow); (VI) CD11b^{-} DC (purple); and (VII) neutrophils (grey). For CD11b^{-} DC, AM, CD11b^{+} DC, and interstitial macrophages (Inter. Mac), FMO (full minus one) signals gated on the specific subset were overlaid in black (for the x-axis) and grey (for the y axis). **(B)** Histogram plots represent the EGFP, ECFP, and YFP fluorescent reporter expression by each defined subset. YFP and EGFP were measured on individual mice. **(C)** Mean fluorescent intensity of EGFP (green), ECFP (blue), and YFP (yellow). Bars are mean ± SEM (n = 3 MacBlue×*Cx3cr1*$^{gfp/+}$ and MacBlue×*Itgax*-YFP mice). The experiment has been repeated at least three times. **(D)** Absolute number of indicated subset per mg of lung (pooled data of n = 11 mice from at least three independent preparations). **(E)** Wide field image of MacBlue×*Itgax*-YFP mouse lung cryo-section showing ECFP^{+} and YFP^{+} cell distributions in alveolar space and near bronchial airways. Satellite images represent higher magnification of the corresponding white squares. Images are representative of three different mice. Mo, monocytes.

DOI: 10.7554/eLife.07847.017

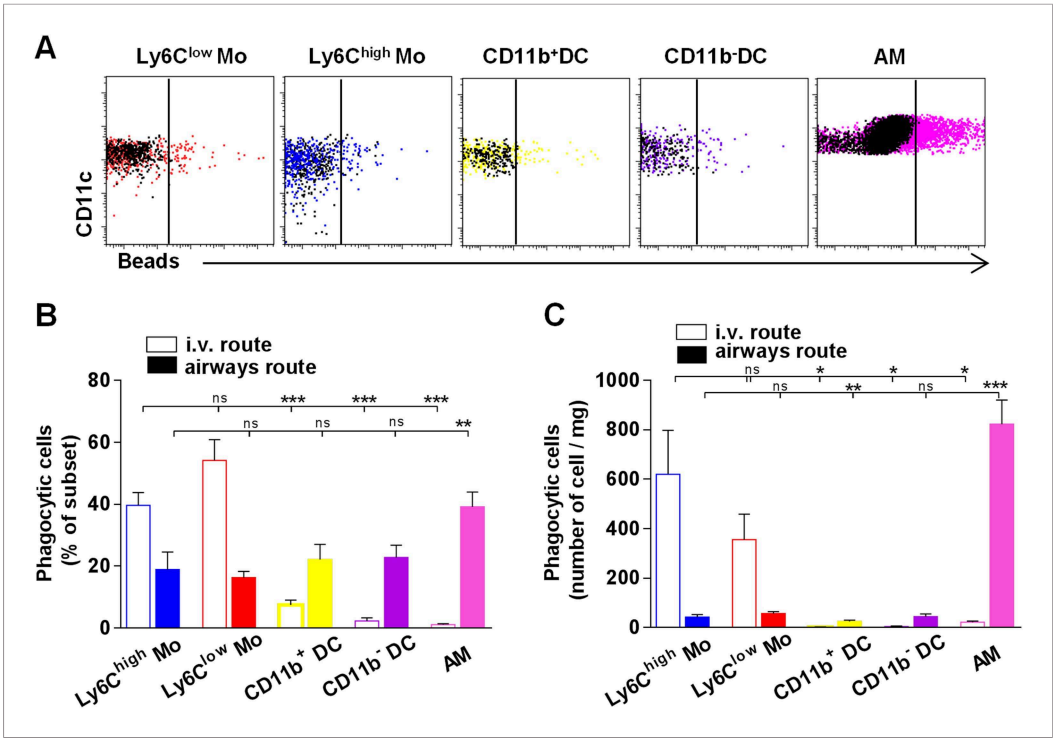


Figure 8. Lung monocyte-derived cells survey both airways and vascular routes whereas dendritic cells (DC) survey only airways. **(A)** Representative dot plots showing fluorescent bead uptake by lung mononuclear phagocytes and dendritic cells 4 hr after airway inoculation. Respective control subsets without beads are overlaid in black. **(B)** Graph represents the frequency of phagocytic cells as a percentage of the respective subset after intravenous injection (empty bars) or airway inhalation (full bars). **(C)** Graph represents the number of phagocytic cell subset per mg of collected tissue. Bars are mean ± SEM (n = 6–7 mice in each group from two to three different experiments). Student's t tests were performed to compare the phagocytic activity of all subsets to the referent population of Ly6C^{low} monocytes. Mo, monocytes.

DOI: 10.7554/eLife.07847.018

monocytes share their time either intra- or extravascularly or even both. However, we showed that lung monocytes have a slightly differentiated phenotype compared to the circulating monocytes with a downregulation of CD115 and CD62L and an upregulation of CD11b and CD11c. Secondly, the proportions of Ly6C^{high} and Ly6C^{low} monocytes were different in the lungs compared to the blood. Finally, monocyte localization in the vicinity of the bloodstream allows them to capture beads inoculated via the intranasal route.

Several studies used in situ imaging of the lung (***Kreisel et al., 2010***; ***Looney et al., 2011***), but it is likely that working on lung explants may somehow affect the dynamics of the studied cells. For instance, fast circulating monocytes in the blood flow could not be observed. Nevertheless, we still observed high velocity patrolling cells that were present within large vessels, suggesting that this migration is independent of the blood flow. This approach provides at least the advantage of better stability without breathing constraints and avoids any accumulation of inflammatory monocytes due to inflammation. Other monocyte behaviour might be observed using in vivo imaging.

By contrast to the CX3CR1-dependence of endothelium patrolling (***Auffray et al., 2007***) as well as transepithelial dendrite formation in the gut (***Kim et al., 2011***), the patrolling activity of interstitial monocytes in the lung was unaffected by the absence of this receptor, whereas their scanning activity was severely impaired. Kim et al. showed that CX3CL1 was expressed by the epithelial cells of bronchioles and in the alveolar space using the CX3CL1-RFP reporters (***Kim et al., 2011***), arguing in favour of the role of this axis in protrusive activity of the CX3CR1^{+} monocyte-derived cells. Because CX3CR1 is an important survival pathway, it is unclear whether these modifications are related to defects in chemotactic signal or cell survival. We did not observe defects in phagocytosis in CX3CR1-deficient mice (unpublished data), suggesting that the recently recruited monocytes are functional, arguing in favour of a role of CX3CR1 in their survival (***Kim et al., 2011***).

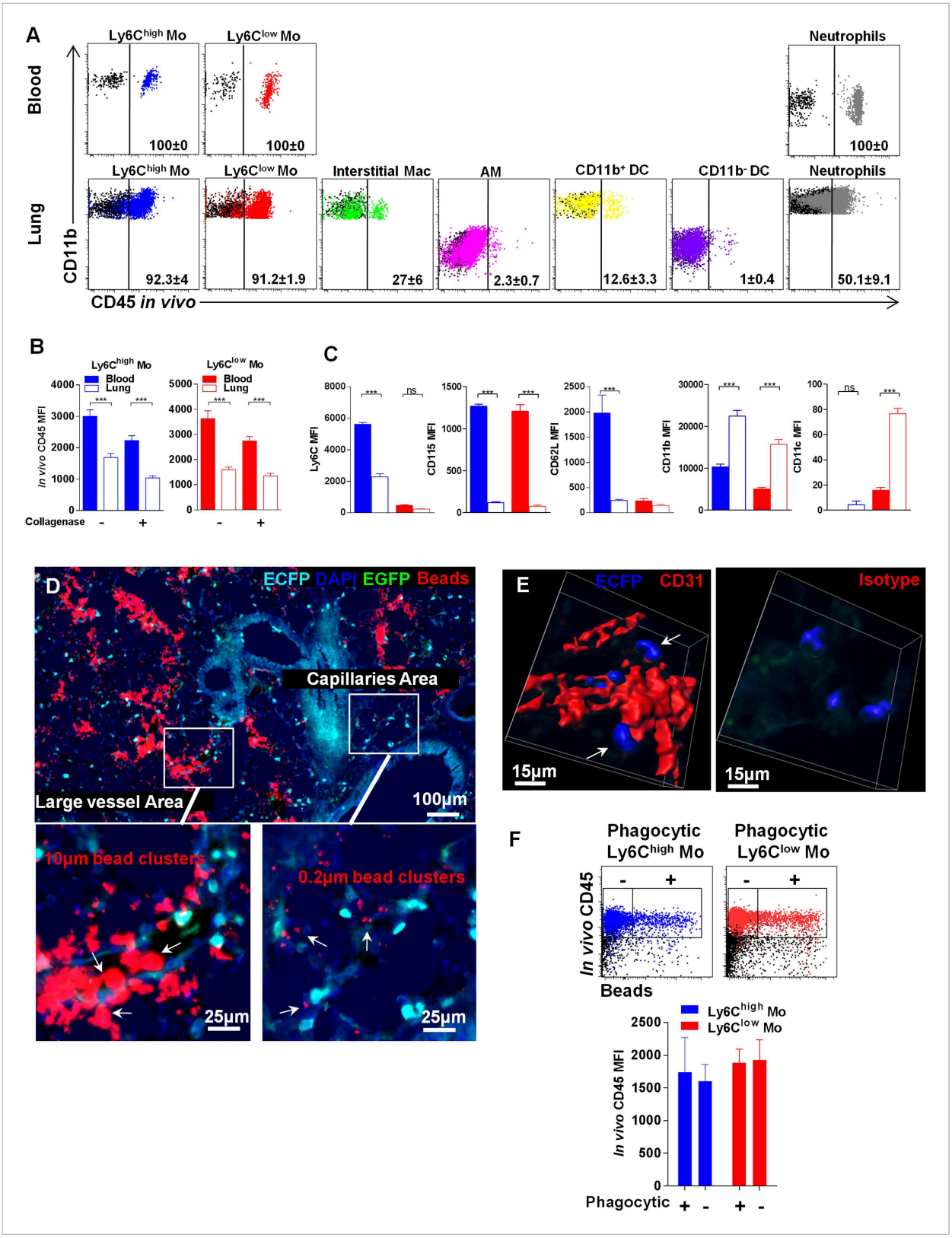


Figure 9. Lung monocyte-derived cells are located at the interface between blood and airways. **(A)** Representative overlayed dot plots of in vivo CD45 staining gated on blood and lung mononuclear phagocytes and neutrophils (coloured). CD45 staining control from mice not injected with anti-CD45 are shown (black). Percentage of CD45$^+$ labelled cells according to control are indicated. Mac, macrophages. **(B)** Bars represent CD45 mean fluorescence intensity (MFI) after in vivo staining in Ly6C^{high} (blue) and Ly6C^{low} (red) monocytes from the blood (full bars) and the lungs (empty bars) with or without

Figure 9. continued on next page

Figure 9. Continued

enzymatic digestion. **(C)** Bars represent MFI of the indicated markers gated on Ly6C^{high} (blue) and Ly6C^{low} (red) monocytes from the blood (full bars) and the lungs (empty bars). Bars represent mean ± SEM (n = 10 mice from two different experiments). ANOVA with Bonferroni adjustment was used. **(D)** MacBlue×*Cx3cr1*$^{gfp/+}$ mouse lung cryo-section showing ECFP^{+} cell localisation in distinct vascular areas, according to bead distribution after intravenous injection of a mixture of 10 μm and 0.2 μm red fluorescent beads. Satellite images represent higher magnification of large vessels containing 10 μm and 0.2 μm beads, indicated by white arrows (left), and capillaries containing only 0.2 μm beads, indicated by white arrows (right). **(E)** Confocal volume rendering reconstitution image of CD31 (red) (left) or isotype staining (right) showing ECFP^{+} monocytes (blue) in the vicinity of lung capillaries. Volume rendering reconstruction has been determined according to the isotype staining. **(F)** Dot plots represent in vivo CD45 staining of Ly6C^{high} (blue) and Ly6C^{low} (red) monocytes 4 hr after intranasal inoculation of fluorescent beads. CD45 staining control from mice not injected with anti-CD45 is shown (black). Bars represent the CD45 MFI gated on phagocytic (beads^{+}) and non-phagocytic (beads^{-}) monocytes. Bars represent mean ± SEM (n = 4 mice from two different experiments).

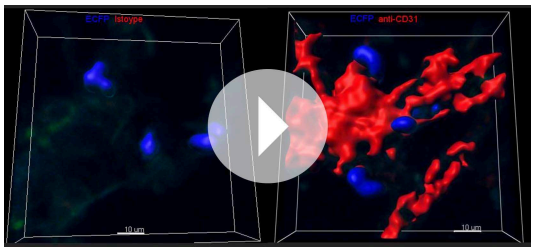
DOI: 10.7554/eLife.07847.019

Overall, our study provided important fundamental insights into the behaviour of tissue monocytes during the process of immune surveillance in comparison to resident macrophages and DC in a key biological tissue. We concluded that tissue monocytes represent a major first line phagocytic compartment in comparison to DC. Monocyte-derived cells developed an organized distribution at the interface between blood and airways with a specific pattern of movements in the lungs to enable them to rapidly detect danger, trigger inflammation, capture antigen, and undergo subsequent immune response. Understanding these activities is a key step towards improving the treatment of a wide range of inflammatory diseases and also vaccination strategies targeting the route of antigen uptake.

Materials and methods

Mice

Cx3cr1-GFP-Kin (*Cx3cr1*$^{gfp/+}$) or *Itgax*-YFP transgenic mice (CD11c-YFP) (**Lindquist et al., 2004**) and *Csf1r*-Gal4VP16/UAS-ECFP (MacBlue) (**Ovchinnikov et al., 2008**) were intercrossed to generate *Cx3cr1*$^{gfp/+}$×*Csf1r*-Gal4VP16/UAS-ECFP mice herein called MacBlue×*Cx3cr1*$^{gfp/+}$ or MacBlue×*Cx3cr1*$^{gfp/gfp}$, and MacBlue×*Itgax*-YFP, respectively. These new strains were bred in the Nouvelle Animalerie Commune animal facility at Pitié-Salpêtrière. *Cx3cr1*$^{gfp/+}$-*Ccr2*$^{rfp/+}$ mice were kindly provided by Israel Charo (Gladstone Institute, San Francisco, CA, USA) (**Saederup et al., 2010**) to generate *Cx3cr1*$^{gfp/gfp}$-*Ccr2*$^{rfp/+}$, *Cx3cr1*$^{gfp/+}$-*Ccr2*$^{rfp/-}$, and *Cx3cr1*$^{gfp/gfp}$-*Ccr2*$^{rfp/rfp}$ mouse strains. All mice were used between 8 and 12 weeks of age. C57Bl6 female host parabionts were generated with MacBlue×*Cx3cr1*$^{gfp/+}$females and analysed after 1 month of parabiosis. Blood leukocyte chimerism was evaluated 2 weeks after surgery, and showed a T cell chimerism of 50 ± 10%. In these settings, monocyte chimerism from B6 to MacBlue×*Cx3cr1*$^{gfp/+}$ was around 37 ± 14% and MacBlue×*Cx3cr1*$^{gfp/+}$ to B6 was reduced to 14 ± 13%.



Video 8. Confocal 3D reconstruction of lung ECFP^{+} cells in the lung vasculature. High resolution 3D reconstruction shows lung ECFP^{+} cell localisation at the interface between lung capillaries and airways. Lung vasculature has been stained with anti-CD31 (right) or isotype control (left) in a lung cryo-section of a MacBlue×*Cx3cr1*$^{gfp/+}$ mouse. Acquisition parameters were identical for both stainings. Volume rendering parameters were determined based on CD31 isotype staining. Capillaries are in red and ECFP^{+} cells are in blue.

DOI: 10.7554/eLife.07847.020

All experiment protocols were approved by the French animal experimentation and ethics committee and validated by Service Protection et Santé Animales, Environnement (no. A-75-2065). Sample sizes were chosen to ensure the reproducibility of the experiments and according to the 3Rs of animal ethics regulation.

In vivo phagocytosis and CD45 labelling

A total of 10^{11} FluoroSpheres carboxylate–modified microspheres (200 nm) (Invitrogen, Eugene, OR, USA) were inoculated either by intravenous or airway routes. Phagocytosis by lung subsets was analysed 4 hr after inoculation by flow cytometry. Bead inhalation was performed by loading a 10 μl drop of NaCl 0.9%

bead solution in each nostril of mice anaesthetized by an intraperitoneal injection of a mixture of ketamine/xylazine (100 and 10 mg/kg body weight, respectively). Mice for which bead inhalation failed have been excluded from the analysis.

For in vivo CD45 labelling, mice were injected intravenously with 1 μg of anti-CD45 (clone 30-F11). Mice were sacrificed 2 min after blood was drawn. Lungs were harvested and bathed in a large volume of PBS to dilute free antibody.

Flow cytometry

Flow cytometry was performed with the flow cytometer FACScanto or Fortessa (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) and DIVA Flow Cytometry acquisition software, and was analysed with FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR, USA). After blood was drawn via retro-orbital puncture with heparin, the mouse lung vasculature was gently flushed with an intracardiac injection of PBS until complete blood clearance. For in vivo CD45 staining experiments, the lung vasculature was not flushed. Lungs were then harvested and digested in RPMI medium (Gibco, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) with 1 mg/ml collagenase IV (Sigma, St Quentin Fallavier, France) for 30 min at 37˚C and/or directly (without collagenase incubation) dissociated through a 70 μm-pore cell strainer (Becton Dickinson, Rungis, France) to obtain the cell suspension. Similarly, for some experiments blood was or was not incubated with 1 mg/ml collagenase IV. For antibody staining, 50 μL of cell suspension was incubated with 1 μg/mL purified anti-CD16/32 (2.4G2) (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) for 10 min at 4˚C and for an additional 20 min with the appropriate dilution of specific antibodies. The panel of antibodies used was: anti-CD11b (clone M1/70), anti-Ly6C (clone AL-21), anti-Ly6G (clone 1A8), anti-NK1.1 (clone PK136), anti-CD45 (clone 30-F11), anti-CD11c (clone HL3), anti-I-A^b (clone AF6-120-1), anti-CD 62L (clone MEL-14), anti-SiglecF (clone E50-2440), anti-CD24 (cloneM1/69), anti-CD103 clone (M290), rat IgG2b isotype control (BD Biosciences), F4/80 (clone BM8), CD115 (clone AFS98), rat IgG2a isotype control (clone eBr2a; eBioscience, San Diego, CA, USA), and anti-CD64 (clone X54-5/7.1.1) (BioLegend, San Diego, CA, USA). After incubation, cell suspensions were washed once in 0.5% BSA/2 mM EDTA in PBS and analysed directly by flow cytometry. For blood samples, erythrocytes were lysed with a lysis buffer containing 0.15 M NH_4Cl, 0.01 mM $KHCO_3$ and 0.1 mM EDTA and resuspended in 0.5% BSA/2 mM EDTA in PBS. FMO staining controls (full minus one) have been performed for all sets of experiment and are indicated in dot plots or histogram plots when necessary. Specific FMO gating for alveolar macrophages was required due to their bright autofluorescence. Absolute numbers were calculated by adding to each vial a fixed number (10,000) of non-fluorescent 10-μm Polybead Carboxylate Microspheres (Polysciences, Niles, IL, USA) according to the formula: no. cells = (no. acquired cells × 10,000)/(no. acquired beads).

Tissue processing for histology analysis

Briefly, organs were harvested and fixed in 10% formalin for 4 hr then incubated in 30% sucrose-PBS overnight at 4˚C before being embedded in Tissue–Tek OCT compound (Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, Netherlands) and frozen at −80˚C. Sectioning was completed on a HM550 Cryostat (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at −20˚C and 5 μm sections were collected on Superfrost Plus Slides (Thermo Fisher Scientific) and stored at −20˚C until use.

Vascular staining using beads was performed on histological sections of lung from MacBlue×Cx3cr1$^{gfp/+}$ mice injected 5 min before sacrifice with a mixture of 10 μm Polybead Carboxylate Microspheres and 0.2 μm FluoroSpheres carboxylate. Lung sections were rehydrated with PBS for 10 min, counterstained and mounted with Vectashield Mounting Medium with DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole; Vector Laboratories). Imaging used a Zeiss Axio Microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). CD31 vascular staining was performed on lung cryo-sections from MacBlue×Cx3cr1$^{gfp/+}$ mice. A first blocking step was performed with 3% BSA/PBS solution for 30 min. Slides were then incubated for 1 hr at 37˚C with the primary antibody rat anti-mouse CD31 (4 μg/ml) (clone MEC 13.3; Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) or the isotype control (4 μg/ml) (clone eBR2a; eBioscience). Slides were next incubated with Avidin/Biotin Blocking Kit (SP-2001; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and then stained with a biotinylated donkey anti-rat IgG at 3 μg/ml for 30 min at room temperature. After three (5 min) washes in PBS, slides were incubated with Cy3-conjugated streptavidin at 2.6 μg/ml for 30 min at room temperature (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA). Slides were counterstained and mounted with Vectashield

Mounting Medium with DAPI and analysed by using a Zeiss LSM 710 NLO confocal microscope coupled with 458 nm, 488 nm, and 543 nm lasers to detect ECFP, EGFP, and Cy3 simultaneously on three photomultipliers.

Acquisition settings were identical for both isotype and CD31 staining. Volume rendering was performed using Imaris software (Bitplane, Zurich, Switzerland) and parameters were set according to CD31 isotype staining.

Multiphoton imaging

Freshly explanted lungs were immobilized in an imaging chamber perfused with oxygenated (95% O_2 plus 5% CO_2) RPMI medium containing 10% FCS. The local temperature was monitored and maintained at 37˚C. For some experiments, 2 MkDa rhodamine dextran was injected intravenously 1 min before euthanasia and lung vasculature was ligatured to reduce leakage of the dye. The two-photon laser scanning microscopy (TPLSM) set-up used consisted of a Zeiss LSM 710 NLO multiphoton microscope (Carl Zeiss) coupled to a Ti:Sapphire crystal laser (Coherent Chameleon Ultra, Santa Clara, CA, USA), which provides 140 fs pulses of NIR light, selectively tunable between 680 and 1080 nm, and an acousto-optic modulator to control laser power. The system included three external non-descanned detectors that enabled the simultaneous recording of three fluorescent channels with a combination of two dichroic mirrors (565 nm and 690 nm), 565/610 and 500/550 bandpass filters, and a 485 lowpass filter. The excitation wavelength was 870 nm. Cell motility was measured every 30 s by five consecutive 3 μm z spacing stacks (total thickness of 12 μm) with a plan apochromat × 20 (NA = 1) water immersion objective.

Fluorescent cells were monitored over time with three-dimensional automatic tracking and manual correction with Imaris software (Bitplane). The different cell subsets were defined according to the fluorescent signature, the size, the shape, the localization, and the behaviour. Typically AM are $ECFP^{bright}$, large, round, and sessile cells located in the lumen of alveoli. Patrolling monocytes are $ECFP^+$ and small with an amoeboid-like shape displaying strong displacements in the interalveolar space. Interstitial monocyte-derived cells are $ECFP^+$ sessile cells displaying protrusive activity in the interalveolar space. Interstitial $EGFP^+$ are either small and round (likely NK) in the lung alveolar space, or dendritic-shaped in the pleura and along airways. Cells that could not be tracked for more than 2 min were not considered. The arrest coefficient was defined as the proportion of time each cell's instantaneous velocity (calculated for every 30 s interval) was less than 2 μm/min. The MC was determined on a 2D-based analysis by z projection of the 3D stacks, using the formula (x/4 t) (where x represents the slope of the mean displacement as a function of the square root of time) (***Cahalan and Parker, 2008***) (see statistical section). Coefficient of sphericity variation was determined by calculating the coefficient of variation with Graphpad Prism (Graphpad, San Diego, CA, USA) of the sphericity determined for each cell on 10 consecutive planes (5 min). Velocity and sphericity were determined using Imaris (Bitplane). The acquisition and analysis protocols for all experimental conditions to be compared were identical.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed with Graphpad Prism. For intravital analysis of cell behaviour, each sample value was first tested for Gaussian distribution by the D'Agostino and Pearson omnibus normality test. Accordingly, multigroup comparison tests were performed by one-way ANOVA for parametric distribution followed by Bonferroni multiple comparison test or Kruskal–Wallis test for non-parametric distributions, followed by Dunn's multiple comparison test. For simple comparison analysis, Student's t test was performed to compare parametric distribution and Mann–Whitney rank sum tests were performed to compare non-parametric distribution. For MC measurement, the slope of the mean displacement as a function of the square root of time (***Cahalan and Parker, 2008***) was calculated by linear regression statistical analysis. Linearity was considered significant for $r > 0.9$. Symbols used: *, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$.

Acknowledgements

The authors wish to thank Jo Ann Cahn for manuscript editing, the Plateforme Imagerie Pitié-Salpêtrière (PICPS) for assistance with the two-photon microscopes, and the animal facility 'NAC' and

Camille Baudesson for mice breeding assistance. The research leading to these results has received funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007–2013) under grant agreement no. 304810 – RAIDs and no. 241440 – Endostem, from Inserm, from Université Pierre et Marie Curie 'Emergence', from 'La Ligue contre le cancer', from 'Association pour la Recherche sur le Cancer', and from 'Agence Nationale de la Recherche' Programme Emergence 2012 (ANR-EMMA-050). PH was supported by 'La Ligue contre le cancer'.

The authors declare no competing financial interests.

Additional information

Funding

Funder	Grant reference	Author
European Commission (EC)	n 304810	Alexandre Boissonnas
European Commission (EC)	n 241440	Christophe Combadière
Ligue Contre le Cancer		Alexandre Boissonnas
Association pour la Recherche sur le Cancer		Alexandre Boissonnas
Agence Nationale de la Recherche	Emergence 2012 (ANR-EMMA-050)	Christophe Combadière

The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

Author contributions

MPR, LP, P-LL, Conception and design, Acquisition of data, Analysis and interpretation of data, Drafting or revising the article; PH, FL, CP, Acquisition of data, Drafting or revising the article; DAH, Drafting or revising the article, Contributed unpublished essential data or reagents; CC, Conception and design, Drafting or revising the article, Contributed unpublished essential data or reagents; AB, Conception and design, Acquisition of data, Analysis and interpretation of data, Drafting or revising the article, Contributed unpublished essential data or reagents

Ethics

Animal experimentation: All experiment protocols were approved by the French animal experimentation and ethics committee and validated by "Service Protection et Santé Animales, Environnement" (no. A-75-2065). Sample sizes were chosen to ensure reproducibility of the experiments and according to the 3Rs of animal ethics regulation.

References

Anderson KG, Mayer-Barber K, Sung H, Beura L, James BR, Taylor JJ, Qunaj L, Griffith TS, Vezys V, Barber DL, Masopust D. 2014. Intravascular staining for discrimination of vascular and tissue leukocytes. *Nature Protocols* **9**: 209–222. doi: 10.1038/nprot.2014.005.

Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S, Sarnacki S, Cumano A, Lauvau G, Geissmann F. 2007. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* **317**:666–670. doi: 10.1126/science.1142883.

Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. 2009. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annual Review of Immunology* **27**:669–692. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132557.

Becher B, Schlitzer A, Chen J, Mair F, Sumatoh HR, Teng KW, Low D, Ruedl C, Riccardi-Castagnoli P, Poidinger M, Greter M, Ginhoux F, Newell EW. 2014. High-dimensional analysis of the murine myeloid cell system. *Nature Immunology* **15**:1181–1189. doi: 10.1038/ni.3006.

Blank F, Stumbles PA, Seydoux E, Holt PG, Fink A, Rothen-Rutishauser B, Strickland DH, von Garnier C. 2013. Size-dependent uptake of particles by pulmonary antigen-presenting cell populations and trafficking to regional lymph nodes. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **49**:67–77. doi: 10.1165/rcmb.2012-0387OC.

Cahalan MD, Parker I. 2008. Choreography of cell motility and interaction dynamics imaged by two-photon microscopy in lymphoid organs. *Annual Review of Immunology* **26**:585–626. doi: 10.1146/annurev.immunol.24.021605.090620.

Chow A, Lucas D, Hidalgo A, Mendez-Ferrer S, Hashimoto D, Scheiermann C, Battista M, Leboeuf M, Prophete C, van Rooijen N, Tanaka M, Merad M, Frenette PS. 2011. Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. *The Journal of Experimental Medicine* **208**:261–271. doi: 10.1084/jem.20101688.

Faust N, Varas F, Kelly LM, Heck S, Graf T. 2000. Insertion of enhanced green fluorescent protein into the lysozyme gene creates mice with green fluorescent granulocytes and macrophages. *Blood* **96**:719–726.

Gautier EL, Shay T, Miller J, Greter M, Jakubzick C, Ivanov S, Helft J, Chow A, Elpek KG, Gordonov S, Mazloom AR, Ma'ayan A, Chua WJ, Hansen TH, Turley SJ, Merad M, Randolph GJ, Immunological Genome Consortium. 2013. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nature Immunology* **13**:1118–1128. doi: 10.1038/ni.2419.

Geissmann F, Jung S, Littman DR. 2003. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* **19**:71–82. doi: 10.1016/S1074-7613(03)00174-2.

Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. 2010. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* **327**:656–661. doi: 10.1126/science.1178331.

Girgis NM, Gundra UM, Ward LN, Cabrera M, Frevert U, Loke P. 2014. Ly6Chigh monocytes become alternatively activated macrophages in schistosome granulomas with help from CD4+ cells. *PLoS Pathogens* **10**:e1004080. doi: 10.1371/journal.ppat.1004080.

Guilliams M, De Kleer I, Henri S, Post S, Vanhoutte L, De Prijck S, Deswarte K, Malissen B, Hammad H, Lambrecht BN. 2013. Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *The Journal of Experimental Medicine* **210**:1977–1992. doi: 10.1084/jem.20131199.

Guilliams M, Ginhoux F, Jakubzick C, Naik SH, Onai N, Schraml BU, Segura E, Tussiwand R, Yona S. 2014. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nature Reviews. Immunology* **14**:571–578. doi: 10.1038/nri3712.

Hashimoto D, Miller J, Merad M. 2011. Dendritic cell and macrophage heterogeneity in vivo. *Immunity* **35**:323–335. doi: 10.1016/j.immuni.2011.09.007.

Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, Leboeuf M, Becker CD, See P, Price J, Lucas D, Greter M, Mortha A, Boyer SW, Forsberg EC, Tanaka M, van Rooijen N, García-Sastre A, Stanley ER, Ginhoux F, Frenette PS, Merad M. 2013. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* **38**:792–804. doi: 10.1016/j.immuni.2013.04.004.

Hume DA, Summers KM, Raza S, Baillie JK, Freeman TC. 2010. Functional clustering and lineage markers: insights into cellular differentiation and gene function from large-scale microarray studies of purified primary cell populations. *Genomics* **95**:328–338. doi: 10.1016/j.ygeno.2010.03.002.

Hume DA. 2006. The mononuclear phagocyte system. *Current Opinion in Immunology* **18**:49–53. doi: 10.1016/j.coi.2005.11.008.

Hume DA. 2008. Differentiation and heterogeneity in the mononuclear phagocyte system. *Mucosal Immunology* **1**:432–441. doi: 10.1038/mi.2008.36.

Hume DA. 2011. Applications of myeloid-specific promoters in transgenic mice support in vivo imaging and functional genomics but do not support the concept of distinct macrophage and dendritic cell lineages or roles in immunity. *Journal of Leukocyte Biology* **89**:525–538. doi: 10.1189/jlb.0810472.

Hume DA. 2012. Plenary perspective: the complexity of constitutive and inducible gene expression in mononuclear phagocytes. *Journal of Leukocyte Biology* **92**:433–444. doi: 10.1189/jlb.0312166.

Jakubzick C, Helft J, Kaplan TJ, Randolph GJ. 2008. Optimization of methods to study pulmonary dendritic cell migration reveals distinct capacities of DC subsets to acquire soluble versus particulate antigen. *Journal of Immunological Methods* **337**:121–131. doi: 10.1016/j.jim.2008.07.005.

Jakubzick C, Tacke F, Ginhoux F, Wagers AJ, van Rooijen N, Mack M, Merad M, Randolph GJ. 2008. Blood monocyte subsets differentially give rise to CD103+ and CD103- pulmonary dendritic cell populations. *Journal of Immunology* **180**:3019–3027. doi: 10.4049/jimmunol.180.5.3019.

Jakubzick C, Gautier EL, Gibbings SL, Sojka DK, Schlitzer A, Johnson TE, Ivanov S, Duan Q, Bala S, Condon T, van Rooijen N, Grainger JR, Belkaid Y, Ma'ayan A, Riches DW, Yokoyama WM, Ginhoux F, Henson PM, Randolph GJ. 2013. Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. *Immunity* **39**:599–610. doi: 10.1016/j.immuni.2013.08.007.

Jenkins SJ, Hume DA. 2014. Homeostasis in the mononuclear phagocyte system. *Trends in Immunology* **35**:358–367. doi: 10.1016/j.it.2014.06.006.

Jung S, Aliberti J, Graemmel P, Sunshine MJ, Kreutzberg GW, Sher A, Littman DR. 2000. Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Molecular and Cellular Biology* **20**:4106–4114. doi: 10.1128/MCB.20.11.4106-4114.2000.

Kim KW, Vallon-Eberhard A, Zigmond E, Farache J, Shezen E, Shakhar G, Ludwig A, Lira SA, Jung S. 2011. In vivo structure/function and expression analysis of the CX3C chemokine fractalkine. *Blood* **118**:e156–167. doi: 10.1182/blood-2011-04-348946.

Kopf M, Schneider C, Nobs SP. 2014. The development and function of lung-resident macrophages and dendritic cells. *Nature Immunology* **16**:36–44. doi: 10.1038/ni.3052.

Kreisel D, Nava RG, Li W, Zinselmeyer BH, Wang B, Lai J, Pless R, Gelman AE, Krupnick AS, Miller MJ. 2010. In vivo two-photon imaging reveals monocyte-dependent neutrophil extravasation during pulmonary inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **107**:18073–18078. doi: 10.1073/pnas.1008737107.

Lindquist RL, Shakhar G, Dudziak D, Wardemann H, Eisenreich T, Dustin ML, Nussenzweig MC. 2004. Visualizing dendritic cell networks in vivo. *Nature Immunology* **5**:1243–1250. doi: 10.1038/ni1139.

Looney MR, Thornton EE, Sen D, Lamm WJ, Glenny RW, Krummel MF. 2011. Stabilized imaging of immune surveillance in the mouse lung. *Nature Methods* **8**:91–96. doi: 10.1038/nmeth.1543.

Nelson PJ, Rees AJ, Griffin MD, Hughes J, Kurts C, Duffield J. 2012. The renal mononuclear phagocytic system. *Journal of the American Society of Nephrology* **23**:194–203. doi: 10.1681/ASN.2011070680.

Ovchinnikov DA, van Zuylen WJ, DeBats CE, Alexander KA, Kellie S, Hume DA. 2008. Expression of Gal4-dependent transgenes in cells of the mononuclear phagocyte system labeled with enhanced cyan fluorescent protein using Csf1r-Gal4VP16/UAS-ECFP double-transgenic mice. *Journal of Leukocyte Biology* **83**:430–433. doi: 10.1189/jlb.0807585.

Saederup N, Cardona AE, Croft K, Mizutani M, Cotleur AC, Tsou CL, Ransohoff RM, Charo IF. 2010. Selective chemokine receptor usage by central nervous system myeloid cells in CCR2-red fluorescent protein knock-in mice. *PLoS ONE* **5**:e13693. doi: 10.1371/journal.pone.0013693.

Sasmono RT, Oceandy D, Pollard JW, Tong W, Pavli P, Wainwright BJ, Ostrowski MC, Himes SR, Hume DA. 2003. A macrophage colony-stimulating factor receptor-green fluorescent protein transgene is expressed throughout the mononuclear phagocyte system of the mouse. *Blood* **101**:1155–1163. doi: 10.1182/blood-2002-02-0569.

Sauter KA, Pridans C, Sehgal A, Bain CC, Scott C, Moffat L, Rojo R, Stutchfield BM, Davies CL, Donaldson DS, Renault K, McColl BW, Mowat AM, Serrels A, Frame MC, Mabbott NA, Hume DA. 2014. The MacBlue binary transgene (csf1r-gal4VP16/UAS-ECFP) provides a novel marker for visualisation of subsets of monocytes, macrophages and dendritic cells and responsiveness to CSF1 administration. *PLoS ONE* **9**:e105429. doi: 10.1371/journal.pone.0105429.

Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG. 2008. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annual Review of Immunology* **26**:421–452. doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090326.

Sester DP, Beasley SJ, Sweet MJ, Fowles LF, Cronau SL, Stacey KJ, Hume DA. 1999. Bacterial/CpG DNA down-modulates colony stimulating factor-1 receptor surface expression on murine bone marrow-derived macrophages with concomitant growth arrest and factor-independent survival. *Journal of Immunology* **163**:6541–6550.

Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, Figueiredo JL, Kohler RH, Chudnovskiy A, Waterman P, Aikawa E, Mempel TR, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ. 2009. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* **325**:612–616. doi: 10.1126/science.1175202.

2014. The lungs at the frontlines of immunity. *Nature Immunology* **16**:17. doi: 10.1038/ni.3069.

Thornton EE, Looney MR, Bose O, Sen D, Sheppard D, Locksley R, Huang X, Krummel MF. 2012. Spatiotemporally separated antigen uptake by alveolar dendritic cells and airway presentation to T cells in the lung. *The Journal of Experimental Medicine* **209**:1183–1199. doi: 10.1084/jem.20112667.

Yona S, Kim KW, Wolf Y, Mildner A, Varol D, Breker M, Strauss-Ayali D, Viukov S, Guilliams M, Misharin A, Hume DA, Perlman H, Malissen B, Zelzer E, Jung S. 2013. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* **38**:79–91. doi: 10.1016/j.immuni.2012.12.001.

Article 2: «Anti-VEGF targets tissue-resident and recruited macrophage recovery to limit pulmonary metastasis relapse after chemotherapy»

Pierre-Louis Loyher*, Pauline Hamon*, Aida Meghraoui-Keddhar, Elena Goncalves, Nadège Bercovici, Camille Baudesson de Chanville, Ariel Savina, Christophe Combadière and Alexandre Boissonnas

Manuscrit en préparation

Contexte de l'étude

En raison de la forte réduction du nombre de macrophages après une invalidation de l'axe CCR2/CCL2, les TAM sont considérés comme étant dérivés de monocytes circulants dans la plupart des cancers. En revanche, de nombreux macrophages résidents des tissus ont été démontrés comme ayant une origine embryonnaire et ont une dépendance limitée de l'apport de monocytes pour leur auto-renouvèlement. La contribution des macrophages résidents aux réseaux de TAM des tumeurs solides est peu étudiée.

Les tumeurs cérébrales représentent une exception. Dans celles-ci les macrophages d'origine embryonnaire (microglies) sont au contraire considérés comme représentants la plus importante composante des TAM (Muller et al., 2015). Dans un modèle de glioblastome, il a été récemment démontré que des macrophages dérivés de monocytes de la moelle osseuse peuvent représenter néanmoins une part importante (~40%) des TAM. Dans ce contexte, les deux sous-types de macrophages engagent un programme transcriptionnel différent en réponse au développement tumoral (Bowman et al., 2016).

Le poumon représente le principal site métastatique pour de nombreuses tumeurs primaires solides. Comme indiqué précédemment, le poumon est composé de sous-types de macrophages et de monocytes possédant des organisations spatiales, fonctions et origines différentes. Même si les macrophages ont été démontrés comme largement impliqués dans le développement des métastases pulmonaires, leur origine précise reste peu caractérisée.

Des combinaisons thérapeutiques ont été développées pour améliorer l'efficacité de la chimiothérapie et pour conter aux phénomènes de rechutes. Par exemple, la combinaison d'un

anticorps anti-VEGF avec des chimiothérapies alkylantes est approuvée pour un traitement de première intention du cancer du sein métastatiques (Montero et al., 2012). Ce traitement est également utilisé en première ligne pour traiter les cancers du poumon non à petites cellules avancés (Cohen et al., 2007).

Dans cette étude, nous utilisons une combinaison d'approches de cytométrie multiparamétrique, d'imagerie in situ et d'analyse transcriptomique, afin de caractériser l'origine et la fonction de différentes populations mononuclées phagocytaires dans les métastases pulmonaires. Nous portons un intérêt particulier sur l'impact de la chimiothérapie seule ou en combinaison avec un anticorps anti-VEGF sur les différents sous-types de macrophages et monocytes du poumon. Nous avons ainsi pu montrer que des macrophages résidents et recrutés sont présents dans les métastases pulmonaires et ont une implication différentielle dans la réponse à la chimiothérapie.

Principaux résultats

1-Les TAM de métastases pulmonaires sont composés de macrophages résidents et de macrophages recrutés

Apres injection I.V, les cellules de la lignée de carcinome pulmonaire TC-1 vont naturellement se loger dans le poumon pour former des nodules métastatiques (Ji et al., 1998). Nous pouvons suivre l'évolution de ces nodules tumoraux macroscopiquement, microscopiquement par fluorescence (TC-$1^{dTomato}$) et de manière longitudinale par bioluminescence (TC-$1^{Luciferease}$). La population avec un phénotype de macrophages interstitiels est la seule qui augmente de manière proportionnelle au développement métastatique, suggérant que ce phénotype correspond à celui des TAM (Figure 1E). Les nombres de cellules dendritiques $CD11b^+$ et $CD11b^-CD103^+$ ou de monocyte $Ly6C^{low}$ ne sont pas significativement affectés par la croissance tumorale alors que le nombre de macrophages alvéolaires diminue au cours du temps (Figure 1 et Figure sup 1). Nous observons une augmentation du nombre de monocytes $Ly6C^{high}$ qui est principalement due à une augmentation du compartiment extravasculaire (CD45 $I.V^-$), suggérant un processus d'extravasation dans le parenchyme pulmonaire. De plus, nous observons l'apparition d'une population $Ly6C^{high}$ $CD64^+$ principalement extravasculaire (Figure 1D). Le profil de d'expression de Ly6C et de CD64 suggère que cette dernière population représente un intermédiaire tissulaire dans un processus de différenciation des monocytes $Ly6C^{high}$ $CD64^-$ en macrophages interstitiels $Ly6C^-$ $CD64^+$ (Figure 5C). Ainsi, les monocytes semblent augmenter l'expression de CD64 avant de perdre l'expression de Ly6C lors de leur différenciation. A

l'inverse, la proportion intravasculaire de monocytes Ly6C^{low} CD64^{-} n'est pas affectée par le développement tumoral, suggérant qu'ils n'extravasent pas dans le poumon (Figure 1D).

Afin d'obtenir plus d'informations sur l'organisation spatiale des macrophages, nous avons utilisé le modèle de souris transgéniques Macblue x Cx3cr1^{egfp} décrit dans la précédente étude.

L'analyse histologique des métastases pulmonaires dans les souris Macblue x Cx3cr1^{egfp} a révélé que les tumeurs étaient infiltrées par des cellules EGFP^{+} seules ou ECFP^{+}EGFP^{+}. L'analyse de la totalité du poumon par cytométrie indique que les cellules EGFP^{+} sont principalement composées de TAM (phénotype de macrophages interstitiels) (~70%) alors que les cellules ECFP^{+}EGFP^{+} sont composées principalement de monocytes et de TAM (12% et 48.7% respectivement). Dans tous les cas, les TAM sont entièrement fluorescents dans les poumons de souris Macblue x Cx3cr1^{egfp}. Cette composition de TAM EGFP^{+} et ECFP^{+}EGFP^{+} est également retrouvée dans le modèle de métastase LLC (Lewis lung carcinoma) ainsi que dans les métastases pulmonaires du modèle spontanée Pymt-MMTV (Figure sup 3A-B).

Dans les souris Macblue x Cx3cr1^{egfp} Ccr2$^{-/-}$ la quasi-totalité des cellules EGFP+ ont disparues. A l'inverse, dans les expériences de parabiose, seules les cellules ECFP^{+}EGFP^{+} infiltrent la tumeur (Figure 2D). Ces résultats suggèrent que les TAM EGFP+ (définis comme résidents) se développent indépendamment des monocytes circulants alors que les TAM ECFP^{+}EGFP^{+} (définis comme recrutés) sont issus du recrutement monocytaire. De plus, nous avons observé que la densité de TAM EGFP^{+} était augmentée dans les nodules se développant à proximité de la plèvre ou des voies aériennes (Figure sup 3 D-F). Les macrophages interstitiels EGFP^{+} étaient localisés à ces mêmes sites dans le poumon sain.

L'analyse transcriptionnelle des TAM résidents et recrutés a révélée 604 gènes (principalement associés à des fonctions de signalisation cellulaire, de migration, de remodelage de la matrice extracellulaire et de développement tumoral) différentiellement exprimés par ces deux populations, suggérant qu'ils exercent des fonctions différentes au sein des tumeurs.

Nous avons pu associer des différences transcriptionelles à des comportements et organisations spatiales spécifiques à chaque sous-type de TAM. Les TAM recrutés présentent une vitesse de déplacement accrue alors que les TAM résident semble former un réseau interconnecté encastré dans les fibres de collagène. Les TAM résidents sont préférentiellement associés aux vaisseaux. En accord avec leurs interactions avec la matrice de collagène, l'expression des transcrits

codants pour les protéines FGF-1 (Fibroblast growth factor1), COL14A1 (Collagène de type 14), PLXNA2 (Plexin A2) et PLXNA4 (Plexin A4) est augmentée dans les TAM résidents. L'augmentation de l'expression de VCAM1 dans cette population pourrait être due à leur interaction avec le système vasculaire. Les transcrits pour le CCL2 et le CXCL13, augmentés dans les TAM résidents, pourraient contribuer à leur interaction avec les TAM recrutés. L'accumulation des TAM résidents au front invasif des tumeurs et l'expression des transcrits MARCO (Macrophage Receptor With Collagenous Structure), MMP8 (matrix metallopeptidase 8), F7 (coagulation factor VII), TNFS14 (tumor necrosis factor superfamily member 14) et THBS1 (Thrombospondin 1) suggèrent qu'ils participent préférentiellement au remodelage de la matrice extracellulaire et ainsi à l'invasion des tumeurs (Figure 3).

Les TAM résidents sont donc impliqués dans la formation de la matrice extracellulaire associée aux métastases ainsi que dans recrutement cellulaire alors que les TAM recrutés sont préférentiellement impliqués dans les processus d'invasion tumorale.

2-Les TAM résidents et recrutés sont différentiellement impliqué dans la réponse à la chimiothérapie.

Après chimiothérapie les TAM résidents et recrutés présentent des cinétiques de repopulation différentes. Les deux sous-types de TAM sont largement déplétés 3 jours après la chimiothérapie. En revanche, alors que les TAM recrutés sont rapidement reconstitués au bout de 5 jours, les TAM résidents ne sont que faiblement reconstitués. La reconstitution des TAM recrutés est issue du rebond massif de monocytes médullaires Ly6C^{high} dépendant du CCR2, qui a lieu 5 jours après la chimiothérapie (Figure 4 A-E). Dix jours après la chimiothérapie nous observons une réorganisation du TME et les cellules tumorales sont principalement entourées de macrophages recrutés (Figure 5A). Le suivi de la croissance tumorale par bioluminescence indique que la phase de rechute après chimiothérapie est fortement retardée dans les souris Ccr2$^{-/-}$, indiquant un rôle prépondérant des TAM recrutés dans ce phénomène.

3-L'anti-VEGF augmente l'efficacité de la chimiothérapie en réduisant la survie des TAM résidents et recrutés

La combinaison de la chimiothérapie à de l'anti-VEGF permet d'augmenter son efficacité quand elle est utilisée à des phases précoce et tardive du développement tumoral. Les macrophages associés aux métastases ont été précédemment décrits comme exprimant le récepteur VEGFR1. Nous avons vérifié l'expression de ce récepteur dans notre modèle. Celle-ci était restreinte aux TAM et aux intermédiaires Ly6C^{high} CD64^{+}, mais ce récepteur est

faiblement exprimé par les monocytes Ly6C^{high} CD64^{-} (Figure 6 et figure sup 7). L'efficacité de la combinaison de la chimiothérapie à l'anti-VEGF était associée à une réduction du nombre TAM sans affecter le nombre de monocytes issus du rebond médullaire. L'anti-VEGF n'affecte pas le recrutement ou l'extravasation des monocytes dans une expérience de transfert adoptif, mais réduit le nombre de TAM résidents et recrutés. Ces résultats suggèrent que l'anti-VEGF améliore l'efficacité de la chimiothérapie en réduisant la survie des macrophages.

Discussions et perspectives

Les macrophages interstitiels du poumon sont peu étudiés. A l'inverse de nombreux rôles ont été attribués aux AM et DC dans les pathologies pulmonaires, inflammatoires ou infectieuses. Une des raisons pourrait être que les macrophages interstitiels sont très faiblement représentés et donc difficile à détecter dans le poumon en condition homéostatique. Leur expression de MHCII et CD11C peut les confondre avec les DC alors que le CD64 semble être un marqueur plus robuste des macrophages. Nous avons précédemment observé une population de macrophages interstitiels exprimant uniquement l'EGFP dans les souris Macblue x Cx3cr1^{egfp} ; celle-ci n'était pas reconstituée dans les parabioses. Une étude du développement spatio-temporel des cellules phagocytaires du poumon suggère qu'une population de macrophages interstitiels à une origine embryonnaire, ils colonisent le poumon avant les AM durant le développement. Cette population persiste chez l'adulte en périphérie du poumon et autour de vaisseaux bronchiques (Tan and Krasnow, 2016). Cette localisation est cohérente avec celle des macrophages interstitiels EGFP^{+} dans les poumons sains des souris Macblue x Cx3cr1^{egfp} mais nous n'avons pas pu vérifier leur origine embryonnaire. Les résultats de notre étude suggèrent que ces macrophages interstitiels prolifèrent dans les métastases pulmonaires, contribuent au réseau de TAM et peuvent être différenciés des TAM recrutés sur la base de l'expression de l'ECFP. Les deux sous-types de TAM sont sensibles à l'administration d'un anticorps anti-CSF-1R, ce qui suggère que la faible expression d'ECFP ne reflète pas l'expression réelle du CSF1-1R dans les TAM résidents. Les raisons précises pour cette utilisation différentielle du transgène MacBlue restent obscures. Les TAM résidents pourraient avoir un programme transcriptionnel dépendant des éléments délétés dans le promoteur du transgène, qui restent présents dans le gène sauvage.

Nous avons montré que des TAM résidents et recrutés peuvent avoir des fonctions protumorales complémentaires au sein du TME. Il est important d'étudier la contribution des macrophages résidents au développent des tumeurs solides d'autres tissus. Les macrophages résidents pourraient contribuer à l'hétérogénéité cellulaire du TME de différentes tumeurs. Les

macrophages résidents, étant déjà présents dans les tissus avant le développement tumoral, sont en mesure de participer à la mise en place du TME et aux premières étapes du développement des tumeurs solides.

La chimiothérapie alkylante par cyclophosphamide induit une déplétion des TAM, qui est suivie d'un rebond de monocytes issus la moelle osseuse et permet donc une reconstitution rapide des TAM recrutés. Cette vague de recrutement semble être impliquée dans la rechute après chimiothérapie. En effet, les macrophages recrutés semblent recréer des niches favorables à la reprise de la progression tumorale après le traitement.

Dans nos expériences, nous décrivons les processus qui ont lieu après une seule dose d'agent chimiotherapeutique. Les protocoles de chimiothérapies répétées, comme souvent administré chez l'homme, sont plus difficiles à étudier et pourrait avoir un impact différent sur les réponses systémiques (l'hématopoïèse) et sur la composition cellulaire du TME.

Le VEGF a été impliqué dans les mécanismes de rechute. La combinaison de l'anti-VEGF à la chimiothérapie est supposée principalement cibler l'angiogenèse pendant la phase de rechute. Outre l'impact du VEGF sur les cellules endothéliales, il a été précédemment proposé que le VEGF agisse comme un chimioattractant pour favoriser le recrutement de monocytes (Welford et al., 2011). Plus récemment, une signalisation impliquant spécifiquement le VEGF-1R dans les TAM de métastases pulmonaires a été décrite (Qian et al., 2015). Nos résultats suggèrent que le VEGF n'agit pas sur le recrutement ou l'infiltration de monocytes mais plutôt sur la survie des TAM. Nos résultats apportent une meilleure compréhension de l'impact des thérapies anti-cancéreuses sur des acteurs clés du TME. La caractérisation de l'impact précis des drogues utilisées en clinique est cruciale pour l'optimisation des protocoles thérapeutiques anticancéreux.

Anti-VEGF targets tissue-resident and recruited macrophage recovery to limit pulmonary metastasis relapse after chemotherapy

Pierre-Louis Loyher, Pauline Hamon, Aida Meghraoui-Kheddar, Elena Goncalves, Nadège Bercovici, Camille Baudesson de Chanville, Ariel Savina, Christophe Combadière and Alexandre Boissonnas.

Abstract:

The lung is a site of metastasis seeding for many primary cancers. Although lung macrophages are clearly implicated in the promotion of cancer metastasis, their implication relative to their ontogeny has never been studied. Herein we show that tumor-associated macrophages (TAMs) are derived from both resident interstitial macrophages and monocyte-derived with specific functional behaviors associated with a distinct transcriptomic profile. CCR2-dependent rapid recovery of the monocyte-derived TAM subset was associated with tumor relapse following myeloablative chemotherapy. Combined anti-VEGF treatment directly targets TAMs recovery without affecting tumor-monocyte infiltration thereby enhancing the response to chemotherapy. Our results indentify specific interactions of cancer therapies with TAMs according to their origin and differentiation state.

Introduction:

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

Through their various cellular processes, TAMs build the collagenous niche of the TME (Afik et al., 2016), enhance invasiveness (Wyckoff et al., 2007), growth (Pollard, 2004), angiogenesis (Lewis et al., 2016), metastasis (Kitamura et al., 2015) and act as barrier against the anti-tumor response (Boissonnas et al., 2013; Broz et al., 2014). Their contribution to this pro-tumoral niche starts as soon as the arrival of pioneer metastatic cells in the lung interstitium

for instance, allowing further metastasis establishment (Headley et al., 2016). TAMs are also implicated in chemoresistance, as well as, relapse after chemotherapy, although they can in some cases be required for optimal therapy response (De Palma and Lewis, 2013).

TAMs are believed to be derived from circulating monocytic precursors (Franklin et al., 2014). In many tissues, pools of resident macrophages have been identified; these originate from embryonic precursors and self-maintain independently of hematopoietic stem cells (Perdiguero et al., 2015). As a result, both distincts transcriptional programs initiated in embryonic, fetal or adult progenitors (Mass et al., 2016) and the exposure to specific tissue environments (Gosselin et al., 2014; Lavin et al., 2014)may explain the specialization and diversity of macrophages in healthy, as well as, neoplastic tissues. However, the presence of tissue-resident macrophage within the TAM network of solid tumors has only been demonstrated recently in the context of glioblastoma (Bowman et al., 2016).

Common chemotherapies aim to preferentially target neoplasic cells one the basis of their high proliferation rate. Inevitable side effects occurs through the ablation of healthy proliferating cells, in particular, those of the immune system. Despite the fact that some beneficial effect have been observed on the stimulation of adaptive immune response by standard chemotherapies, complete tumor rejection is rare (Galluzzi et al., 2015). Transient myeloablation induced by alkylating chemotherapy leads to a rapid and massive recovery of both hematopoietic progenitor and mature monocytes mobilized from the bone marrow (Jacquelin et al., 2013). Moreover, TAMs have been shown to limit the efficacy of chemotherapeutic agents (Ruffell et al., 2014) and to promote tumor relapse (Hughes et al., 2015). Tumor revascularization via release of proangiogenic factor such as VEGFA also play a pivotal role in tumor recurrence post-therapy (Motz and Coukos, 2011). Indeed the combination of the anti-VEGF antibody Bevacizumab to chemotherapy has shown efficacy and is approved for the treatment of non-small cell lung carcinoma (NSCLC)(Sandler et al., 2006; Tang et al., 2016).

In this study, we used multiparametric flow cytometry and blood tisssue partitioning to reveal the sequence of monocytes extravasation and differentiation into TAMs along lung metastasis development, describing at the same time a novel TAMs intermediate subset. Based on transgenic fluorescent reporter mice that discriminate the lung mononuclear phagocyte subsets according to their origin and localization (Rodero et al., 2015), we further studied the lung-TAM network and showed that it is intermingled by both tissue-resident and recruited macrophages, differentially represented in TME according to the anatomical site of tumor development and differentially involved in several cellular pathways according to their transcriptome. Finally we highlight the respective implication of the different mononuclear

phagocytic cell subsets on the response to chemotherapy and provide new insights into mechanisms of action anti-VEGF mediated prevention of tumor relapse.

Material and Methods

Mice

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

Ethical statement

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

Parabiosis

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

Cells

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

All cell lines were cultured in Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 with 10% fetal bovine serum, Na-Pyruvate, anti-biotic and anti-mitotic and incubated at 37℃ in 5% CO2. For in vivo experiments, 5x10^5 cells were injected intravenously in the tail vein to generate lung metastasis.

Blood/tissue partitioning

Intravascular CD45 labelling was performed as previously described(Rodero et al., 2015). Mice were injected intravenously with 1µg of anti-CD45 (clone 30-F11). Two minutes after injection blood was drawn and mice were sacrificed. Lungs were harvested and bathed in a large volume of PBS. CD45 labelled cells in all tissue were considered to be intravascular and $CD45^-$ cells were considered to be interstitial.

Chemotherapy

Cyclophosphamide (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) treatment was performed by a single intraperitoneal injection diluted in phosphate-buffered saline (PBS) at 250mg/kg at 10 days after tumor inoculation or at 20 days for advanced cancer treatment protocols. The anti-VEFG antibody (B20-4.1.1) and isotype control were supplied by Genentech, San Francisco, CA, USA. Antibodies were administrated intraperitoneally at 5mg/kg, three times a week after chemotherapy.

Flow Cytometry

Flow cytometry acquisition was performed on the flow cytometer FACS LSR Fortessa X-20® (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) with DIVA® Flow Cytometry software and data analysed with FlowJo software (Tree Star, Inc, Ashland, OR, USA). Blood was drawn via retro-orbital puncture with heparin and directly stained with antibodies. After staining, erythrocytes were lysed with buffer containing 0.15M NH_4Cl, 0.01mM $KHCO_3$ and 0.1mM EDTA and resuspended in FACS buffer containing, PBS 0.5% BSA EDTA 2mM. Lungs were harvested and digested in RPMI medium (Gibco, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) with 1mg/mL collagenase IV (Sigma) for 30min at 37℃ and filtered through a 40- µm-pore cell strainer (Becton Dickinson, Rungis, France). 1/10th of the cell suspension was incubated with 1µg/mL purified anti-CD16/32 (2.4G2, BD Biosciences) for 10min at 4℃ then surface staining was performed by additional 20min incubation with appropriate dilution of the surface marker antibodies. For intracellular IFN-γ staining, cell suspensions were restimulated ex vivo with PMA for 3 hours at 37°C in the presence of 5µg/ml Brefeldin A. After surface staining, cells were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 20min, washed twice in perm/wash solution (BD Biosciences), incubated 10 min with 1µg/ml purified anti-CD16/32 in perm/wash at room temperature and incubated for 30min in perm/wash in the presence of anti–IFN-γ. Cells were then washed once in FACS buffer and analysed directly by flow cytometry. The panel of antibodies used was: anti-CD11b (clone M1/70), anti-Ly6C (clone AL-21), anti-Ly6G (clone 1A8), anti-NK1.1 (clone PK136), F4/80 (clone BM8), anti-IAb (clone AF6-120.1), anti-CD11c (clone HL3), anti-Siglec F (clone E50-2440), anti-CD103 (clone M290), anti-CD45 (clone 30-

F11), anti-CD64 (clone X54-5/7.1) (Pharmingen, BD Bioscience). The specific lymphoid staining panel used was: anti-CD4 (clone RM4-5), anti-CD3 (clone 145-2C11), anti-CD25 (clone PC61), anti-CD8 (clone 53-6.7), anti-B220 (clone RA3-6B2), anti-CD45 (clone 30-F11), anti-IFNγ (clone XMG1.2). Calculation of absolute cell number was performed by adding to each vial a fixed number (10.000) of nonfluorescent 10µm polybead ® carboxylate microspheres (Polysciences, Niles, IL, USA) according to the formula: Nb of cells = (Nb of acquired cells x 10.000) / (Nb of acquired beads). Number of cells obtained for each sample was normalized per mg of tissue and per mL of blood.

Multi-photon Imaging

Lung experiments were performed on freshly explanted tissue according to our previously work (Rodero et al., 2015). Lungs were carefully collected and were immobilized in an imaging chamber perfused with oxygenated (95% O_2 plus 5% CO_2) RPMI medium containing 10% FCS. Local temperature was monitored and maintained at 37℃.

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

Histology analysis

Briefly, organs were harvested and fixed in 10% formalin for 4 hours then incubated in 30% sucrose-PBS overnight at 4℃ before being embedded in Tissue –Tek OCT compound (Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, Netherlands) and frozen at -80℃. Sectioning was com pleted on

a HM550 Cryostat (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at -20°C; 5-µm sections were collected on Superfrost® Plus Slides (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) and stored at -20°C until use. Slides were counterstained and mounted with Vectashield Mounting Medium with DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole; Vector Laboratories). CD31 vascular staining and VEGF staining were performed on histological sections of lung from tumor-bearing MacBlue x Cx3cr1$^{gfp/+}$.After a quick PBS cleaning to eliminate OCT, tissue sections were rehydrated with 0.5% Triton-PBS during 10min. A first block step was realised with 3% BSA solution during 30min before to incubate 1 hour at 37℃ with the primary antibodies Rat anti-m ouse CD31 PE (clone MEC 13.3) (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) or the rat IgG2a, κ isotype control (clone eBR2a) (eBioscience, San Diego, CA, USA) and anti-VEGF clone B20-4.1.1 or isotype control (Genentech, San Francisco, CA, USA) at the appropriate dilution. Then, the slides were incubated with Avidin/Biotin Blocking Kit (SP-2001) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) following manufacturer protocol. Biotinylated secondary antibody binding (donkey anti-rat IgG for CD31 staining and an AF647 anti-mouse IgG2a for VEGF staining, (Biolegend, San Diego, CA, USA)) was then performed during 30min at room temperature followed by Cy3-conjugated Streptavidin staining during 30min at room temperature (Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA, USA). Slides were counterstained and mounted with Vectashield Mounting Medium with DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole; Vector Laboratories) and Images were acquiredwith a Zeiss Axio Z1 fluorescent microscope (Carl Zeiss, Germany) using a Zen software. Enhanced Cyan Fluorescent Protein (ECFP), Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP), DAPI, Cy3 and AF647 signals were acquired using an ExBP 475/40, EmBP 530/50 for EGFP, an ExBP 436/25, EmBP 480/40 for ECFP, an ExG365, EmBP 445/50 for DAPI, an ExBP 545/25, EmBP 605/70 for Cy3 or tdTomato and an ExBP 640/30, EmBP 690/50 for AF647 light cube filters. Acquisition settings were identical for both isotype and CD31/VEGF staining. Cell quantification was performed by counting manually the number of EGFP$^+$ECFP$^+$ and EGFP$^+$ cells in each field. Between 5 and 10 different fields were chosen from whole lung sections of at least 3 different mice and separated according to their anatomical location; in contact with the lung pleura, in contact with airways, visible by the large autofluorescent epithelial cells and in the alveolar space within the tumor parenchyma.

In vivo TC-1-Luc cell luminescence

In vivo bioluminescence imaging was conducted on the IVIS spectrum in vivo imaging system (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA), using the Living Image acquisition and analysis software (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Prior imaging, mice were injected with D-luciferin intraperitoneally (150mg/kg, 100µL/mouse) and anesthetized with isoflurane 10min. The radiance from the lung region was quantified with the same software and the intensity of all images was adjusted with the minimum and maximum of intensity between each groups.

Transcriptomic analysis:

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

Statistical Analysis

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

Results

Blood/Tissue partitioning reveals lineage differentiation sequence of TAMs

The transformed lung epithelial TC-1 cells, naturally and exclusively, home to the lung and form carcinoma nodules after I.V injection (Ji et al., 1998). In order to characterize the tumor-associated myeloid compartment implicated in tumor growth, we developed a flow-cytometry panel to differentiate Ly6C^{high} and Ly6C^{low} monocytes (Mo) subsets (CD11b^{high}SiglecF^{-} Ly6G^{-} Fc-gamma receptor 1^{-} (CD64)$^{-}$, interstitial macrophages (CD11b^{high}SiglecF^{-} Ly6G^{-} CD64^{+}), alveolar macrophages (AMs) (CD11b^{low} CD11c^{high}SiglecF^{high}), CD11b^{+} DC (CD11b^{+} I-Ab^{+} CD11c^{+} Ly6C^{-} CD64^{-}) and CD11b^{-} DC (CD11b^{-} I-Ab^{+} CD11c^{+} Ly6C^{-} CD64^{-}), neutrophils (CD11b^{high} Ly6G^{+})and eosinophils (CD11b^{high}SiglecF^{int}), according to previously described phenotypes (Misharin et al., 2013) (Sup **Figure 1A)**. The anatomic distribution of these subsets was monitored by blood/tissue partitioning using intravascular CD45 staining (Rodero et al., 2015).

The tumor-associated myeloid signature and compartmentalization was monitored using a non-supervised viSNE analysis based on 12 parameters (**Figure 1A and Sup Figure 2)** along tumor evolution **(Figure 1B)**. As we previously demonstrated (Rodero et al., 2015), in the absence of tumor the dominant lung associated myeloid signatures were AMs displaying negative intravascular CD45 staining and Ly6C^{high}, Ly6C^{low}-Mo and neutrophils that resides almost exclusively within lung vessels (intravascular CD45 bright) **(Figure 1A)**. Resident interstitial and pleural Ly6C^{-} CD64^{+} macrophages **(Figure 1B)** as well as CD11b^{+} and CD11b^{-} CD103^{+} DC subsets were detected in the lung parenchyma only **(Sup Figure 1B)**. With tumor expansion, a signature of parenchymal Ly6C^{high}-Mo appeared together with a progressive and massive accumulation of cells in the interstitial CD64^{+} macrophage signature **(Figure 1A)**. In contrast, the Ly6C^{low}-Mo signature remained exclusively in the intravascular compartment during tumor growth **(Figure 1A).** We next performed a supervised analysis based on Ly6C and CD64 expression excluding neutrophils and AMs and quantified their distribution between the vasculature and the lung parenchyma **(Figure 1C-D).** As observed in the viSNE analysis, an increased proportion of Ly6C^{high}-Mo infiltrated the lung parenchyma in the presence of the tumor cells. Over time, a transient smear of CD64 expression by Ly6c^{high} cells was observed along with a progressive loss of Ly6C expression, suggesting that Ly6C^{high} CD64^{+} cell represents an intermediate precursor in the process of Ly6C^{high}-Mo differentiation into Ly6C^{-} CD64^{+} macrophages. The CD64^{+} Ly6C^{high} intermediate was mainly parenchymal confirming a progressive differentiation ongoing with parenchymal tumor infiltration **(Figure 1C)**. The number and proportion of parenchymal Ly6C^{high}-Mo increased during the early time points **(Figure 1D)**, whereas Ly6C^{low}-Mo numbers were not significantly modified and these cells remained mostly intravascular, as shown by both supervised and non-supervised analysis

(Figure 1C-D). We evaluated the regulation of Nr4a1 expression upon monocyte infiltration using the Nr4a1-EGFP transgenic mouse (Hanna et al Science 2015). Ly6C^{high}-Mo expressing the fluorescent reporter were restricted to the vascular compartment and neither the infiltrating monocytes nor the macrophages displayed high level of GFP **(Sup Figure 1C).** Nr4a1-GFP^{bright} cells were only detected in the vascular Ly6C^{low}-Mo confirming that this subset does not contribute to the CD64^{+} macrophage accumulation and suggests that Ly6C^{high}-Mo differentiation into Ly6C^{low}-Mo and interstitial macrophages is distinct **(Sup Figure 1C)**. On day 20, the number of CD64^{-} Ly6C^{high}-Mo per mg of tissue dropped **(Figure 1D)** while the total number reached a plateau **(Sup Figure 1B).** The total number of AM tended to diminish with tumor expansion suggesting that they do not contribute to tumor growth and therefore might not be considered as tumor-associated macrophages (TAMs) **(Sup Figure 1C)**.In contrast, the number of interstitial CD64^{+} macrophages increased exponentially with tumor growth **(Figure 1D and Sup Fig 1B)**. The count of interstitial macrophages per mg of tissue correlated with the number of metastatic nodules **(Figure 1E)**, this subset will therefore be referred to as TAMs henceforth in this study.CD11b^{+} and CD11b^{-} DC subsets increased in number with tumor expansion but at a slower rate compared to TAMs**(Sup Figure 1B).** Finally, the non-supervised viSNE analysis revealed heterogeneity in the TAM signature based on phenotypic markers such as CD11c, CD206 and I-Ab **(Sup Figure 2).** For instance, a small CD206^{bright} subset was detected in tumor-free lungs located in the resident interstitial macrophage signature that strongly expanded with tumor growth. We thus hypothesized that lung resident macrophages, in addition to recruited macrophages, could give rise to TAMs.

Macblue x CX3Cr1^{gfp+} reporters discriminate TAMs of different origin

We have previously demonstrated that Macblue x CX3Cr1^{gfp+} can be used to study monocyte and macrophage subsets in lungs. In this model, ECFP and EGFP expression enable the discrimination of subsets in regard to origin, spatial organization and function (Rodero et al., 2015).

Histological analysis revealed that TC-1 pulmonary metastases were highly infiltrated by EGFP^{+} positive and EGFP^{+}ECFP^{+} double positive cells (**Figure 2A**). EGFP^{+} subsets were mainly composed of the previously defined TAMs (68%), while ECFP^{+}EGFP^{+} subsets were mainly composed of AMs (16.6%), Ly6C^{high} CD64^{-} or CD64^{+} Mo (4.9% and 8.8%) and TAMs (48.7%). These results demonstrate that the Macblue x CX3Cr1^{gfp+} model enables a complete visualization of the TAM network where two subsets of TAMs can be clearly distinguished **(Figure 2B)**. viSNE analysis of the tumor-bearing MacBlue x Cx3cr1$^{gfp/+}$ revealed that EGFP^{+} TAMs and ECFP^{+}EGFP^{+} TAMs display similar heterogeneous expression of CD206, CD11c and IA-b, showing that the difference between the two subsets must be due to other factors than maturation or polarization state **(Figure 2C)**. To gain more insight into the origin of TAMs

the distribution of $EGFP^+$ or $EGFP^+ECFP^+$ TAMs in lung pulmonary metastasis of Macblue x $Cx3cr1^{gfp/+}$ $CCR2^{-/-}$ mice, which have a defective monocyte recruitment, were analyzed by histology and flow cytometry. In pulmonary nodules of WT mice the ratio of $ECFP^+/EGFP^+$ cells was 0.57±0.1 whereas the corresponding ratio was0.14±0.08 in $CCR2^{-/-}$. Fluorescent cells detected on histological lung sections from the recipient C57Bl6 in tumor inoculated parabiont mice were almost exclusively $ECFP^+EGFP^+$ (ratio $ECFP^+EGFP^+/EGFP^+$ = 0.96±0.07)**(Figure 2D)**.FACS analysis confirmed that $ECFP^+EGFP^+$ TAMs and $Ly6C^{high}$-Mo were substantially reduced in $CCR2^{-/-}$ mice whereas levels of AMs and $EGFP^+$ TAMs were unaffected **(Figure 2E).** These results demonstrate that $ECFP^+$ $EGFP^+$ TAMs originate from recruited monocyte, whereas $EGFP^+$ TAMs arise from local proliferation of resident interstitial macrophages. These two TAM subsets were also present in Lewis lung carcinoma pulmonary metastasis **(Sup figure 3A)** as well as in pulmonary metastasis from the spontaneous breast cancer of the MacBlue x $Cx3cr1^{gfp/+}$CherryOVA-PyMT mouse model **(Sup Figure 3B),** concluding that these distinct TAM subsets are not specific to the TC-1 experimental model. We proceeded by investigating if the composition of resident and recruited TAMs depends on the anatomical location of the tumor. Subcutaneous injection of the cell line TC-1 generates solid tumors that almost exclusively are composed of $ECFP^+EGFP^+$ TAMs. In contrast, intradermal injection give rise to tumors composed of both $ECFP^+EGFP^+$ and $EGFP^+$ TAMs **(sup figure 3C).** Finally in the TC-1 model, **m**etastasis in contact with the lung pleura, nearby large airways or in the alveolar space were discriminated and anatomical difference in the relative distribution were observed between WT and $Ccr2^{-/-}$ mice **(supp Figure 3D)**. In metastasis located nearby the pleura, resident TAMs showed a relative distribution with a falling gradient with distance from the lung pleura, while the recruited TAMs distribution was equal **(sup Figure 3E)**. In metastasis developed in the central alveolar space of the lung, $EGFP^+$ resident TAMs represented 40.5±7.8% of the total TAMs. In contrast, metastasis developed near large airways, where $EGFP^+$ interstitial macrophages initially are abundant, displayed a higher representation of resident TAMs, namely 65±8.6% **(sup figure 3F)**. This suggests that the relative composition of resident and recruited TAMs in the TME is determined by the specific site of tumor development and thus will differentially promote the anatomic expansion of tumor cells.

Resident and recruited TAMs display different functional profiles.

In order to get a better understanding of the relative function of the two TAM subsets, $EGFP^+$ and $EGFP^+ECFP^+$ TAMs were sorted from 4 independent mouse groups and a whole transcriptome microarray analysis performed.

Hierarchical clustering grouped the 4 samples from each groups together with only one outsider in the $EGFP^+ECFP^+$ recruited TAM group (data not shown). We identified up to 604 genes differentially expressed by the two groups (either up or down) with a significant p value

<0.05 by student's t test **(Figure 3A).**Based on these genes, we listed their association with the more relevant functional groups, indentified by the Ingenuity Knowledge Base (with a p value under 0.01 using given by scoring method Fisher's Exact Test) **(Figure 3B)**. Globally these functional groups were involved in cellular signaling, cell morphology and trafficking with a link with cancer development and tissue remodeling. Most of these genes presented direct or indirect relationships as displayed on the graphical representation of the molecular relationships of the top 4 functional networks generated by the Ingenuity Pathway Analysis application with higher than 14 involved molecules in each networks **(Sup Figure 4)**. These networks involved several cytokine and growth factors, membrane receptors, intracellular signaling molecules and transcription regulators demonstrating that the two TAMs subsets differentially react to the tumor microenvironment and exert distinct functions **(Figure 3A-B and sup Figure 4).** Based on these results we analyzed the behavior of the two TAM subsets by live imaging of explanted lungs. The dynamic of recruited TAMs was heterogeneous either slow motile, displaying long interaction with the resident TAM or displaying higher velocity with higher straightness **(Figure 3C and Video 1).** Resident TAMs harbored a much more stellar morphology compared to recruited TAMs. They were relatively sessile but formed a dynamic interconnected network (**Figure 3D and Video 2)**. Resident TAMs extended protrusions in-between the tumor cells and their specific morphology provide somehow a surrounding interconnecting matrix often confounded with the collagen fibers **(Figure 3E)**. In metastasis, CD31 staining on histological sections revealed that the vasculature was rather at the periphery of the nodules than in the center. In blood vessel rich areas, resident TAM were still preferentially located nearby the vasculature **(Sup Figure 5A**). Accordingly we identified differential gene expressions relevant to their relative distribution and behavior. For instance, we identified transcriptomic signature linked to interaction with the extracellular matrix and the vasculature such as Fibroblast growth factors1- 1 (FGF1), Collagen type XIV alpha 1 chain (COL14A1), phosphoinositide binding protein (ARAP3) involved in adhesion-dependent processes and angiogenesis (Gambardella et al., 2010), Semaphorin receptors Plexin2 and 4 (PLXNA2 and 4) representing important regulator of angiogenesis and metastatic spreading (Tamagnone, 2012) and Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM1) that are up-regulated in the resident subset in accordance with the tight interaction with the collagen matrix **(Figure 3F)**. Their propensity to have higher CCL2, CXCL13 transcripts may contribute to their interactions with recruited TAMs. On the other side, the macrophage receptor MARCO, the matrix metallopeptidase 8 (MMP8), the coagulation factor VII (F7), tumor necrosis factor superfamily member 14 (TNFSF14) and thrombospondin 1 (THBS1) which are also all involved in extracellular matrix interactions and remodeling, are up-regulated in the recruited TAMs **(Figure 3F)**. In very large tumor nodules, accumulation of recruited TAMs were observed at the front of invasion of the tumor in accordance with a role in tumor spreading through matrix

remodeling **(sup Figure 5B)**. We concluded that while the resident TAMs seems to be associated with structural functions of the tumor environment, recruited TAMs are associated with matrix remodeling functions.

Distinct sensitivity and recovery of recruited and resident TAMs are associated with efficacy of chemotherapy

The relative contribution of the different TAM subsets on tumor relapse after alkylating-based chemotherapy was next investigated. A single injection of cyclophosphamide (CP) at day 10 led to a transient control of metastasis count (observed macroscopically) that slightly resumed 10 days after CP **(Figure 4A)**. We thus monitored the impact of this chemotherapy on the different TAMs subset by quantifying the blood/tissue partitioning of monocytes and macrophages after CP treatment. Two days after chemotherapy the number of circulating Ly6C^{high}-Mo was slightly reduced, but recovered and outnumbered 5 days after chemotherapy until 10 days. Blood Ly6C^{low}-Mo were depleted 3 days after chemotherapy and their recovery was delayed compared to Ly6c^{high} monocytes **(Figure 4B)**. In the lung, intravascular Ly6C^{high} and Ly6C^{low} monocytes were depleted 2 days post CP whereas the depletion of parenchymal Ly6c^{high} CD64^{+} Mo was delayed by one day **(Figure 4C-D)**. TAM depletion was almost complete 3 days post chemotherapy. At day 5 after CP treatment, all monocyte subsets were outnumbered concomitantly with blood monocyte rebound and subsequently diminished with tumor relapse **(Figure 4B and D)**. Both resident and recruited TAMs were depleted 3 days after chemotherapy and although recruited macrophages returned to normal numbers in accordance with the massive rebound of Ly6C^{high}-Mo, resident TAMs were barely reconstituted **(Figure 4E).**To address the hypothesis that recruited TAM are the main implicated in the process of tumor relapse, we compared tumor relapse in WT and CCr2$^{-/-}$ mice. Monocytes rebound and TAM recovery was largely reduced in Ccr2$^{-/-}$ mice (**Sup Figure 6A)**. Interestingly, tumor relapse was strongly delayed in CCR2$^{-/-}$ compared to WT mice **(Figure 4F)**. These results suggest that tumor relapse is dependent on the chemotherapy-induced monocyte rebound that repopulate the pool of recruited TAMs in the tumor microenvironment.

Recruited TAM clear apoptotic tumor cells and lead to tumor relapse

In order to provide further insights in the role of TAMs recovery in tumor relapse we performed histological analysis and live imaging following CP treatment. At the microscopic level, a strong densification of the tumor cells was observed in the tumor nodules over time. Resident and recruited TAMs distributions were more sparse in large metastasis but their ratio seemed to be unchanged **(Figure 5A)**. Five days after chemotherapy, tumor cell densification in metastasis was reduced according to nodules count **(Figure 5A)**. At this time point

ECFP$^+$EGFP$^+$ cells were more numerous than EGFP$^+$ cells and surrounding living tumor cells **(Figure 5A)**. ECFP$^+$EGFP$^+$ cells displayed intense protrusive activity toward the tumor cells and several with long displacement, in comparison, remaining EGFP$^+$ cells harbored a reduced dynamic with a loss in their interconnections **(Video 4)**. ECFP$^+$EGFP$^+$ cells accumulation was also observed in tumor apoptotic body rich areas, where EGFP$^+$ cells where even rarer. These recruited cells displayed different morphologies, either round shaped with reduced motility or stellar extending cytoplasmic protrusions. **(Figure 5B and video 5)**. Ten days after CP, the vast majority of neoplasic structures were cleared of fluorescent tumor cells but some residual disorganized tumor nodules remained including few disconnected tumor cells and even more surrounded by ECFP$^+$EGFP$^+$ cells **(Figure 5A)**. 15 days after CP, the process of metastasis destruction was further enhanced with a large accumulation of apoptotic bodies and phagocytic cells with reduced migratory pattern and lower fluorescent reporter expression **(Figure 5C and Video 6)**. Remaining live tumor metastasis were however still detectable at this late time point surrounded by numerous resident and recruited TAMs displaying intense protrusive activity toward the living tumor cells **(Video 6)**. Infiltrating CD64+Ly6C^{high}-Mo and recruited TAMs represented the most phagocytic subsets 15 days after CP treatment, while resident TAM could also phagocyte tumor cells **(Sup Figure 6B and Video 6)**.We concluded that recruited TAMs rebound participate in apoptotic cell clearance and subsequently provide a pro-tumoral environment that accelerate tumor relapse.

Anti-VEGF combination enhance the efficacy of chemotherapy

The pro-angiogenic molecule VEGF has been implicated in vessel reconstruction and tumor relapse following chemotherapy (Hughes et al., 2015; Lewis et al., 2016). The combination of anti-VEGF to chemotherapy has shown greater efficacy than chemotherapy or targeted therapy alone in patients bearing non-small cell lung cancer and metastatic breast cancer (Cohen et al., 2007; Montero and Gluck, 2012). We thought to analyze the impact of this therapeutic combination on the tumor microenvironment. Anti-VEGF was injected from day 10 at the same time as chemotherapy, and was continued every two days until day 18. Anti-VEGF had the same efficacy than CP to stop the expansion of pulmonary metastasis. The combination of anti-VEGF to chemotherapy did yield a greater therapeutic efficacy, compared to anti-VEGF or chemotherapy alone, as metastasis count was reduced from day 15 to day 20 suggesting a more efficient destruction of the tumor nodules **(Figure 6A-B)**. We determined the impact of the combined therapy on the previously described myeloid signatures of the tumor microenvironment. viSNE analysis clearly showed a specific reduction of the TAM signature (blue signature) between days 15 and 20 of the combined regimen, while the parenchymal monocyte subset (red signature) persisted at day 20 compared to single CP or anti-VEGF treatment **(Figure 6C)**. All other subset signatures, CD11b$^+$ and CD11b$^-$ DC, AM

and neutrophils were not specifically affected by the combined treatment. Quantification of the number of cell/mg of tissue confirmed that the combination of CP and anti-VEGF blocked TAM recovery whereas neither the Ly6C^{high}-Mo rebound no their parenchymal infiltration were affected **(Figure 6D)**. Improvement of chemotherapy efficacy by anti-VEGF combination was also observable when treatment was started at a very advanced stage of tumor development (Day 20 after tumor inoculation) and also prolonged mice survival compared to both treatment alone **(Supp Figure 7A-C).** In the same line, combination therapy in advanced stage tumor growth led to a significant decreased in TAMs numbers, as compared to mice treated with CP alone **(Supp figure 7D)**. These results further confirm the role of the monocyte-derive TAM subset in tumor relapse. We concluded that the efficacy of the combined regimen cannot be attributed to reduced monocyte infiltration but rather to the inhibition of their differentiation and survival into TAMs.

Anti-VEGF reduces TAM survival

VEGF could act as a survival factor for TAMs, as they have been shown to express VEGFR1 (FLT1) in lung metastases (Qian et al., 2015). Anti-VEGF treatment targeted both recruited and resident macrophages **(Figure 7A)** suggesting that TAM survival rather than monocyte differentiation is targeted by anti-VEGF. We verified FLT1 expression by the myeloid compartment in pulmonary metastasis. FLT1 expression was observed on both TAMs and Ly6c^{high} CD64^{+} cells, whereas the percentage of positive cells was low in Ly6C^{high} and Ly6c^{low}-Mo **(Figure 7B)**. Immuno-histological analysis of lung sections revealed that VEGF was found mainly along blood vessels but also in close proximity to TAMs **(Figure 7C)**. To further confirm that anti-VEGF treatment affect the TAM survival rather than TAM proliferation we adoptively transferred bone-marrow monocytes from Macblue x CX3Cr1^{gfp+} in anti-VEGF or isotype treated WT mice and analyzed the phenotype of fluorescent cells recovered 24 hours later. The percentage of recovered TAMs was significantly reduced whereas the proportion of Ly6C^{high} monocytes significantly increased. Within the recovered monocytes, the fraction of extravasated (intravascular CD45^{-}) cells was unchanged, confirming that anti-VEGF act as a survival factor for TAMs that is upregulated upon monocyte differentiation **(Figure 7D)**.

Discussion

The lung environment is densely colonized by subsets of mononuclear phagocytic cells displaying various spatial organization, functions and dependence for blood monocytes for their maintenance. Elegant studies have highlighted the embryonic origins of most tissue-resident macrophages (Perdiguero et al., 2015). In contrast to alveolar macrophages (Guilliams et al., 2013) or lung dendritic cells (Thornton et al., 2012), little is known about the functions and origin of lung interstitial macrophages. A recent study indicates that a population of interstitial macrophage, seeded during embryonic development, persists in peripheral and perivascular regions of the adult lung. On the other hand, monocyte-derived cells diffuse throughout the interstitium only after birth (Tan and Krasnow, 2016). The origin of TAMs has not yet been fully established, and they are currently considered to be mainly derived from recruited monocytes. The implication of the chemokine receptor CCR2 in the recruitment of monocytes and on the subsequent differentiation of these into TAMs, is well established in both primary and metastatic sites of various tumor types. This CCR2/CCL2 axis contribute to an amplification loop of tumor progression (Franklin et al., 2014; Kitamura et al., 2015; Loyher et al., 2016). In situ proliferation has been demonstrated to contribute to the accumulation of macrophages in tumors (Tymoszuk et al., 2014). Based on the MacbluexCX3CR1^{gfp} model, we were able to detect an EGFP^{+} TAM subset that was unaffected by CCR2 deficiency and not reconstituted in parabiosis experiments, suggesting that this subset originate from proliferating macrophages that were already present in the healthy lung before tumor development. The presence of tissue resident and monocyte-derived TAMs has recently been discovered in brain tumors (Bowman et al., 2016). Our study demonstrate that resident macrophages constitutes an important fraction of the lung TAM compartment. Interestingly, only lung interstitial macrophages were involved in tumor development while the AM pool progressively diminished with tumor growth. Within metastatic nodules, the relative distribution and abundance of resident TAMs compared to the recruited ones were in accordance with the localization of interstitial macrophages prior to tumor development. However, we cannot directly conclude weather resident TAM are of embryonic origin or long-lived adult monocyte-derived macrophages as our time resolution in parabiont mice was not more than one month. Previous studies based on subcutaneously injected cell lines strongly argued in favor of an exclusive monocytic origin of TAMs (Cortez-Retamozo et al., 2012; Shand et al., 2014), which also was observed when TC-1 cells were injected by the same route. Contrariwise, when injected in the resident-APC rich dermis for instance, we could detect the presence of resident TAMs. These discrepancies are thus likely to contribute to the heterogeneity of macrophages within the TME of different cancer types. Nonetheless, in lung metastasis, monocyte-derived TAMs were slightly more abundant than their resident counterpart. Based on Blood/tissue partitioning we have been able to characterize the sequence of monocyte infiltration and

progressive differentiation into TAM. We combined this technic with a large panel of surface antibody to efficiently discriminate the various lung mononuclear phagocytic cells and their compartmentalization. Early during lung metastasis development we observed an increase in the number of Ly6C^{high} monocytes. Extravasated Ly6C^{high} monocytes seem to up-regulate CD64 leading the appearance of an intermediate TAM precursor. At later time points, TAMs became from far the most abundant population and correlated with the number of metastatic nodules. Ly6C^{low} did not seem to extravasate, indicating that they're recently described role in surveillance of metastasis is performed intravascularly (Hanna et al., 2015). The absence of GFP upregulation in the Nr4A1-GFP reporter mouse suggests either that Nr4A1 activation is transient upon monocyte differentiation into TAM or that the process is Nr4A1-independent. However it clearly demonstrated than Ly6C^{low} Mo does not participate in TAM accumulation.

In situ imaging combined with transcriptomic comparison provided insight onto the relative contribution of resident vs recruited TAMs to the TME. Resident macrophages formed a sessile, interconnected network embedded in collagen rich matrix. Collagen type XIV production by macrophages has recently been associated with the building of tumor collagenous matrix (Afik et al., 2016). Indeed, resident TAMs displayed an upregulation of the COL14A1 transcript but also transcripts associated with cell clustering and interaction with Extra Cellular Matrix and the fibroblast growth factor FGF1. Their enhanced expression of vascular interacting VCAM1 and lung vascular remodeling PLXNA2-4 genes (Degenhardt et al., 2013)could be linked to their perivascular origin (Tan and Krasnow, 2016). Finally, a 3 fold enrichment in CCL2 transcript in resident TAMs argue in favor of a role in further macrophage recruitment to the TME. Recruited TAMs displayed increased motility, in accordance to enrich cellular movement associated pathways, and turn up to accumulate at the invasive front. In this regard, MMP8 and TNFSF14 (implicated in airway remodeling)(Doherty et al., 2011; Sibilano et al., 2016)enrichment could argue for a licensing of recruited TAMs for the remodeling of the surrounding environment thereby enhancing the mobilization of tumor cells.

The appearance of pulmonary metastasis remains a lethal determinant in many cancers and various combinations have been implemented to improve the outcome of conventional therapies. The targeting of VEGF in combination with chemotherapy is approved by FDA for instance. Although TAMs have clearly been shown to participate to the processes of angiogenesis within tumor (Lewis et al., 2016), few studies have investigated the impact of this therapeutic combination on the immune cellular composition of the TME. Moreover, FLT1 expression and signaling by pulmonary TAMs is implicated in their protumoral activity partly via downstream regulation of the master macrophage regulator CSF1 (Qian et al., 2015). After a significant depletion of both resident and recruited TAMs, alkylating chemotherapy induced a massive rebound of bone marrow derived monocytes. This resulted in a more rapid reconstitution of recruited TAMs, which when blocked by CCR2 deficiency prevented the

occurrence of tumor relapse. These results suggested a limited role of resident macrophage in tumor relapse after chemotherapy. Combination with anti-VEGF following chemotherapy efficiently enhanced the therapeutic efficacy, anti-tumor effectors functions and mice survival in comparison to mice treated with chemotherapy alone. Interestingly, this beneficial effect was associated with drastic reduction of TAMs replenishment without affecting circulating $FLT1^{-}$ monocytes. We propose that anti-VEGF may act directly on TAMs by blocking their survival in vivo, but the implication of CSF1 to this effect remains to be addressed. The clinical relevance of our results lie in the fact that anti-VEGF could prevent the chemotherapy-induced secondary adverse effect though functions that go beyond its main expected role on angiogenesis. Increasing knowledge into the impact of such molecule on tumor-associated cells might allow to further develop and improve anticancer regiment's dosages and combinations, notably those simultaneously targeting the TME.

Figure Legends

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

(A) Representative tSNE dimension 1 and 2 plots of the lung myeloid compartment evolution after TC1 cell intravenous inoculation. Cell subsets are color grouped according to their biased definition described in supp Figure 1 (upper panel).Lower panels delineate cell blood / tissue partitioning over time, according to intravascular CD45 in vivo staining. **(B)** Monitoring of tumor growth in wild type (WT) mice by bioluminescence imaging after -Luciferase-expressing TC1 inoculation. **(C)** Dot plots show Ly6C and CD64 expressions of $CD45^{+}$ $CD11b^{high}$Siglec-F^{-} $Ly6G^{-}$ lung cells over time after tumor inoculation (upper panels). Histogram show blood / tissue partitioning of each subset after CD45 intravascular staining at different time points (lower panels). For all plots, the mean percentage±SD in each quadrant are indicated **(D)** Blood / tissue partitioning monitoring of lung monocytes and macrophages during tumor growth (Bars represent mean of the absolute number±SEM /mg of tissue). For all panels n= 6-8 mice per time point out of 3 independent experiments, Two-way ANOVA with Bonferoni multicomparison test was performed. Only statistical differences compared to tumor-free mice day 0 are indicated for each compartment.*: $p<0.05$; **: $p<0.01$; ***: $p<0.001$; ****$p<0.0001$). **(E)** Linear regression of the correlation between the number of TAMs and the number of tumor nodules.

Supplementary Figure 1: Characterization of the lung tumor-associated mononuclear phagocyte system

(A) Flow cytometry dot plots show the gating strategy to discriminate lung mononuclear phagocytes in tumor-free and tumor-bearing animals. **(B)** Blood / tissue partitioning monitoring of lung monocytes and macrophages during tumor growth (Bars represent mean of the total number of cell ±SEM). For all panels n= 6-8 mice per time point out of 3 independent experiments, Two-way ANOVA with Bonferoni multicomparison test was performed. Only statistical differences compared to tumor-free mice day 0 are indicated for each compartment. *: $p<0.05$; **: $p<0.01$; ***: $p<0.001$; $p<0.0001$). (C) Dot plots show the monitoring of Nr4a1 activation on the different monocytes and macrophages of tumor-bearing Nr4a1-GFP transgenic mice.

Supplementary Figure 2: tSNE analysis of the lung tumor-associated mononuclear phagocyte system

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

Figure 2: MacBlue x Cx3cr1$^{gfp/+}$ reporters discriminate TAM of different origins

(A) Lung cryo-sections from tumor-free and tumor-bearing (D15 after TC-1 inoculation) MacBlue x Cx3cr1$^{gfp/+}$ mice show ECFP^{+} cells (cyan), EGFP^{+} cells (green) and DAPI (grey). **(B)** Dot plot shows the relative expression of ECFP and EGFP among total lung cells 15 days after TC-1 injection (mean percentage ±SD of EGFP^{+}ECFP^{+} cells (Cyan gate) and EGFP+ cells (green gate) are indicated. Pie charts indicate the cellular composition of the EGFP^{+}ECFP^{+} cell gating (Cyan) and EGFP^{+} cell gating (green). Mean percentage are indicated. **(C)** Non-supervised tSNE dimension 1 and 2 analysis indicate the EGFP^{+}ECFP^{+} (cyan gate)and EGFP^{+} (green gate) TAM signatures according to the relative expression intensity of each indicated phenotypic markers in TC-1 tumor-bearing MacBlue x Cx3cr1$^{gfp/+}$ mice at D15. **(D)** Lung cryo-sections show the distribution of EGFP^{+}ECFP^{+} and EGFP^{+} cells in tumor-bearing MacBlue x Cx3cr1$^{gfp/+}$ (WT), MacBlue x Cx3cr1$^{gfp/+}$ Ccr2$^{-/-}$ (Ccr2$^{-/-}$) mice and C57Bl6 host parabiont with MacBlue x Cx3cr1$^{gfp/+}$ mice, 15 days after TC-1 inoculation. Right panel shows the quantification based on histological analysis. Each dot represents a distinct field of tumor nodules, data are pooled from 3 to 7 different mice. ANOVA with Bonferroni multiple comparisons test was performed, ***: $p<0.001$. **(E)** Flow cytometry quantification of the cell number /mg of tissue in tumor-bearing MacBlue x Cx3cr1$^{gfp/+}$ (WT) and MacBlue x Cx3cr1$^{gfp/+}$ Ccr2$^{-/-}$ (Ccr2$^{-/-}$) mice 15 days post TC-1 inoculation.

Supplementary figure 3: Resident and recruited TAMs harbor different anatomical distribution

(A) Lung cryo-section shows the distribution of EGFP^{+}ECFP^{+} and EGFP^{+} cells in Lewis-lung carcinoma-bearing MacBlue x Cx3cr1$^{gfp/+}$. **(B)** (Left panel) Lung cryo-section shows the distribution of EGFP^{+}ECFP^{+} and EGFP^{+} cells in spontaneous pulmonary metastasis from MacBlue x Cx3cr1$^{gfp/+}$ MMTV-PyMT mouse bearing primary breast cancer. (Right panels) show the lack of EGFP^{+} cells in pulmonary metastasis from C57Bl6 MMTV-PyMT host parabiont bearing primary breast cancer, with MacBlue x Cx3cr1$^{gfp/+}$ MMTV-PyMT mouse.**(C)** Images show the distribution of EGFP^{+}ECFP^{+} and EGFP^{+} cells in solid tumor cryosection from MacBlue x Cx3cr1$^{gfp/+}$, 10 days after subcutaneous or intradermal inoculation of TC-1 cell line. **(D)** Relative frequency of metastases in the different anatomical niches of the lungs determined by histological analysis of lung cryo-section 15 days after TC-1 i.v. inoculation in WT and Ccr2$^{-/-}$ mice. Bars indicated mean±SEM of the relative proportion calculated from the whole lung cryo-sections of 5 different mice in each group. Two-ways ANOVA with Bonferroni multiple comparisons test was performed. **(E)** Lung cryo-section shows the distribution of EGFP^{+}ECFP^{+} and EGFP^{+} cells in TC-1 pulmonary metastasis located in the vicinity of the pleura. Graph represent the relative distribution of EGFP^{+} resident TAMs and EGFP^{+}ECFP^{+} recruited TAMs as a function of the deepness from the surface (pleura) (Data are pooled from 3-4 different mice, Two-ways ANOVA with Bonferroni multiple comparison tests was performed). **(F)** Lung

cryo-section shows the distribution of $EGFP^+ECFP^+$ and $EGFP^+$ cells pulmonary metastases located in the alveolar space or near large airways 15 days after TC-1 inoculation. Graph represents the percentage of resident TAMs among total TAMs in each sub-anatomic compartment quantified by histological analysis (Data are pooled from 3-4 different mice, non-parametric Student t test was performed). * $p<0.05$; **** $p<0.001$.

Figure 3: Resident and recruited TAMs differentially express transcriptomic functional clusters according to their dynamic and distribution patterns

(A) Hierarcherical clustering of differentially regulated transcripts distinguishes recruited and resident TAMs (n= 4 independent cell preparation in each group, each sorting where performed from a pool of 2 to 3 mice). (B) Enriched function groups that distinguished recruited and resident TAMs based on Ingenuity Pathways Analysis with a p value <0.01. Time-lapse two-photon laser scanning microscopy imagesequences showing different behavior of recruited $ECFP^+EGFP^+$ cells, either highly motile (up) or making long lasting interaction with resident $EGFP^+$ TAMs(down). Scatter plots represent the mean velocity and the track straightness of the TAM subsets in lung metastasis at day 15 **(see sup movie 1-2)**. Percentage indicated the proportion of cell above the indicated threshold (dashed line). Data are pooled from 4 to 5 different mice, Mann whitney tests have been performed ** $p<0.01$, *** $p<0.001$. (D) Time lapse image sequence showing the dynamic of resident $EGFP^+$ TAMs interconnections (dashed circle). (E) Two-photon laser scanning microscopy images with 3D-rendering masks, show the close contact of resident $EGFP^+$ TAMs with collagen fibers detected by second harmonic generation (SHG) and the dense network formed in-between the tdTomato+ TC-1 cells. (F) Heatmap showsa selection of transcripts involved in extracellular matrix interaction and remodeling, differentially expressed between resident and recruited TAMs.

Supplementary Figure 4Top 4 differentially regulated functional networks in resident and recruited TAMs

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

Supplementary Figure 5. **Anatomic distribution and function relations between resident and recruited TAMs**

(A) Lung cryo-sections from TC-1 tumor-bearing MacBlue x $Cx3cr1^{gfp/+}$ at day 15show TAM subsets distribution regarding tumor vasculature using CD31 staining. Close interactions of

EGFP^{+} TAMs with the vasculature are indicated in higher magnification images (white arrows). **(B)** Lung cryo-sections from tdTomato TC-1 tumor-bearing MacBlue x Cx3cr1$^{gfp/+}$ show recruited TAM accumulation in the invasive front of the lung metastasis.

Figure 4. **Distinct sensitivity and recovery of monocyte derived and resident TAMs**

(A) The impact of CP treatment on tumor growth was monitored over time. Left panel represents the number of tumor nodules counted macroscopically, right panel represent the evolution of the lung weight (mean ±SEM are represented, n= 6 to 15 mice out of 3-5 different experiments, two-ways ANOVA with Bonferroni multiple comparisons test was performed). (B) Graphs represent the kinetic of Ly6Chigh and Ly6Clow Mo recovery in the blood, after CP treatment (Mean absolute number / ml of blood ±SEM are represented, n = 6-10 mice out of 2-4 independent experiment, two-ways ANOVA with Bonferroni multiple comparisons test was performed) **(C)** Dot plots show Ly6C and CD64 expressions of CD45^{+} CD11b^{high}Siglec-F^{-} Ly6G^{-} lung cells over time after CP treatment. Mean percentage±SD in each quadrant are indicated. (**D)** Blood / tissue partitioning monitoring of lung monocytes and macrophages during tumor growth (Bars represent mean of the absolute number±SEM /mg of tissue, n= 6-10 mice per time point out of 2-4 independent experiments, Two-way ANOVA with Bonferoni multicomparison test was performed. Only statistical differences compared to tumor-free mice day 0 are indicated for each compartment)**(E)** Quantification of recruited and resident TAMs from MacBlue x Cx3cr1$^{gfp/+}$mice treated or not with CP (Bars represent mean of the absolute number±SEM/mg of tissue, n= 4-10 mice per time point, Two-way ANOVA with Bonferoni multicomparison test was performed)**(F)** Monitoring the effect of CP treatment on tumor growth in wild type (WT) and Ccr2$^{-/-}$ mice by bioluminescence imaging after -Luciferase-expressing TC1 inoculation (n= 5 mice per group, data are representative of 5 independent experiments, , Two-way ANOVA with Bonferoni multicomparison test was performed).

For all panels * p<0.05; ** p <0.01; ***p<0.001; **** p<0.0001.

Figure 5 Recruited TAM clear apoptotic tumor cells and lead to tumor relapse

(A) Lung cryo-section from tdTomato TC-1 tumor bearing MacBlue x Cx3cr1$^{gfp/+}$ mice show TAM subsets distribution and interaction with tumor cells along tumor growth and following CP treatment. **(B)** Two-photon laser scanning microscopy 3D reconstructions show TAM interactions with tdTomato TC-1 tumor cells and phagocytosis following CP treatment.

Supplementary Figure 6 Apoptotic tumor cells are cleared by recruited TAM

(A) Comparison of Ly6Chigh Mo and TAM recovery 5 days after CP treatment in WT and Ccr2-/- mice. Bars represent mean ±SEM of the absolute number of cell /mg of tissue, n = 10 mice per group out of 2 independent experiments, one way ANOVA with Bonferroni multiple

comparisons test was performed). **(B)** Dot plots show tdTomato TC-1 phagocytosis by the indicated mononuclear phagocyte subsets (red). Fluorescent background from non-fluorescent TC-1 tumor is overlayed (black). **(C)** Quantification of the proportion of phagocytic cell at different time point after CP treatment. Bar represent mean±SEM of 9 mice out of 3 independent experiments, two-ways ANOVA with bonferroni multiple comparisons test has been performed. For all panels * p<0.05; ** p <0.01; ***p<0.001; **** p<0.0001.

Figure 6: Anti-VEGF combination enhances the efficacy of chemotherapy

(A) Schema of the combined therapy. Anti-VEGF or isotype control were injected i.p. every two days at 5mg /kg following CP treatment. **(B)** Tumor nodules were counted macroscopically at day 15 and 20 following the indicated therapy. Bars represent mean±SEM of 5 mice data are representative of 2 independent experiments, student t test was performed to compare the evolution of tumor growth **(C)** Representative tSNE dimension 1 and 2 plots show the impact of the different therapies on the myeloid signature between D15 and D20. Cell subsets are color grouped according to their biased definition described in supp Figure 1. Dashed blue gate delineate cell blood / tissue partitioning according to intravascular CD45 in vivo staining. (D) Quantification of the number of cell per mg of tissue at day 15 and 20 of the indicated therapy. Bars represent mean ±SEM n= 8-10 mice out of 3 independent experiments, Two-way ANOVA with Bonferroni comparing CP with CP +antiVEGF was performed. For all panels * p<0.05; ** p <0.01; ***p<0.001; **** p<0.0001.

Supplementary Figure 7Anti-VEGF combination enhances the efficacy of chemotherapy in advanced pulmonary metastasis development

(A) Schema of the combined therapy of advanced lung metastasis development. Anti-VEGF or isotype control were injected i.p. every two days at 5mg /kg following CP treatment started on advanced cancer (day 20 after tumor inoculation). **(B)**Representative photos of tumor-bearing lung at D22 for control mice and D28 for treated mice show the efficacy of combined therapy in advanced lung cancer. Corresponding lung weights are quantified (n= 10 mice per group from 2 independent experiments, one-way ANOVA with Bonferroni multiple comparisons test was performed). **(C)** Survival curve show the efficacy of combined therapy (n= 7 mice per group data are representative of 2 experiments. (D) Quantification of the TAM number per mg of tissue from flow cytometry data in tumor-free mice, 22 days after TC-1 inoculation (Ctrl) and at day 28 after the indicated treatments (n= 10 mice per group from 2 independent experiments, one-way ANOVA with Bonferroni multiple comparisons test was performed). For all panels * p<0.05; ** p <0.01; ***p<0.001; **** p<0.0001.

Figure 7: Anti-VEGF reduces TAM survival

(A) Mice were inoculated with TC-1 tumor cell line and injected i.p. every two days between day 10 and 20 with anti-VEGF or isotype control at 5mg/kg. Quantification of the lung weight at day 20 is represented (left panel). The numbers of resident, recruited and alveolar macrophages were quantified (middle panel). The relative proportion of resident TAM among total TAM (excluding AMs) is represented (For all panels, bars indicate mean ±SEM, n= 7-8 mice out of 2 experiments, student t test was performed for lung weight and two-way ANOVA with Bonferroni multiple comparisons test was performed for macrophage quantification). **(B)** Dot plots show the expression of FLT1 (VEGF-1 receptor) on the indicated subsets. Isotype control staining is overlaid in black. Percent ±SD are indicated n=4). **(C)** Lung cryo-section from tumor-bearing MacBlue x Cx3cr1$^{gfp/+}$ mouse shows TAM distribution regarding the expression of VEGF in tumor metastasis. Anti-VEGF isotype staining is represented (lower image). **(D)** Bone marrow monocytes were labeled and adoptively transferred in tumor-bearing WT mice treated or not with anti-VEGF. Adoptively transferred monocytes were recovered 24 hours later and their differentiation was evaluated. Bars represent mean ±SEM n =4 of the relative proportion of recovered cells, two way ANOVA with Bonferroni multiple comparisons test was performed. **(E)** Schematic representation of the impact of anti-VEGF in the differentiation sequence of monocyte into TAM.

References

Afik, R., Zigmond, E., Vugman, M., Klepfish, M., Shimshoni, E., Pasmanik-Chor, M., Shenoy, A., Bassat, E., Halpern, Z., Geiger, T., et al. (2016). Tumor macrophages are pivotal constructors of tumor collagenous matrix. J Exp Med 213, 2315-2331.

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

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

Broz, M. L., Binnewies, M., Boldajipour, B., Nelson, A. E., Pollack, J. L., Erle, D. J., Barczak, A., Rosenblum, M. D., Daud, A., Barber, D. L., et al. (2014). Dissecting the tumor myeloid compartment reveals rare activating antigen-presenting cells critical for T cell immunity. Cancer Cell 26, 638-652.

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

Cortez-Retamozo, V., Etzrodt, M., Newton, A., Rauch, P. J., Chudnovskiy, A., Berger, C., Ryan, R. J., Iwamoto, Y., Marinelli, B., Gorbatov, R., et al. (2012). Origins of tumor-associated macrophages and neutrophils. Proc Natl Acad Sci U S A 109, 2491-2496.

De Palma, M., and Lewis, C. E. (2013). Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies. Cancer Cell 23, 277-286.

Degenhardt, K., Singh, M. K., Aghajanian, H., Massera, D., Wang, Q., Li, J., Li, L., Choi, C., Yzaguirre, A. D., Francey, L. J., et al. (2013). Semaphorin 3d signaling defects are associated with anomalous pulmonary venous connections. Nat Med 19, 760-765.

Doherty, T. A., Soroosh, P., Khorram, N., Fukuyama, S., Rosenthal, P., Cho, J. Y., Norris, P. S., Choi, H., Scheu, S., Pfeffer, K., et al. (2011). The tumor necrosis factor family member LIGHT is a target for asthmatic airway remodeling. Nat Med 17, 596-603.

Engelhardt, J. J., Boldajipour, B., Beemiller, P., Pandurangi, P., Sorensen, C., Werb, Z., Egeblad, M., and Krummel, M. F. (2012). Marginating dendritic cells of the tumor microenvironment cross-present tumor antigens and stably engage tumor-specific T cells. Cancer Cell 21, 402-417.

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

Galluzzi, L., Buque, A., Kepp, O., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2015). Immunological Effects of Conventional Chemotherapy and Targeted Anticancer Agents. Cancer Cell 28, 690-714.

Gambardella, L., Hemberger, M., Hughes, B., Zudaire, E., Andrews, S., and Vermeren, S. (2010). PI3K signaling through the dual GTPase-activating protein ARAP3 is essential for developmental angiogenesis. Sci Signal 3, ra76.

Gosselin, D., Link, V. M., Romanoski, C. E., Fonseca, G. J., Eichenfield, D. Z., Spann, N. J., Stender, J. D., Chun, H. B., Garner, H., Geissmann, F., and Glass, C. K. (2014). Environment drives selection and function of enhancers controlling tissue-specific macrophage identities. Cell 159, 1327-1340.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Sandler, A., Gray, R., Perry, M. C., Brahmer, J., Schiller, J. H., Dowlati, A., Lilenbaum, R., and Johnson, D. H. (2006). Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. N Engl J Med 355, 2542-2550.

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

Sibilano, R., Gaudenzio, N., DeGorter, M. K., Reber, L. L., Hernandez, J. D., Starkl, P. M., Zurek, O. W., Tsai, M., Zahner, S., Montgomery, S. B., et al. (2016). A TNFRSF14-FcvarepsilonRI-mast cell pathway contributes to development of multiple features of asthma pathology in mice. Nat Commun 7, 13696.

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

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

Tang, N., Guo, J., Zhang, Q., Wang, Y., and Wang, Z. (2016). Greater efficacy of chemotherapy plus bevacizumab compared to chemo- and targeted therapy alone on non-small cell lung cancer patients with brain metastasis. Oncotarget 7, 3635-3644.

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

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

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

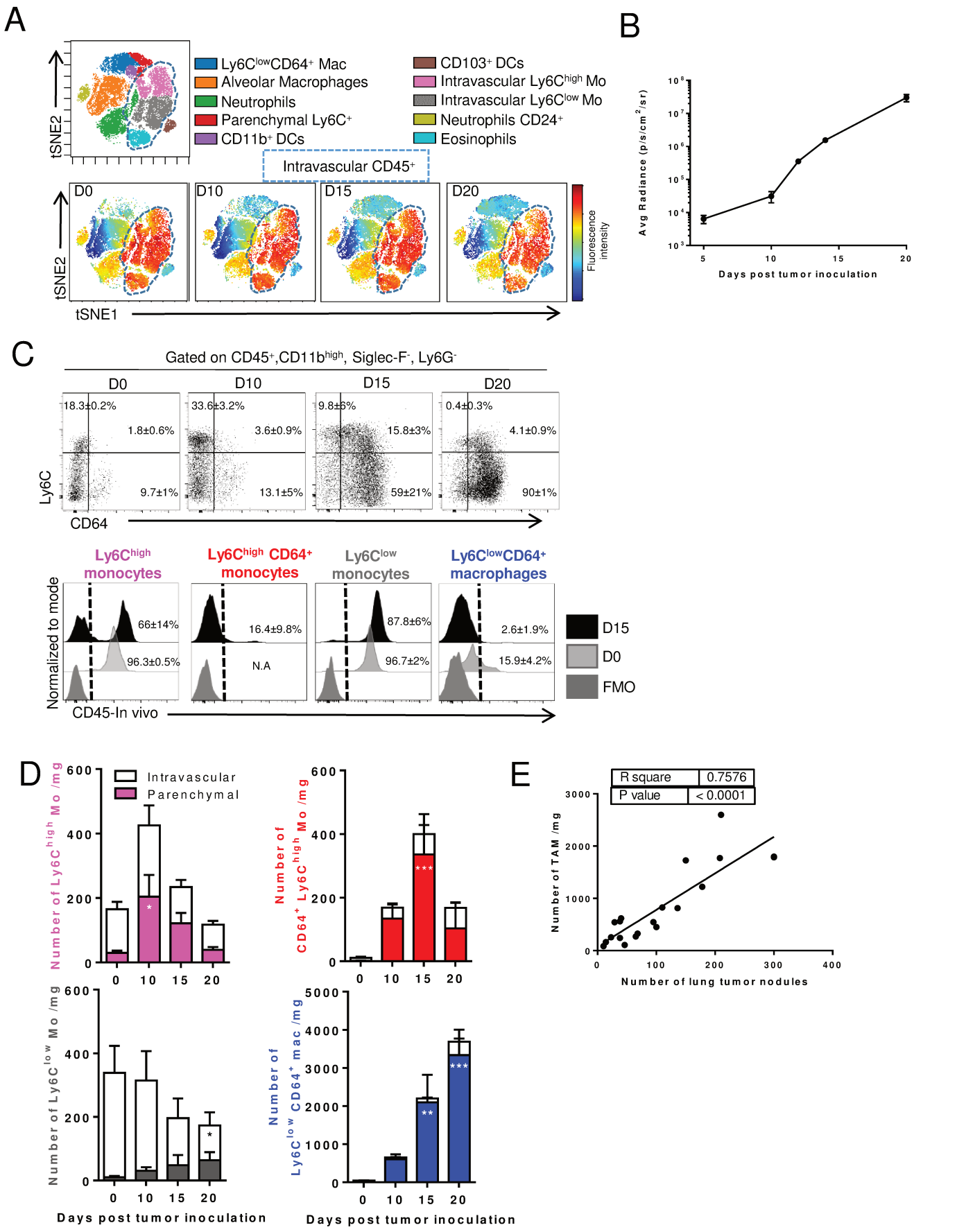
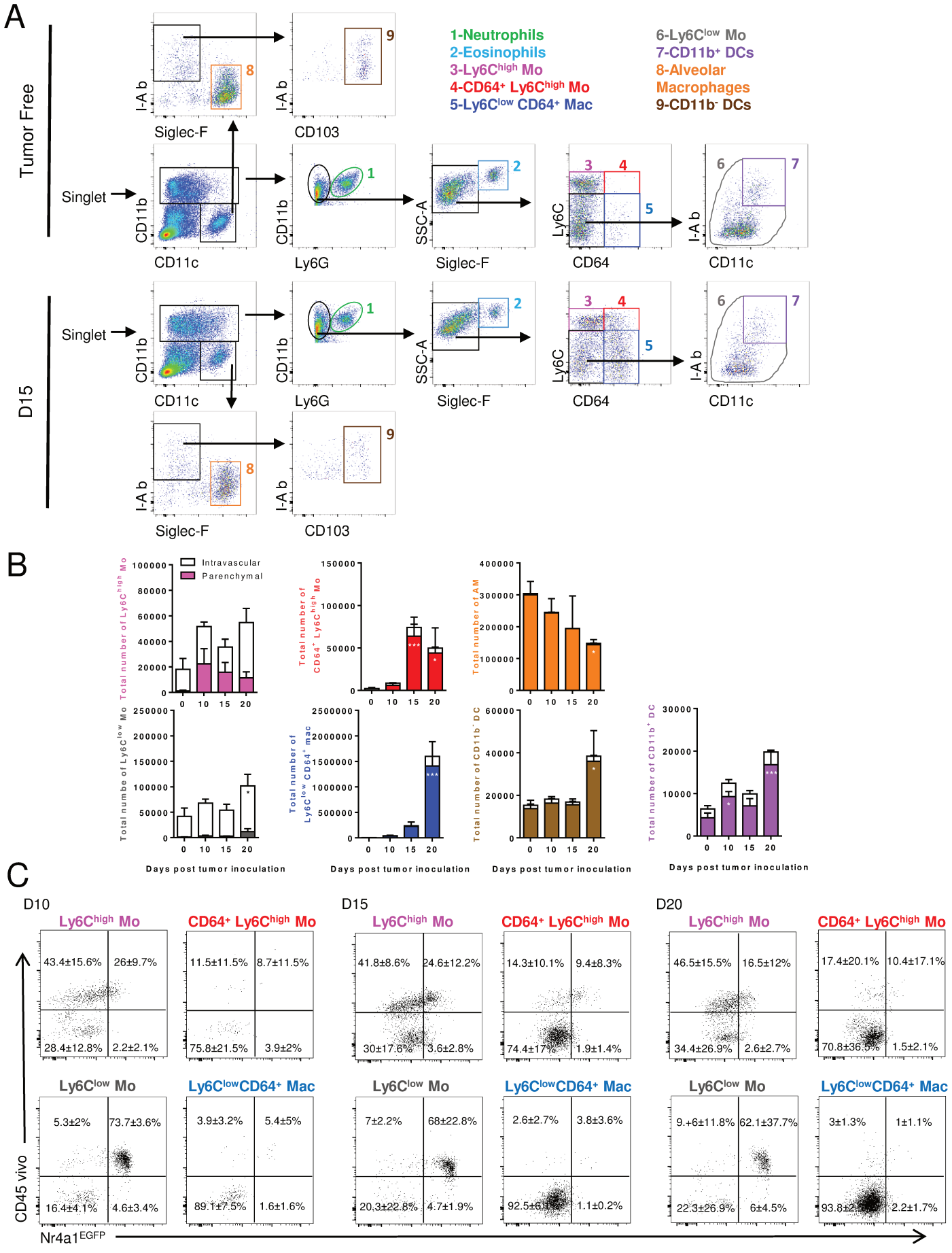
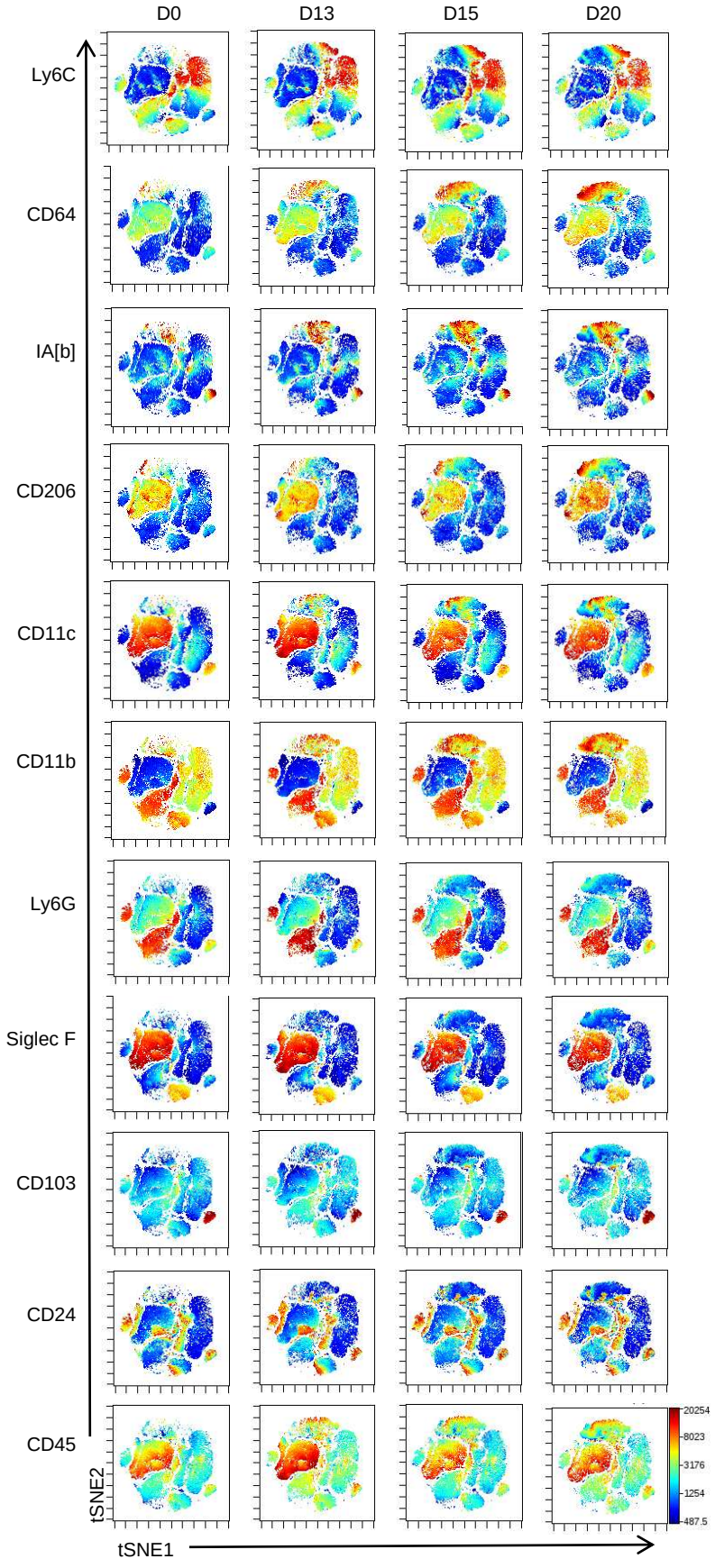


Figure 1: Blood/Tissue partitioning reveals lineage differentiation sequence of TAMs



Supplementary Figure 1: Characterization of the lung tumor-associated mononuclear phagocyte system



Supp Figure 1: Characterization of the lung tumor-associated mononuclear phagocyte system

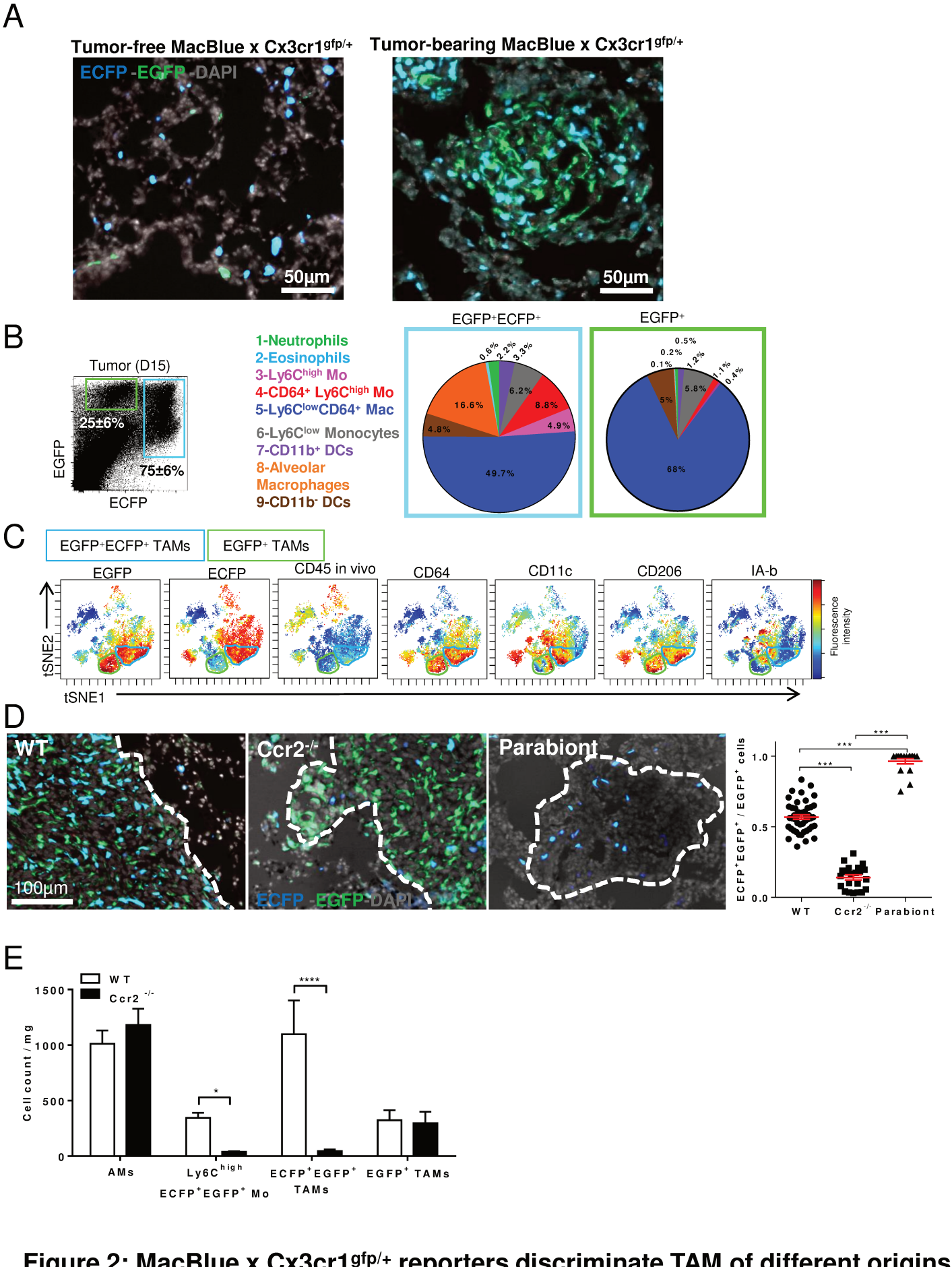
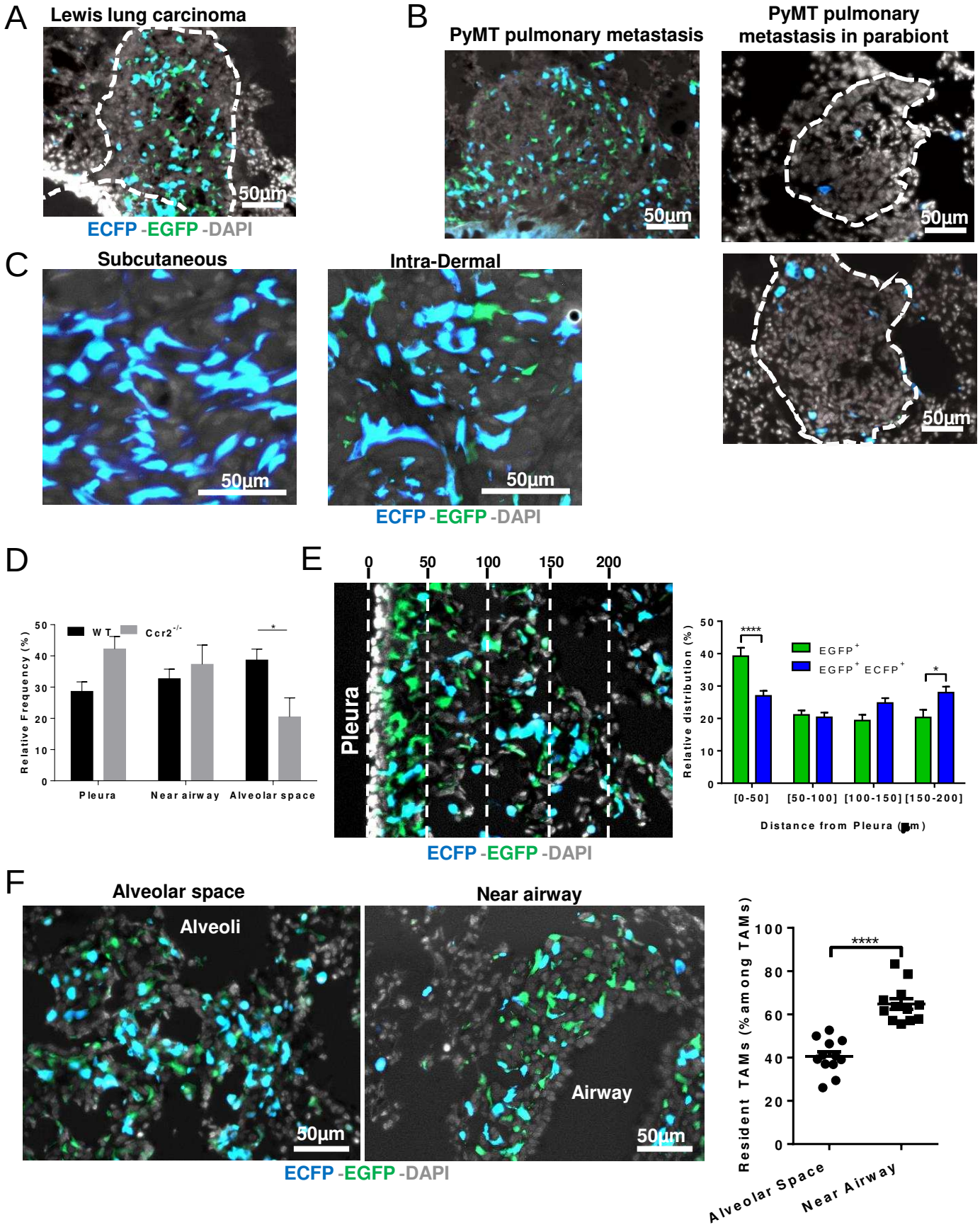


Figure 2: MacBlue x Cx3cr1$^{gfp/+}$ reporters discriminate TAM of different origins



Supplementary figure 3: Resident and recruited TAMs harbor different anatomical distribution

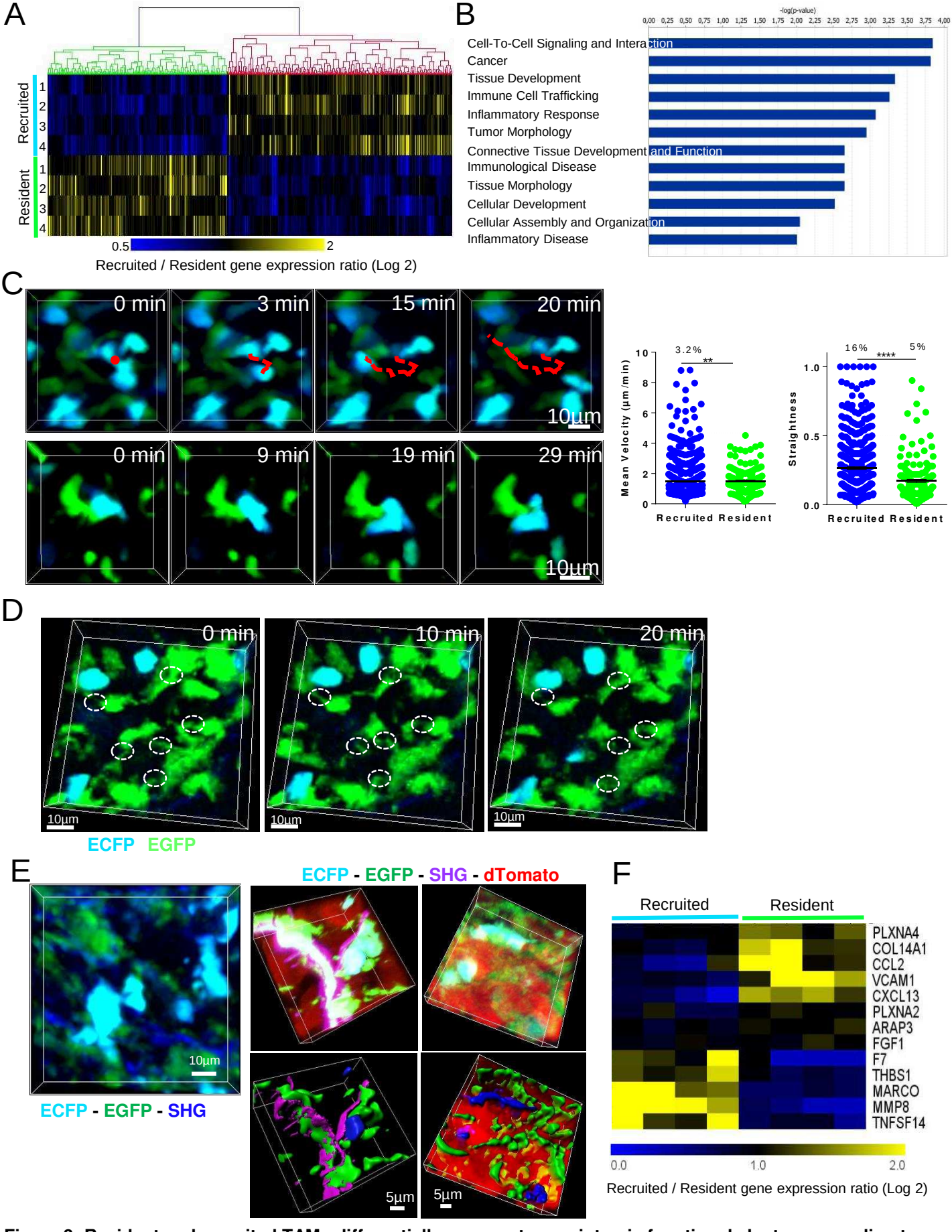
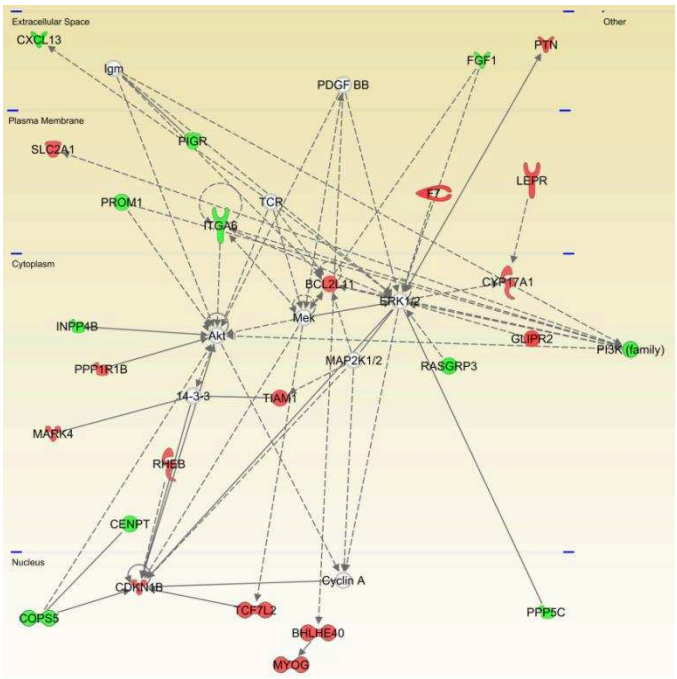
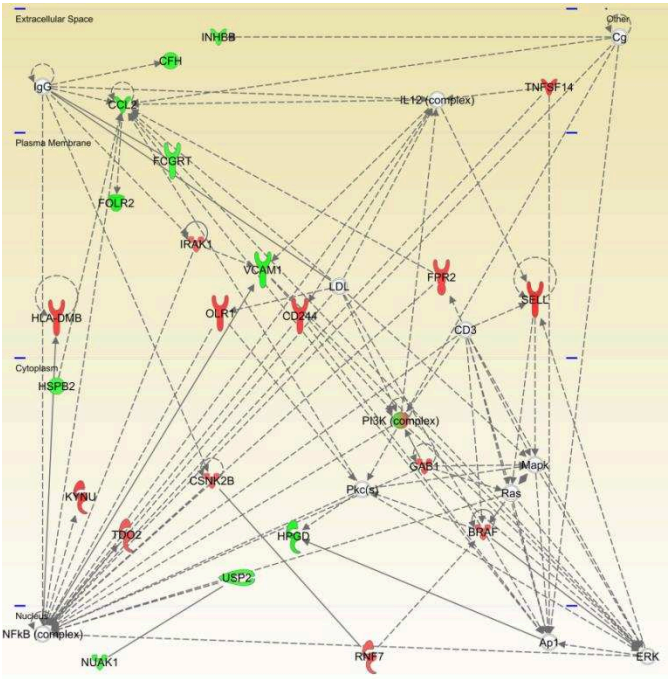


Figure 3: Resident and recruited TAMs differentially express transcriptomic functional clusters according to their dynamic and distribution patterns

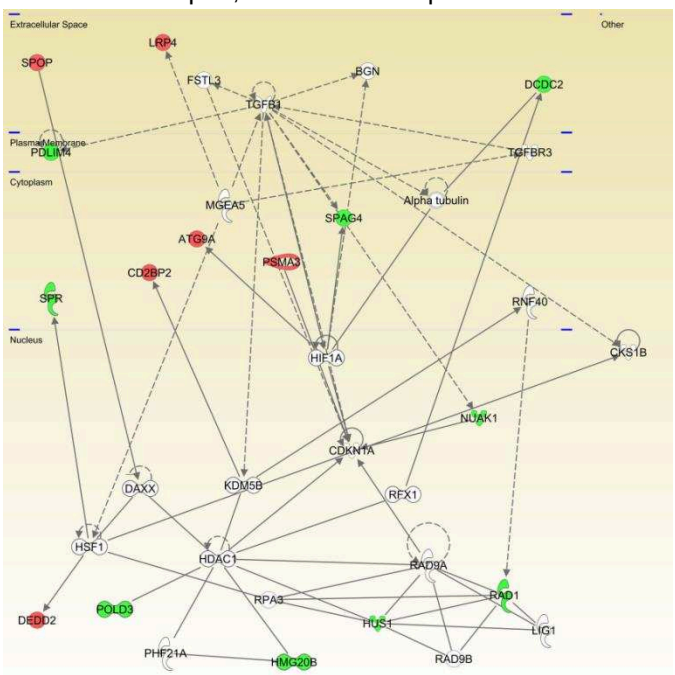
1. Cell Morphology, Cancer, Organismal Injury and Abnormalities



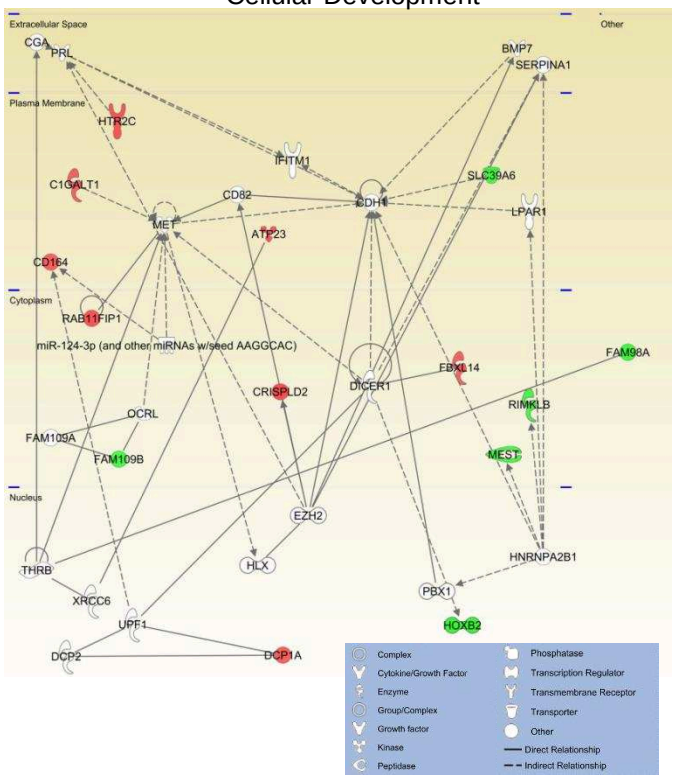
2. Cell to Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function, Immune Cell Trafficking



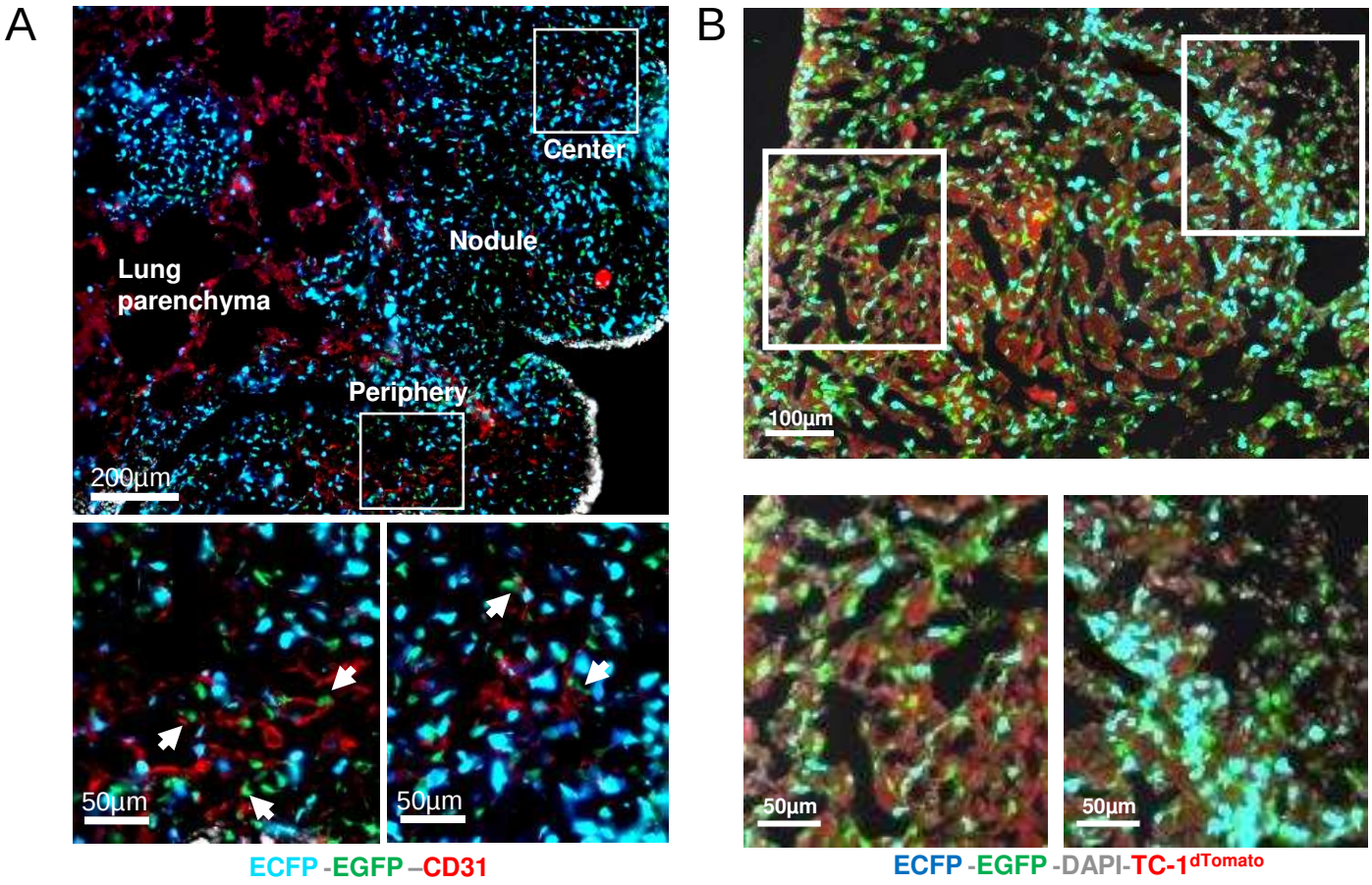
3. Cell Cycle, DNA Replication, Recombination, and Repair, Cellular Development



4. Cellular Movement, Cell Morphology, Cellular Development



Sup Figure 4: Top 4 differentially regulated functional networks in resident and recruited TAMs



Supplementary figure 5: Anatomic distribution and function relations between resident and recruited TAMs

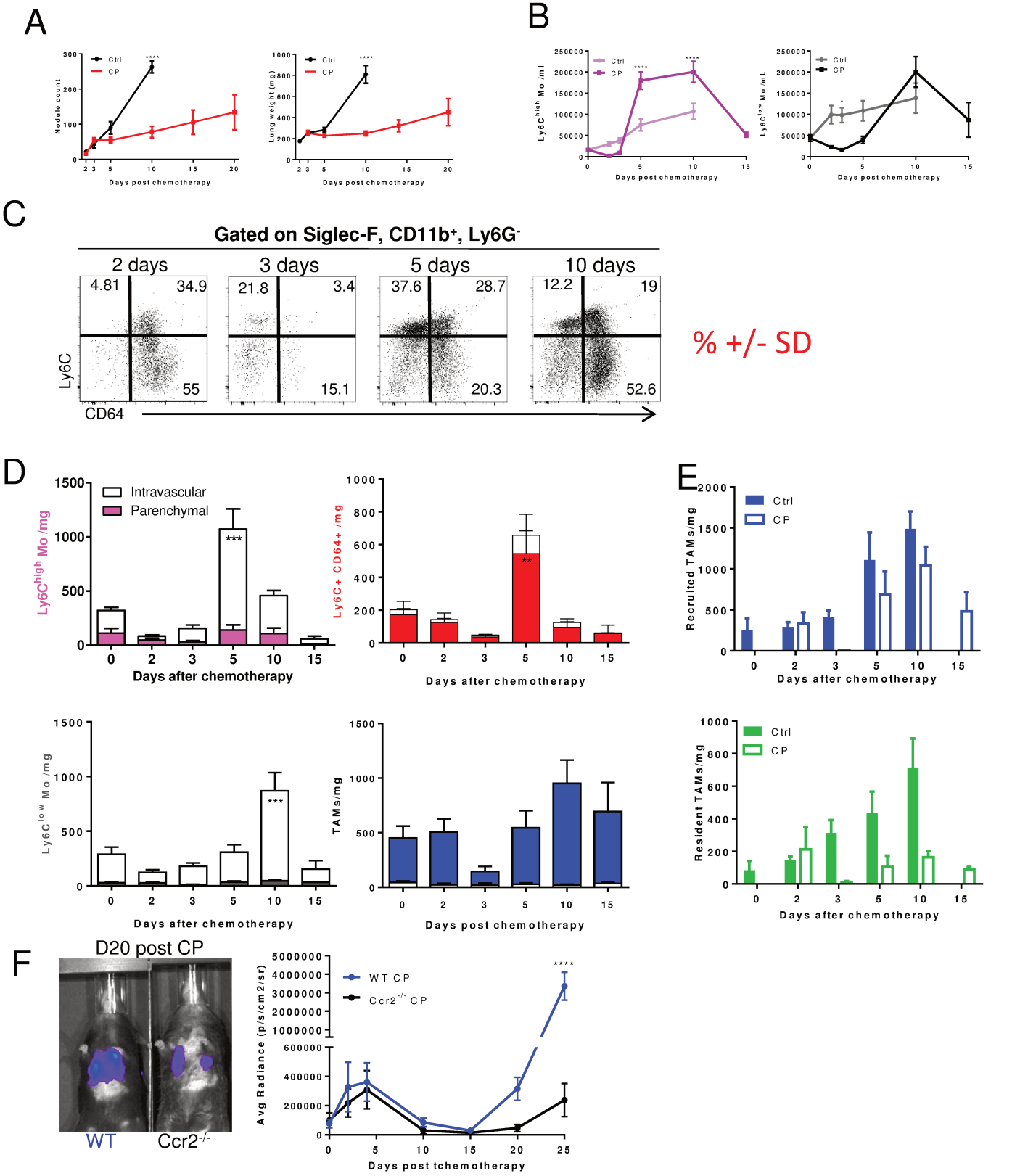


Figure 4: Distinct sensitivity and recovery of monocyte derived and resident TAMs

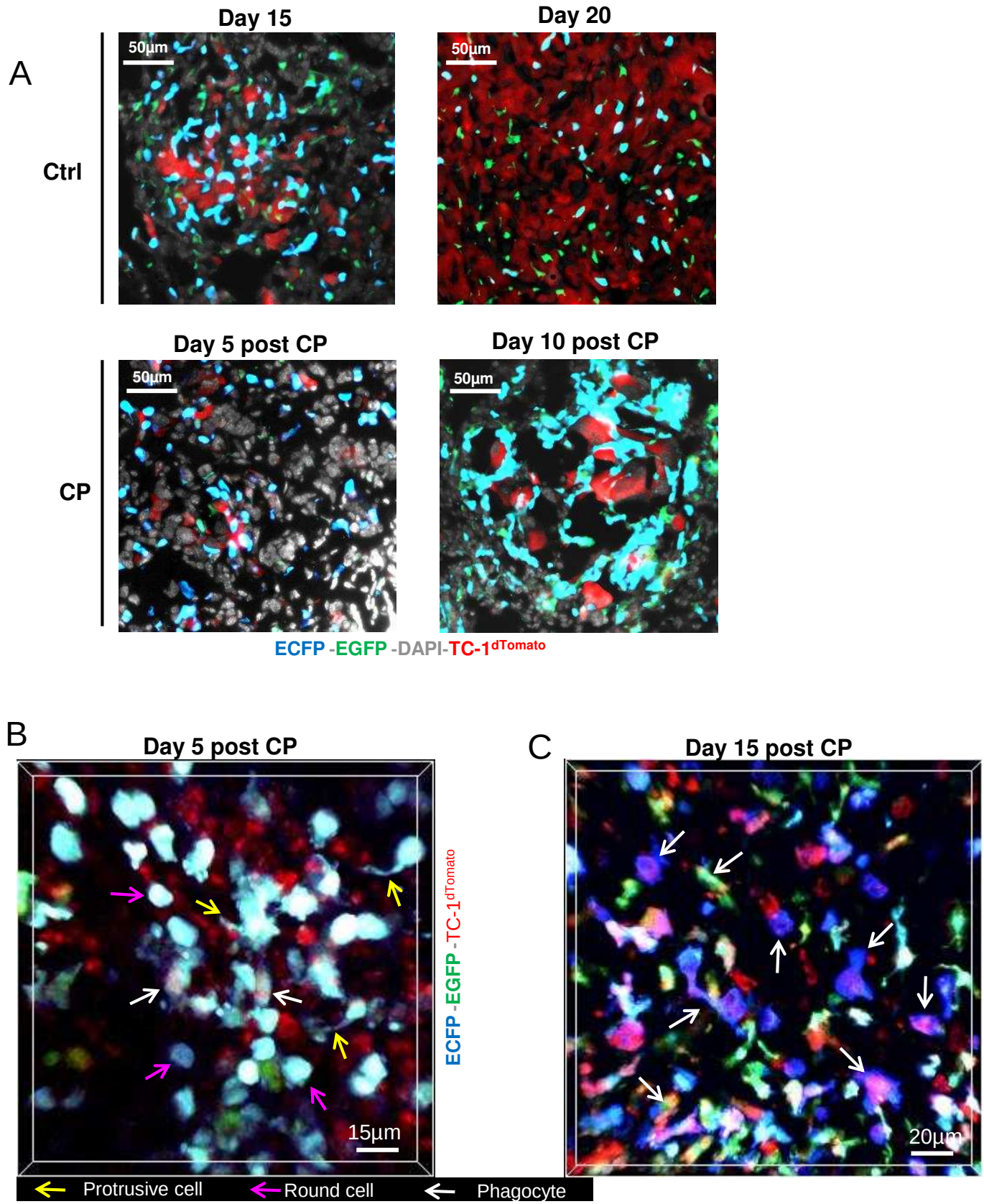
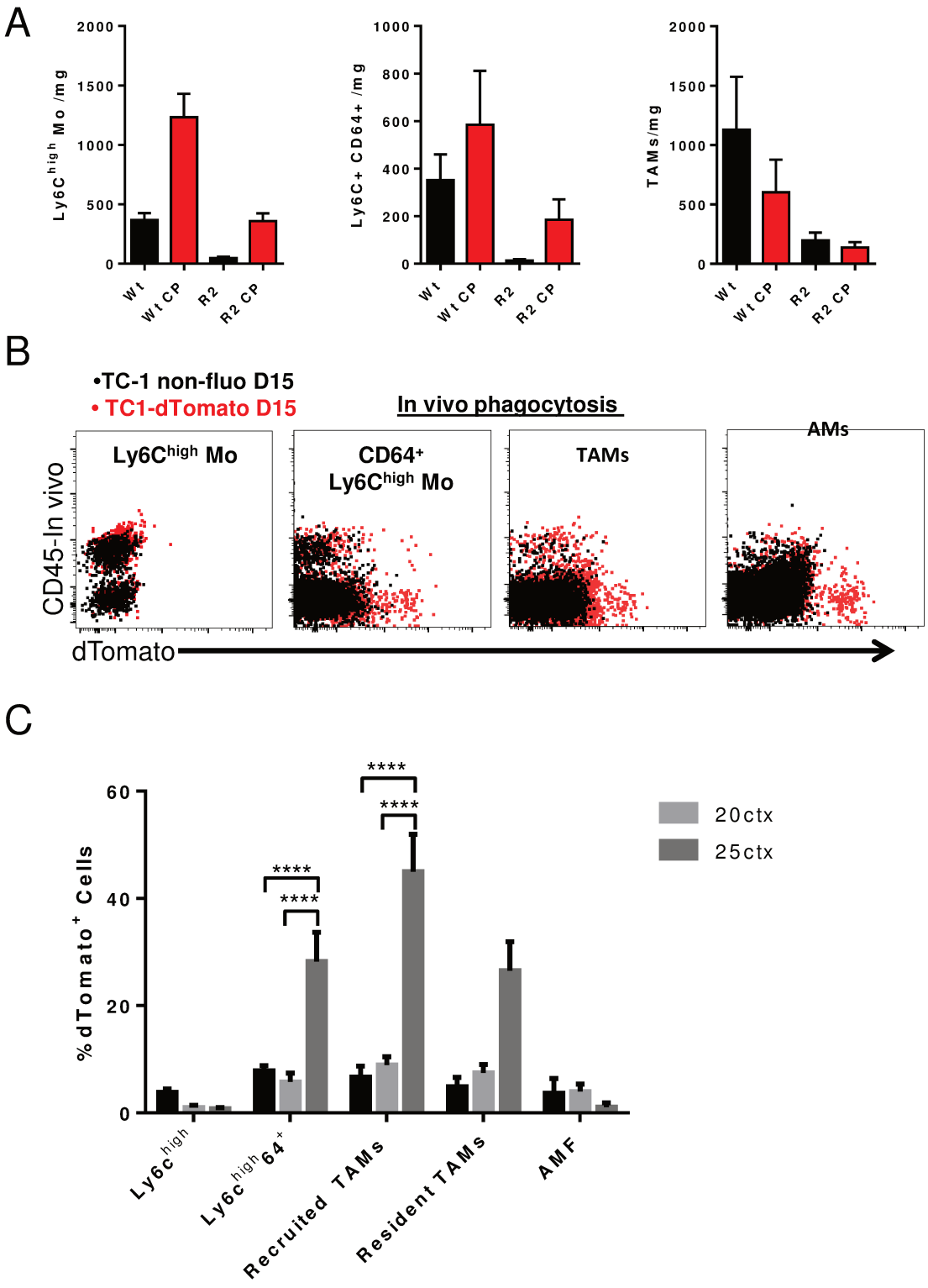


Figure 5: Recruited TAM clear apotptotic tumor cells and lead to tumor relapse



Sup Figure 6 : Apoptotic tumor cells are cleared by recruited TAM

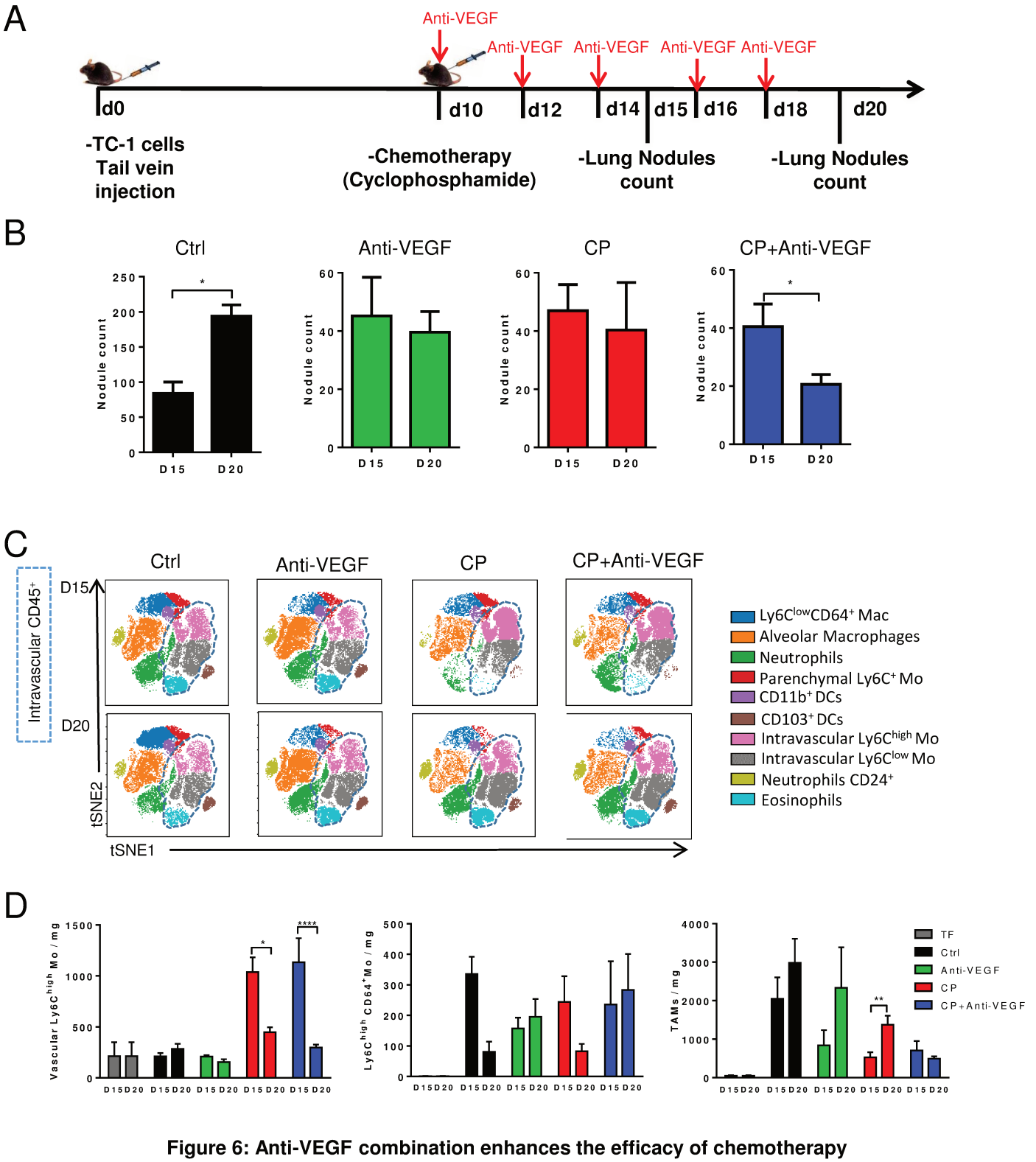
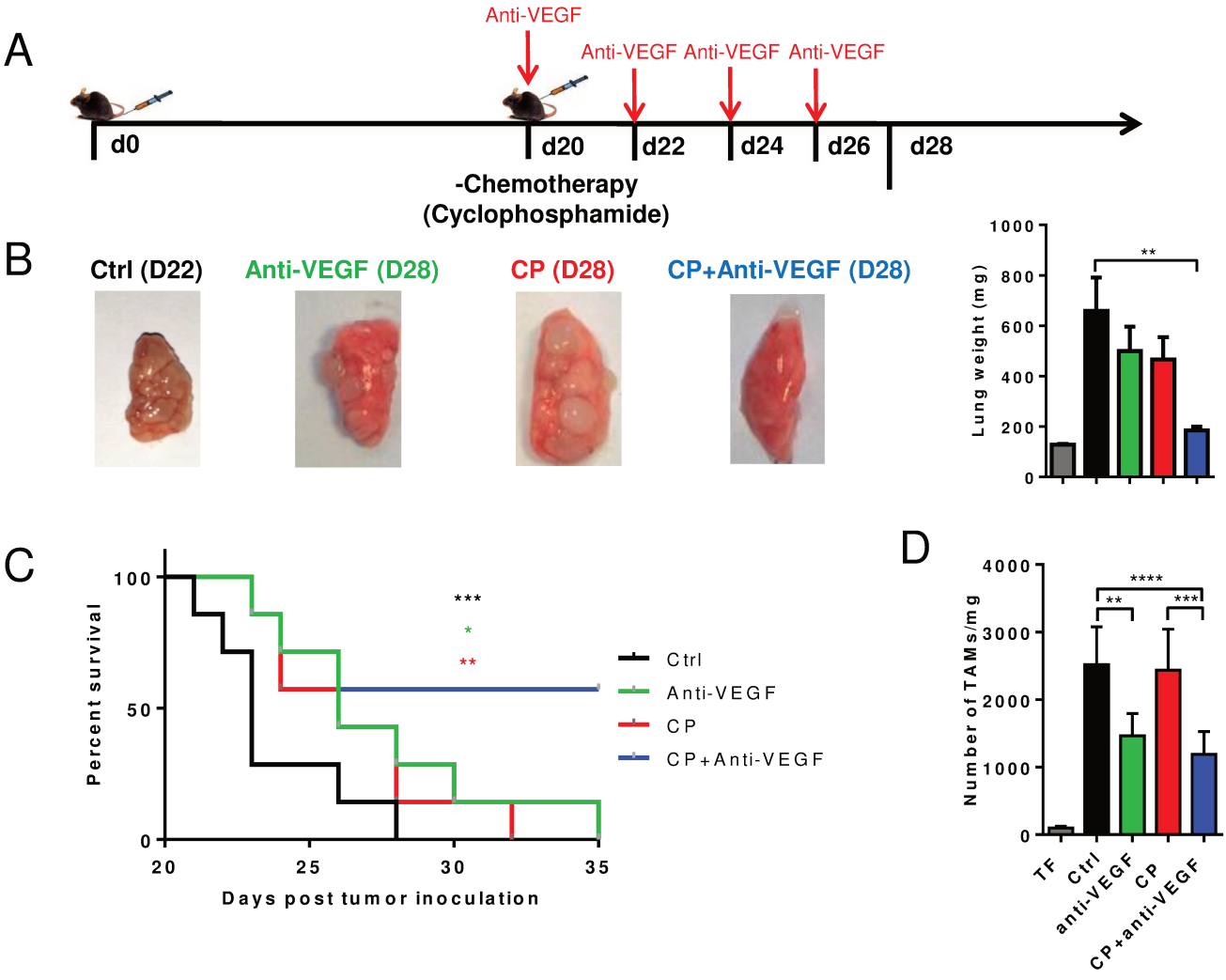


Figure 6: Anti-VEGF combination enhances the efficacy of chemotherapy



Supplementary Figure 7: Anti-VEGF combination enhances the efficacy of chemotherapy in advanced pulmonary metastasis development

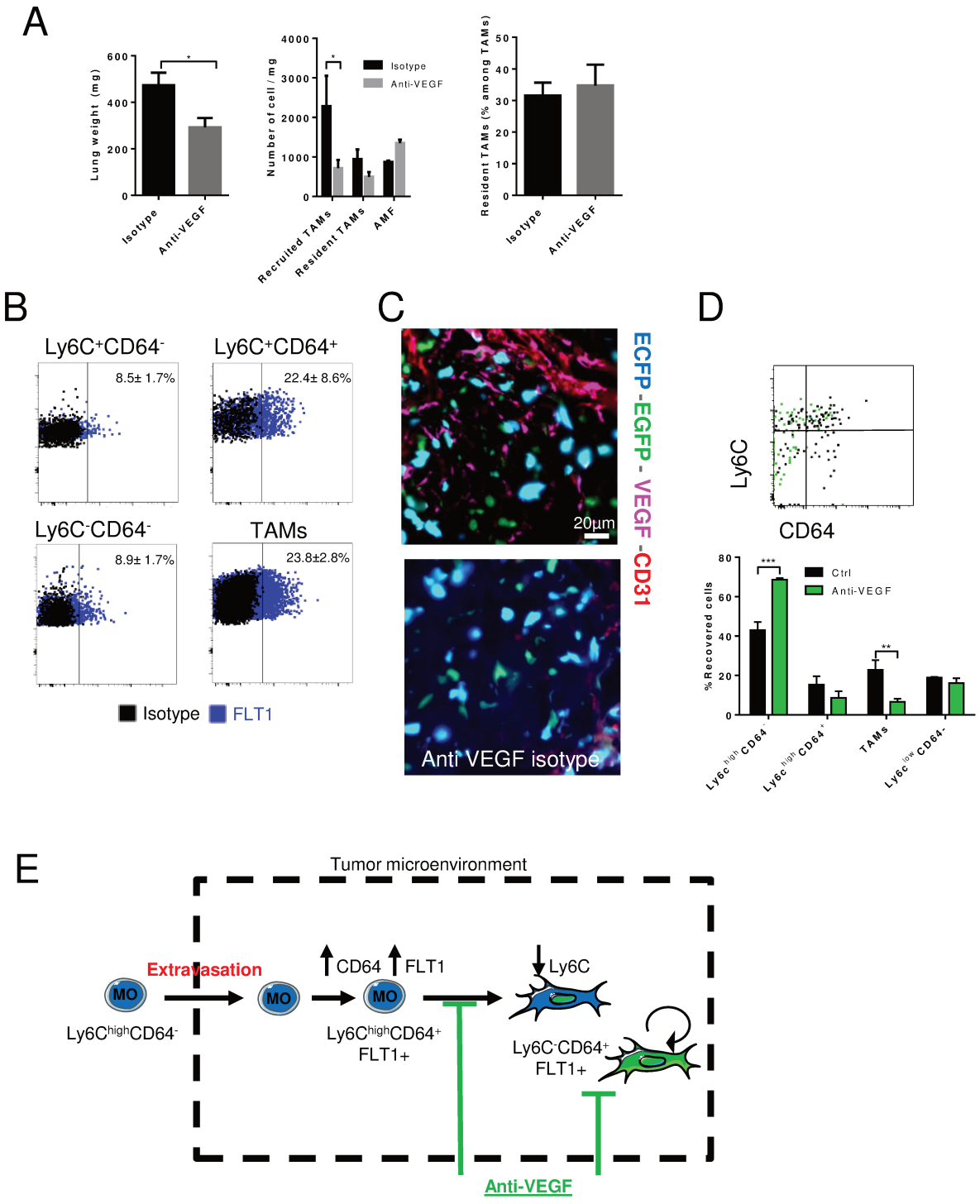


Figure 7: Anti-VEGF reduces TAM survival

Article 3: « CCR2 Influences T Regulatory Cell Migration to Tumors and Serves as a Biomarker of Cyclophosphamide Sensitivity »

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

Cancer research 2016

Contexte de l'étude

Les Treg ont un rôle bien établi dans l'induction de la tolérance tumorale et représentent un obstacle à l'efficacité des immunothérapies. La suppression des réponses antitumorales par les Treg peut avoir lieu via des contacts cellulaires ou via la sécrétion de facteurs solubles, à la fois dans les dLN et dans la tumeur. Les Treg peuvent être divisés en sous-types présentant des propriétés migratrices différentes. La distribution des Treg dans les différents compartiments de l'organisme conditionne leurs fonctions in vivo. Après la rencontre de l'antigène et l'activation, les Treg induisent une baisse de l'expression de CCR7 et CD62L pour sortir des organes lymphoïdes et l'augmentation de l'expression de récepteurs de chimiokines de type effecteurs pour migrer vers les organes non-lymphoïdes ou enflammés. A ce jour, peu de récepteurs de chimiokines ont été associés à la migration des Treg vers le site tumoral. Une meilleure compréhension des mécanismes de recrutement des Treg vers les tumeurs est nécessaire.

Néanmoins, un rôle de l'expression préférentielle du récepteur de chimiokines CCR4 (qui peut se lier aux chimiokines CCL22, CCL17 et CCL2) pour la migration des Treg vers la tumeur a été décrit dans les cancers du sein (Gobert et al., 2009), ovariens (Curiel et al., 2004) ou dans les mélanomes (Klarquist et al., 2016).

La chimiokine CCL2 est considérée comme pro-inflammatoire en raison, notamment, de sa capacité à recruter des monocytes inflammatoires, mais des fonctions contradictoires ont été décrites. Le blocage du CCR2 dans la phase de progression d'un modèle d'arthrite aggrave la pathologie. Ce phénomène a été attribué à l'expression du CCR2 par une population de Treg

suppressive (Bruhl et al., 2004). Similairement, l'augmentation de l'efficacité d'un vaccin thérapeutique anticancéreux après le blocage du CCR2 (grâce à un anticorps anti-CCR2) est associée à une réduction de la proportion de Treg infiltrants la tumeur (Fridlender et al., 2010). L'expression des récepteurs CCR2, CCR4, CCR5 et des sélectines P et E est impliquée dans la migration des Treg vers un tissu greffé (Zhang et al., 2009). Dans l'ensemble, ces études suggèrent un rôle du CCR2 dans la migration de Treg activés vers un site inflammatoire.

Nous avons fait l'hypothèse que le CCR2 pourrait jouer un rôle important dans la migration des Treg en contexte tumoral. Dans la présente étude, nous avons étudié le rôle de CCR2 sur la compartimentation et la dynamique des Treg dans des modèles de tumeurs transplantées et spontanées ainsi que dans les cancers humains des voies aérodigestives supérieurs (VADS).

Principaux résultats

1-Le CCR2 contrôle la migration des Treg vers la tumeur

Les tumeurs transplantées MCA-OVA (exprimant l'ovalbumine) produisent du CCL2 in vivo et in vitro. Dans les souris $Ccr2^{-/-}$ un retard de croissance des tumeurs MCA-OVA est associé à une réduction du nombre et du pourcentage (parmi les lymphocytes T $CD4^+$) de Treg, ce qui suggère que les Treg pourraient utiliser l'axe CCR2/CCL2 pour migrer vers les tumeurs. Nous avons confirmé que ce rôle de CCR2 est intrinsèque aux Treg grâce à des expériences de parabioses (Figure 1). Les résultats indiquent que le récepteur est nécessaire pour la migration dans la tumeur d'environ 50% des Treg, ce qui correspond au pourcentage de Treg exprimant le récepteur dans la tumeur. Nous avons pu observer une augmentation séquentielle de l'expression du CCR2 par les Treg dans le dLN, puis dans le sang. En comparaison, les lymphocytes T $CD4^+$ conventionnels n'expriment que faiblement le récepteur aux différents points de cinétique étudiés. L'expression préférentielle du CCR2 a été confirmée dans le modèle de tumeur mammaire spontanée PyMT-MMTV dans les différents compartiments. Dans ce modèle, ainsi que dans les cancers humains VADS, le développement tumoral est associé à une augmentation de la proportion de Treg $CCR2^+$ intra-tumorales et inversement à la diminution de Treg $CCR2^+$ (Figure 6-7). Ceci pourrait traduire un recrutement de Treg $CCR2^+$ du sang vers la tumeur.

2-Les Treg $CCR2^+$ ont un phénotype activé et immunosuppressif et sont préférentiellement deplétés après des faibles doses de cyclophosphamide

Comparés au Treg CCR2$^-$, les Treg CCR2$^+$ présente un phénotype activé (CD44$^+$, CD64L$^-$, Ly6C$^-$) et ont une plus forte capacité à produire la cytokine immunosuppressive l'IL-10. Les Treg CCR2$^+$ ont également de plus forte capacité de prolifération et sont enrichie dans la fraction spécifique pour l'antigène OVA (Figure 3).

Les faibles doses de cyclophosphamide ont été décrites comme déplétants préférentiellement les Treg comparés aux T conventionnelles (Le and Jaffee, 2012). Ce traitement permet ainsi d'améliorer l'efficacité des immunothérapies anticancéreuses, mais les mécanismes précis sont peu étudiés in vivo. Nous avons voulue tester l'impact de ce traitement sur les différents sous-types de Treg$^-$. Les faibles doses de cyclophosphamide induisent en effet une déplétion préférentielle des Treg puisque le pourcentage de Treg parmi les lymphocytes CD4$^+$ totaux était diminué 3 jours après traitement. Nous avons observé que les Treg CCR2$^+$ étaient quasiment totalement deplétés par ce traitement alors que l'effet était plus limité sur les Treg CCR2$^-$. Cette déplétion est associée à une réduction des cellules en cycle, suggérant que la sensibilité accrue des Treg CCR2$^+$ est du à leur forte prolifération (Figure 4). Cette déplétion de Treg CCR2$^+$, bien que transitoire, est suffisante lever l'immunosuppression dans les dLN est augmenter les capacités effectrices antitumorales de lymphocytes CD8$^+$ transférées (Figure 5).

Discussions et perspectives

Ces travaux indiquent que le récepteur CCR2 contrôle la distribution des Treg en contexte tumoral. L'expression de CCR2 par les Treg dans les différents compartiments suggère que ce récepteur est impliqué dans leur migration des dLN vers la tumeur, mais des phénomènes de recirculation de la tumeur vers les dLN ne sont pas exclus. L'augmentation de l'expression du CCR2 par les Treg après leur activation et rencontre avec l'antigène tumorale dans les dLN pourrait leur permettre de migrer vers le site tumoral. La forte production de CCL2 par les tumeurs solides pourrait, en recrutant des Treg activées, contribuer à l'immunosuppression du TME et ainsi à la tolérance des tumeurs. L'axe CCR2/CCL2 est impliqué dans le recrutement de monocytes qui se différencient en TAM, mais nous dévoilons une fonction additionnelle de cet axe qui pourrait aggraver le développement des cancers. D'autre part, l'expression du CCR2 par les Treg leur permettrait de rapidement être recrutés sur un site inflammatoire pour maintenir la tolérance. Ces connaissances permettront de mieux caractériser les pathologies impliquant l'axe CCR2/CCL2.

La déplétion préférentielle des Treg CCR2$^+$ par des faibles doses de cyclophosphamide est associée à une réduction de l'immunosuppression ce qui génèrent une fenêtre thérapeutique. Il

serait intéressant de tester cet effet chez des patients recevant ce même traitement. L'expression du CCR2 par les Treg pourrait ainsi servir de biomarqueur de l'efficacité des thérapies anticancéreuse.

Cancer Research

CCR2 Influences T Regulatory Cell Migration to Tumors and Serves as a Biomarker of Cyclophosphamide Sensitivity

Pierre-Louis Loyher[1], Juliette Rochefort[1], Camille Baudesson de Chanville[1], Pauline Hamon[1], Géraldine Lescaille[1], Chloé Bertolus[1,2], Maude Guillot-Delost[1], Matthew F. Krummel[3], François M. Lemoine[1], Christophe Combadière[1], and Alexandre Boissonnas[1]

Abstract

The CCL2 chemokine receptor CCR2 drives cancer by mediating the recruitment of monocytes and myeloid-derived suppressor cells to the tumor microenvironment. In this study, we extend the significance of CCR2 in this setting by identifying a new role for it in mediating recruitment of $CD4^+$ T regulatory cells (Treg). Following tumor initiation, an expanded population of $CCR2^+$ Tregs required CCR2 expression to traffic between draining lymph nodes (dLN) and the tumor. This Treg subset was enriched in the fraction of tumor antigen–specific cells in the dLN, where they displayed an activated immunosuppressive phenotype. Notably, in mouse models, low-dose cyclophosphamide treatment preferentially depleted $CCR2^+$ Treg, enhancing priming of tumor-specific $CD8^+$ T cells. In the MMTV-PyMT transgenic mouse model of breast cancer and in oral squamous cell carcinoma patients, tumor development was associated with decreased blood frequency and inversely increased tumor frequency of $CCR2^+$ Tregs. Our results define a novel subset of $CCR2^+$ Treg involved in tumoral immune escape, and they offer evidence that this Treg subset may be preferentially eradicated by low-dose cyclophosphamide treatment. *Cancer Res; 76(22); 6483–94. ©2016 AACR.*

Introduction

Chemokine–chemokine receptor interactions play major roles in the shaping of the tumor microenvironment (TME). These interactions can induce the differential recruitment of immune cells and by this mean turn the TME into an immunosuppressive site (1, 2). CCR2, a chemokine receptor highly expressed by inflammatory monocytes, is crucial for the recruitment of the latter from the bone marrow to inflamed tissues (3) but also displays chemotactic properties for T cells (4, 5). Secretion of the major CCR2 ligand (CCL2) by both the tumor and tumor stromal cells is common in many tumor types in both human and mouse models (6, 7). For these reasons, the CCR2–CCL2 axis is an important mechanistic marker of tumor development (8) and can also predict clinical benefit after cancer therapy (6). Beyond tumor-associated myeloid cells, regulatory T cells (Treg) have a well-established role in promoting tumor tolerance and represent an obstacle to efficient T cell–based antitumor immunotherapy (9–11). Suppression of antitumor effector functions of both $CD4^+$ Th cells and cytotoxic $CD8^+$ T cells by Tregs can occur through various cell-to-cell or soluble mechanisms (12) both in draining lymph nodes (dLN; ref. 13) or in the tumor itself (9). A better understanding of the mechanisms involved in Treg trafficking and accumulation within the TME is thus needed.

Tregs display different homing properties, and their appropriate compartmentalization is crucial for their *in vivo* activity (14, 15). Following thymus emigration, Tregs can enter secondary lymphoid organs in a CCR7- and CD62L-dependent fashion. This lineage can be maintained throughout time by further recruitment or by continuous self-renewal (16). Activation and antigen priming in secondary lymphoid organs promote downregulation of CCR7 and CD62L, whereas other memory/effector type trafficking receptors may be upregulated to allow Tregs to migrate into nonlymphoid or inflamed tissues (14, 17–19). To date, few chemokine receptors have been associated with the tumor homing properties of Tregs, although a role for CCL22 in the recruitment of $CCR4^+$ Tregs into human ovarian and/or breast cancer has been described (20–22).

CCL2 is described as a proinflammatory cytokine, but contradictory functions have been observed in the absence of CCR2 in noninfectious inflammatory models (23, 24). A dual role for CCR2 was described in a model of arthritis because a subset of highly suppressive Treg, expressing CCR2, expanded during the course of the disease (24). The chemokine receptors CCR2, CCR4, and CCR5 and P- and E-selectins were all necessary to ensure efficient homing of Tregs to a graft tissue (25). Finally, in a model of delayed-type hypersensitivity reaction, antigen-specific Tregs required CCR2 to migrate toward the antigen site (26). Altogether,

[1]Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06 UMR_S1135, Institut Universitaire de Cancérologie (IUC), Inserm U1135, CNRS ERL8255, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses, Paris, France. [2]Department of Maxillofacial Surgery, AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France. [3]Department of Pathology, University of California San Francisco, San Francisco, California.

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (http://cancerres.aacrjournals.org/).

Corresponding Author: Alexandre Boissonnas, Sorbonne Universités, UPMC Université, 91 Boulevard de l'hôpital, Paris 75013, France. Phone: 33-1-4077-9897; Fax: 33-1-4077-9734; E-mail: alexandre.boissonnas@upmc.fr

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0984

©2016 American Association for Cancer Research.

these findings support a role for CCR2 in the homing of activated Tregs to an inflamed site.

We therefore hypothesized that CCR2 expression on Tregs might play a central role in tumor context. Herein, we studied the role of CCR2 on the compartmentalization and the dynamic of Tregs in different tumor models, as well as human oral squamous cell carcinoma (OSCC). We showed that $CCR2^+$ Tregs represent a discrete subset that is highly important for suppressing antitumor responses. Finally, we observed a selective depletion of this subset by low-dose cyclophosphamide, which provides new interpretation in the Treg-mediated effect of cyclophosphamide treatment.

Materials and Methods

Ethical statement

All experiment protocols were approved by the French animal experimentation and ethics committee and validated by "Service Protection et Santé Animales, Environnement" with the number A-75-2065 for tumor experiments and A-75-1315 for parabiosis experiments. Human samples were obtained after informed written consent according to local ethics committee authorization.

Human tissue and blood samples

Blood ($n = 30$) and tumors ($n = 14$) samples from patients with primary OSCCs (three at stage I, four at stage II, one at stage III, and 26 at stage IV) were obtained during surgical resection (Department of Maxillofacial Surgery, Pitié-Salpêtrière Hospital; Paris, France). Gingival tissues ($n = 10$) were collected from healthy subjects undergoing preventive wisdom tooth extraction (Odontology Department, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France). Control blood samples ($n = 42$) were obtained from volunteer healthy donors (Etablissement Francais du Sang, Paris, France). The male-to-female ratio was 1.7:1 for OSCC blood patients (mean age, 60.8 ± 10 years); 1.9:1 (mean age, 51.6 ± 18.1 years) for control blood and 2.5:1 for tumors patients (mean age, 62.5 ± 8.9 years); 1.5:1 for gingival tissues (mean age, 40.2 ± 18 years).

Mice

C57BL/6 mice (10–14 weeks) were obtained from JANVIER LABS. C57BL/6 $Rag2^{-/-}$ TCR (Vα2, Vβ5) transgenic mice (OT1) were crossed to CD45.1 C57BL/6 (Animalerie centrale, Institut Curie, Paris, France) to obtain OTI CD45.1 mice. Foxp3-EGFP transgenic mice, $Ccr2^{-/-}$, $Ccr1^{-/-}$, $Ccr5^{-/-}$, $D6^{-/-}$, and Foxp3-EGFP X $Ccr2^{-/-}$ mice were bred in the animal facility (Centre d'Exploration Fonctionelle, Pitié-Salpétrière, Paris, France). MMTV PyMT-P2A-mCherry-P2A-OVA (PyMT-ChOVA) mice (27) were crossed with $Ccr2^{-/-}$ mice. $Ccr2^{rfp/+}$ mice were kindly provided by Israel Charo (Gladstone Institute, San Francisco, CA; ref. 28).

Parabiosis

C57BL6 female host parabionts were generated with Foxp3-EGFP X $Ccr2^{-/-}$ females, injected with MCA-OVA tumor cells 15 days after surgery to allow establishments of blood chimerism, and analyzed 10 days later. The Treg chimerism was evaluated by determining the percentage of EGFP-expressing $Ccr2^{-/-}$ Tregs out of total Tregs intracellularly stained with Foxp3 antibody.

Cells

The MCA-OVA cell line (kindly provided by Dr. C. Théry, Institut Curie, Paris, France, in 2010) is the MCA-101 cell line, stably transfected with a plasmid encoding for soluble ovalbumin (OVA; ref. 29). After resuscitation, MCA-OVA cell line was cultured in Dulbecco's medium with antibiotics and 10% FCS for a maximum of 4 months. Stability of the cell line is evaluated according to consistent tumor growth throughout the different studies (29–31). $CD8^+$ OT1 T cells (specific for $OVA_{257\text{-}264}$ peptide in a H2-K^b context) were obtained from lymph nodes of OT1 $Rag2^{-/-}$ mice (herein called OT1 T cells, with purity between 94% and 98%).

Tumor engraftment and mice antitumor treatment

Protocols from refs. 30 and 31 were strictly reproduced. Briefly, MCA-OVA cells (2×10^5) were injected subcutaneously in the flank of mice. Tumor size was measured twice a week using a caliper, $V = L \times l \times (L + l)/2$. Low-dose chemotherapy was performed 7 days after tumor inoculation by a single intraperitoneal injection of cyclophosphamide (Sigma-Aldrich) diluted in PBS at 100 mg/kg. Adoptive T-cell transfer was performed on day 10 after tumor inoculation by intravenous injection of 5×10^6 freshly harvested OTI T cells.

ELISA

Plasma, tumor, and lymph node tissues were harvested on indicated days, stored in PBS at −80°C, thawed, and centrifuged to obtain tissue homogenates. Murine CCL2 ELISA was performed using Quantikine ELISA Mouse Immunoassay Kits (Bio-Techne) following the manufacturer's protocol.

Flow cytometry

Phenotypic characterization was performed using either a FACSCanto II or FACS LSRFortessa (Becton Dickinson) for murine cells and LSRII flow cytometer (Becton Dickinson) for human cells. For analysis, FlowJo software (Tree Star Inc.) was used. MCA-OVA tumors, MMTV-PyMT primary mammary tumors (3–4 days after detection by palpation), and dLN (axillary) were entirely mashed in PBS with 0.5% BSA/2 mmol/L EDTA (FACS buffer) and filtered using 70-μm cell strainer (BD Biosciences). Blood was drawn and lysed in RBC lysis buffer containing 0.15 mol/L NH_4Cl, 0.01 mmol/L $KHCO_3$, and 0.1 mmol/L EDTA. Surface staining was performed by incubating 50 μL of cell suspension (one tenth of the total) with 1 μg/mL purified anti-CD16/32 (2.4G2; BD Biosciences) for 10 minutes at 4°C and for an additional 20 minutes with appropriate dilution of specific surface antibodies. Dead cells were excluded using LIVE/DEAD Fixable Stain (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Forward- and side scatter parameters were used for doublets exclusion. After incubation, cell suspensions were washed once in FACS buffer. For $CD4^+$ tumor antigen–specific T-cell analysis, cells were stained with the T-select MHC Class II mouse tetramer I-A^b $OVA_{323\text{-}339}$ Tetramer-PE (MBL International Corporation) prior to surface staining according to the manufacturers' instructions. CCL2-binding assay was achieved as described previously (32). Briefly, after surface staining, cells were incubated in the dark for 45 minutes at 37°C in RPMI medium with GlutaMAX containing 25 nmol/L murine $CCL2^{AF647}$(Almac Sciences). Cells were then washed in FACS buffer. In some experiments, cells were preincubated with 10 μmol/L recombinant

human rhCCL2 chemokine (Peprotech) at 37°C for 45 minutes. For DNA content analysis, cells were incubated with 16 μmol/L Hoechst in a final volume of 500 μL of FACS buffer with shaking at 37°C for 45 minutes prior to surface staining and washed with 3 mL of FACS buffer. For intracellular OTI IFNγ staining, cell suspensions were restimulated *ex vivo* with 1 μmol/L $OVA_{257–264}$ for 3 hours at 37°C in the presence of 5 μg/mL Brefeldin A. For IL10 staining, cells were preincubated for 6 hours with cell activation cocktail with Brefeldin A according to the manufacturers' instructions (BioLegend). After surface staining, cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 20 minutes, washed twice in Perm/Wash solution (BD Biosciences), incubated 10 minutes with 1 μg/mL purified anti-CD16/32 in Perm/Wash at room temperature, and incubated for 30 minutes in Perm/Wash in the presence of anti-IFNγ or anti-IL10. For intracellular staining, the Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set, anti-Foxp3, and anti-Ki67 (eBioscience) were used according to the manufacturers' instructions. Samples were washed in FACS buffer before acquisition. Calculation of absolute numbers of different cell populations was performed by adding in each vial a fixed number (10,000) of nonfluorescent 10-μm Polybead Carboxylate Microspheres (Polysciences) according to the formula: number of cells = (number of acquired cells × 10,000)/(number of acquired beads). The number of cells obtained for each sample was extrapolated to the whole organs.

Cell suspensions from human tumor and gingival samples were obtained after nonenzymatic digestion using Cell Recovery Solution (Corning) at 4°C for 1 hour. After filtering, washing, and counting, cells were stained with Fixable Viability Dye eFluor780 (eBioscience) at 2°C to 8°C for 30 minutes. Cells from tissues and whole blood were stained with directly labeled surface antibodies at 4°C during 20 minutes and permeabilized with Foxp3/TFs Staining Buffer Set (eBioscience) for intracellular staining, according to the manufacturer's instructions. After staining, whole blood was lysed to eliminate red blood cells.

In vivo proliferation assay

CD45.1 OTI T cells were incubated for 10 minutes at 37°C in PBS with 5 mmol/L carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE; Molecular Probes, Invitrogen). Cells (5×10^6) were injected in PBS into CD45.2 tumor-bearing or tumor-free mice. After 4 days, the frequency and number of OTI T cells that had performed more than three divisions (defined as highly divided) in dLN and tumor were measured while gating on $CD45.1^+CD8^+$ cells.

Additional information can be found in Supplementary Materials and Methods.

Results

CCR2 expression on Tregs is required for tumor infiltration

We first examined the impact of CCR2 invalidation on tumor growth and on the compartmentalization of Tregs in mice injected subcutaneously with the methylcholanthrene-induced, ovalbumin-expressing tumor cell line (MCA-OVA). We previously showed the importance of Treg in limiting antitumor $CD8^+$ T-cell responses in this model (30). In $Ccr2^{-/-}$ mice, tumor growth was slightly reduced by day 13 after tumor inoculation, as compared with wild-type (WT) mice. These differences in tumor size became significant on day 20 and were then sustained throughout the monitoring period (Fig. 1A). In keeping with a role of the CCR2/CCL2 axis in tumor development, the CCR2 chemokine CCL2 was detected in MCA-OVA cell line supernatants (Fig. 1B) and was found to increase in inoculated tumor from day 7 to day 19 (Fig. 1C). In WT mice, the percentage of tumor-infiltrating Tregs ($CD25^+Foxp3^+$) among $CD4^+$ cells increased between day 7 and day 13. In $Ccr2^{-/-}$ mice, the frequency of tumor-infiltrating Tregs was similar on day 7 compared with WT mice, but they failed to accumulate further (Fig. 1D and Supplementary Fig. S1A). The absolute count of Treg/mg of tumor increased between day 7 and day 10, stabilized between day 10 and day 13 in WT mice but diminished in proportion to tumor weight in $Ccr2^{-/-}$ mice (Supplementary Fig. S1B). On the other hand, the numbers of intratumor conventional $CD4^+CD25^-Foxp3^-$ Th cells were not significantly reduced by CCR2 deficiency (Supplementary Fig. S1C). In the dLN, the frequency of Tregs among $CD4^+$ cells was similar (Fig. 1D). Because the number of Tregs increased similarly with time in WT and $Ccr2^{-/-}$ mice, we excluded that the defect of tumor infiltration was due to a defect of Treg amplification in the dLN. A significantly higher accumulation of Tregs but not Th in the dLN of $Ccr2^{-/-}$ mice was even observed on day 13 (Supplementary Fig. S1D and S1E). Thus, we uncovered a role of the CCL2/CCR2 axis in the preferential tumor recruitment of Tregs compared with Th cells over time.

To confirm that the defect of Treg infiltration into the tumor in the absence of CCR2 was intrinsic to Tregs, we performed parabiosis experiment between WT and Foxp3-EGFP $Ccr2^{-/-}$ mice (Fig. 1E). The proportion of $EGFP^+Ccr2^{-/-}$ Tregs among total Tregs in the dLN and tumor was determined on day 10 after tumor injection in both parabiont hosts. In the dLN, the absence of CCR2 did not seem to affect Treg expansion and distribution. In contrast, $EGFP^+Ccr2^{-/-}$ Tregs that migrated to the tumor tissue represented only 19.8 ± 6.8% of total Tregs in WT host and 20.1 ± 7% of total Tregs in $Ccr2^{-/-}$ host (Fig. 1F and G). These results indicate that CCR2 expression by Tregs is required for their accumulation to the tumor site.

A transient increase in CCL2 protein level was detected in the dLN on day 7 and day 10 but resumed to basal value by day 13 (Supplementary Fig. S2A). Plasma CCL2 protein level was also slightly increased after MCA-OVA inoculation at all the time points analyzed (Supplementary Fig. S2B). We therefore speculated that the CCR2/CCL2 axis could also locally regulate Treg migration in the dLN. *In situ* analysis of Tregs dynamic by real-time imaging showed increased motility in tumor dLN compared with non-dLN (mean velocity of 7.3 ± 4.6 μm/minute vs. 2.9 ± 3 μm/minute, respectively; Supplementary Fig. S2C and S2D). Tregs displayed various migratory behaviors, ranging from highly motile to completely arrested. In WT mice, up to 36% of $EGFP^+$ Tregs were highly motile, never making significant arrest during their track (Supplementary Fig. S2E). In $Ccr2^{-/-}$ mice, the mean velocity of $EGFP^+$ Tregs in the dLN was slightly reduced compared with WT mice (6 ± 4.3 μm/minute; Supplementary Fig. S2D), and the proportion of highly motile Tregs dropped to 12% (Supplementary Fig. S2E).

We could not detect any significant differences in the absolute count of four different subsets of antigen-presenting cells between WT and $Ccr2^{-/-}$ mice that could affect Treg interactions or displacement and account for the defect of migration (Supplementary Fig. S2F and S2G).

These results indicated that CCR2 contributed to increasing the dynamic of Tregs within the dLN and might reflect Treg emigration from the dLN toward the tumor.

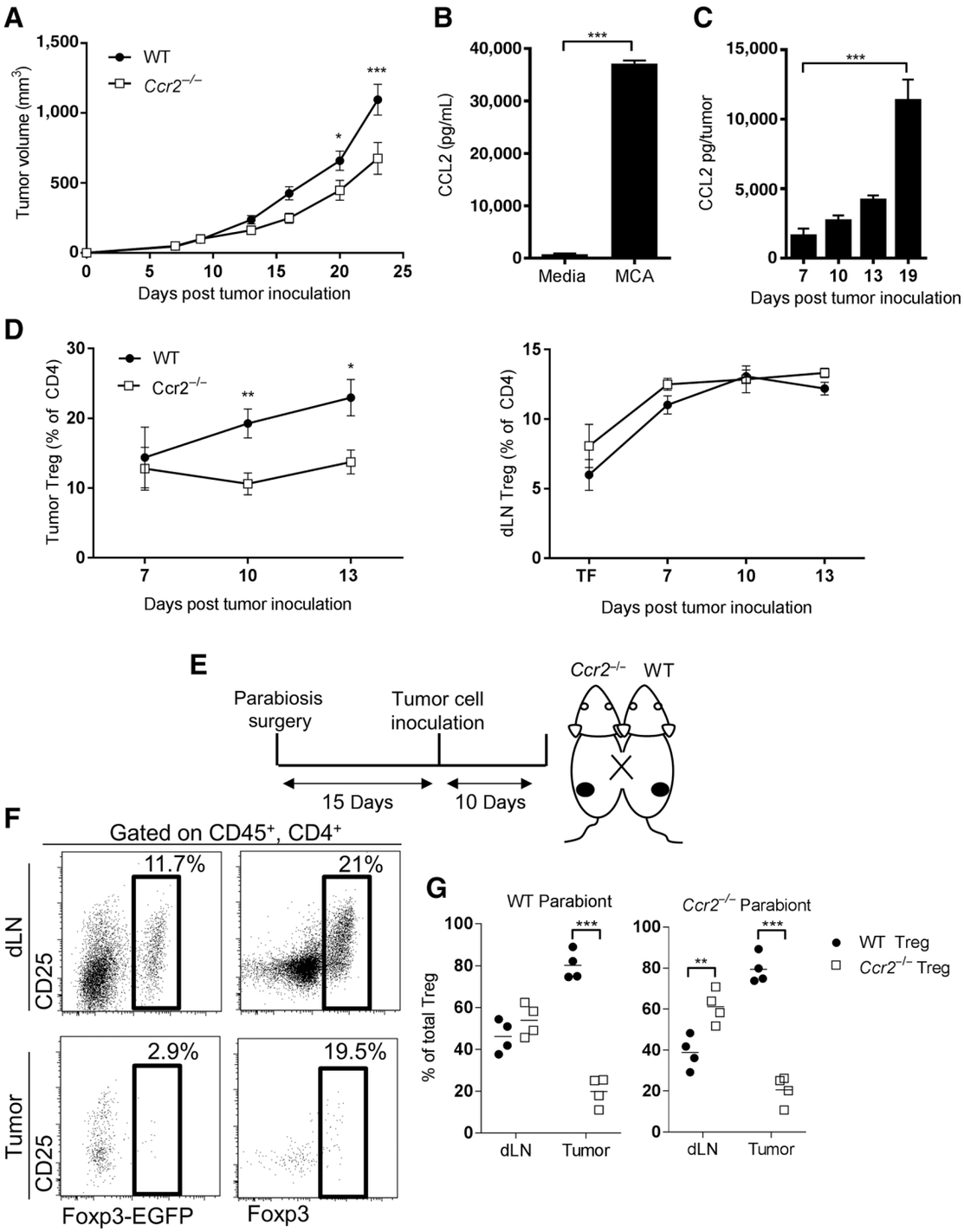


Figure 1.

CCR2 expression on Tregs is required for tumor infiltration. **A,** MCA-OVA tumor growth in WT mice (black circles) or *Ccr2*$^{-/-}$ (white squares). Graphs, mean ± SEM ($n = 20$ mice in each group, from three independent experiments). Two-way ANOVA with Bonferroni multiple comparison test was used. **B** and **C,** CCL2 protein level in supernatants of MCA-OVA cell cultures (**B**) and tumors (**C**; $n = 4$–6 mice of two experiments). ANOVA with Bonferroni multiple comparison test was performed. **D,** quantification of the percentage of Treg among CD4$^+$ cells in tumors (left) and dLN (right) of WT (black circles) and *Ccr2*$^{-/-}$ mice (white squares). Data represent mean ± SEM of at least 10 mice from three independent experiments. Two-way ANOVA with Bonferroni multiple comparison test was used. **E,** parabiosis experimental protocol. **F,** representative dot plot showing Treg chimerism in dLN and tumors of mouse parabionts. **G,** graphs represent the proportion of WT and *Ccr2*$^{-/-}$ Tregs in dLN and tumors in WT (left) and *Ccr2*$^{-/-}$ parabionts (right). Two-way ANOVA with Bonferroni multiple comparison test was used. (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$).

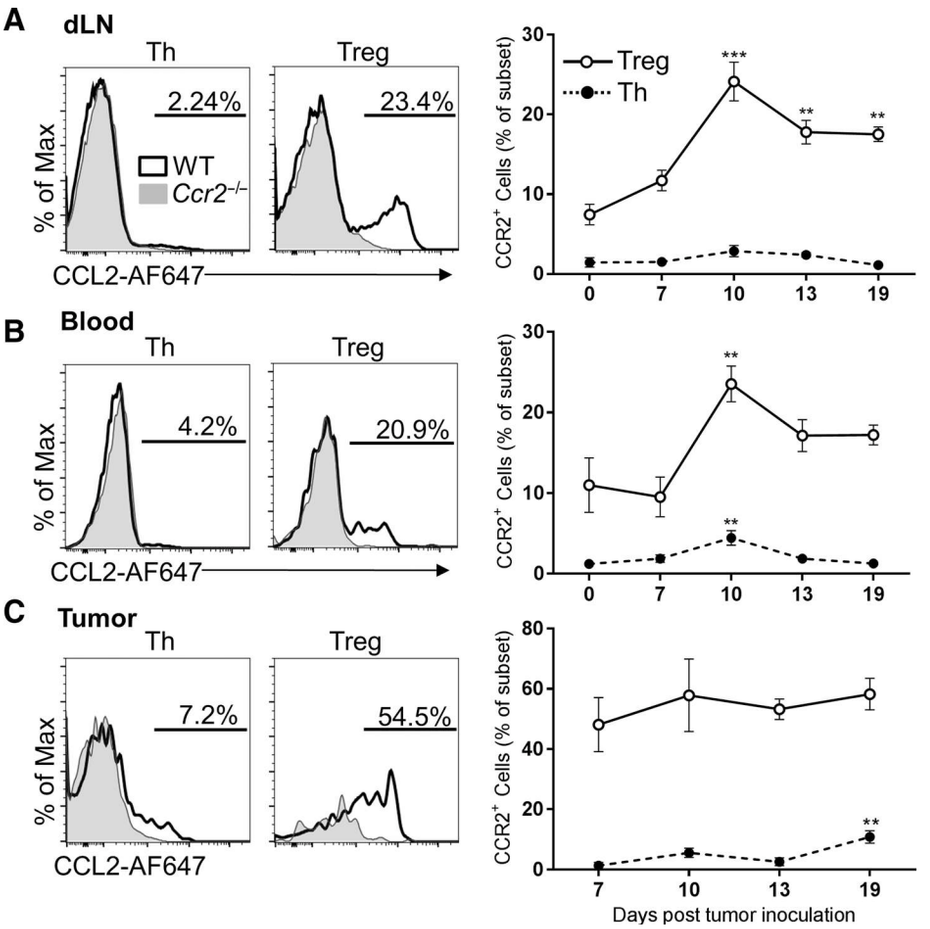


Figure 2.

$CCR2^+$ Tregs accumulate during tumor development. **A–C,** CCR2 expression by Th cells and Tregs was analyzed in dLN (**A**), blood (**B**), and tumors (**C**). Left, representative histogram plots showing CCL2-AF647 binding on Th and Tregs in WT (empty histograms) and $Ccr2^{-/-}$ mice (filled histograms). Graphs show mean ± SEM of the percentage of $CCR2^+$ cells (n = at least 9 mice in each group from three independent experiments). One-way ANOVA with Bonferroni multiple comparison test was used to compare means at each time points with tumor-free mice (day 0) or with day 7 in the tumor (**, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$).

$CCR2^+$ Tregs accumulate during tumor development

We next investigated whether Tregs express the CCR2 receptor at their surface. CCR2 staining using the antibody that labeled inflammatory monocytes was not detected on Treg. CCR2 is the best known receptor for the chemokine CCL2 and presents high affinity for this chemokine. Using the CCR2 ligand, conjugated with Alexa-647 dye ($CCL2^{AF647}$) as previously done (32), we revealed functional surface CCR2 receptor expression in both blood inflammatory monocytes and Tregs (Supplementary Fig. S3A). A significant and distinct fraction of Tregs binds the chemokine in the tumor, blood, and dLN (Fig. 2). This binding was almost completely abrogated in $Ccr2^{-/-}$ mice and in the presence of competitive nonlabeled CCL2 (Supplementary Fig. S3B) but was similar in CCR1, CCR5, and D6-deficient mice, the three other receptors that have been shown to bind CCL2 with lower affinity (Supplementary Fig. S3C). CCL2 binding was specifically detected on RFP^+ Tregs reporting *Ccr2* transcription (Supplementary Fig. S3D). CCL2 binding was assessed in both Th and Treg compartments and the proportion of cells binding the chemokine in WT mice, but not in $Ccr2^{-/-}$, was therefore considered to be $CCR2^+$ T cells. At steady state, 8.8 ± 4.9% of Tregs were $CCR2^+$ in the dLN, whereas less than 2% of Th cells bound CCL2 (Fig. 2A). The proportion of $CCR2^+$ Tregs peaked to 21.3 ± 8.4% on day 10 and subsequently dropped to 16.5 ± 2.3% on day 19. In the blood, the percentage of $CCR2^+$ Tregs was 10.9 ± 5.8% at steady state, increased up to 23.5 ± 5.4% on day 10, and dropped to 17.27 ± 3.4% on day 19 (Fig. 2B). In contrast, the proportion of $CCR2^+$ Th did not significantly increase in those tissues over time (Fig. 2A and B). In the tumor, the proportion of $CCR2^+$ Tregs was higher compared with dLN and blood but remained stable over time (from 48.1 ± 17.9% on day 7 to 58.2% ± 13.7 on day 19). The proportion of $CCR2^+$ tumor-infiltrating Th still remained lower (Fig. 2C). Finally, $CCR2^+$ Tregs represented both distinct and differentially overlapping subsets with the $CCR4^+$, $CCR5^+$, and $CCR6^+$ Tregs in the dLN, and these $CCR2^+$ Tregs were preferentially enriched within the tumor compared with the other subsets. Notably, the proportion of $CCR2^+$ Tregs coexpressing CCR4 and CCR6 was lower in the tumor compared with dLN, whereas the one coexpressing CCR5 remained similar (Supplementary Fig. S3E).

We concluded that the $CCR2^+$ Treg fraction sequentially increased in the dLN and the blood during the early steps of tumor growth while it was constantly highly represented among tumor-infiltrating Tregs. Overall, our results suggested that CCR2 represents a major Treg homing receptor in tumor context.

$CCR2^+$ Tregs are activated, IL10 producing, and tumor antigen–specific cells

To better characterize $CCR2^+$ Tregs, we compared the phenotype of $CCR2^+$ and $CCR2^-$ Tregs in the dLN and in the tumor. In the dLN, $CCR2^+$ Tregs displayed an activated

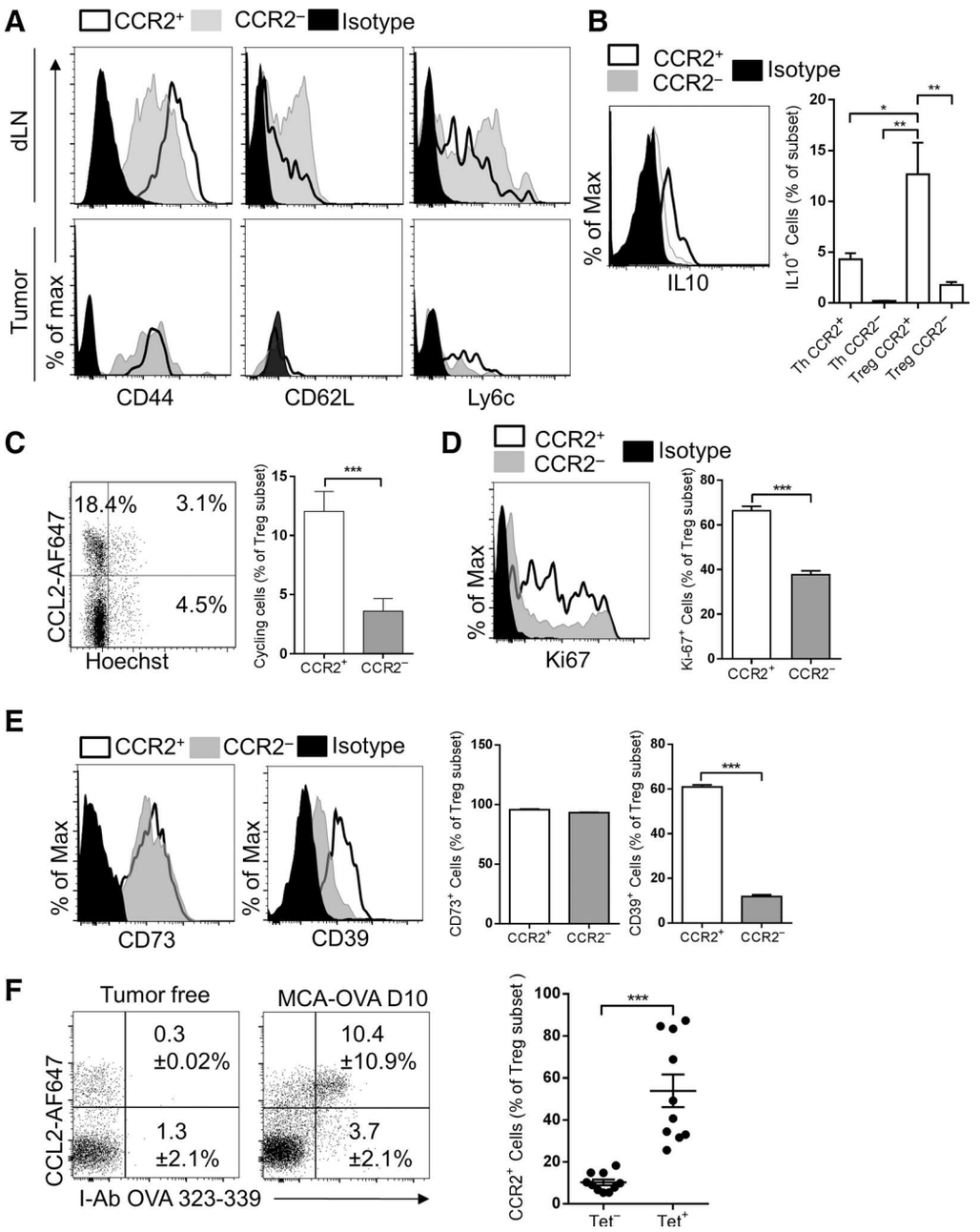


Figure 3.

CCR2$^+$ Tregs are activated, IL10 producing, and tumor antigen–specific cells. The phenotype of Ccr2$^+$ and Ccr2$^-$ Tregs was analyzed on day 10 after tumor inoculation. **A,** representative histogram plots of indicated surface markers. **B,** representative dot plot of IL10 staining gated on dLN Treg subsets (left) and quantification (right). Data represent mean ± SEM of 4 mice from two independent experiments. One-way ANOVA with Bonferroni multiple comparison test was used. **C,** representative dot plots of CCR2 and DNA staining (Hoechst; left) in dLN. Bars represent mean ± SEM of 14 mice from four independent experiments (right). Student *t* test was used. **D,** representative histogram plot of Ki67 expression (left) in dLN. Bars represent mean ± SEM of 6 mice from two independent experiments (right). Student *t* test was used. **E,** representative histogram plots of CD73 and CD39 expression in dLN. Bars represent mean ± SEM of 6 mice from two independent experiments. **F,** representative FACS dot plot of concomitant CCR2 and I-Ab $OVA_{323-339}$ tetramer staining in the dLN of tumor-free and tumor-bearing mice; percentage ± SD are indicated (left). Quantification of CCR2$^+$ Treg in the tetramer-negative and -positive fraction (Tet$^-$ and Tet$^+$); bars indicate mean ± SEM (right) of 10 mice from three independent experiments. Student *t* test was used. (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$).

phenotype, expressing higher levels of CD44 and lower levels of Ly6C and CD62L as compared with CCR2$^-$ Tregs. In the tumor, CCR2$^+$ and CCR2$^-$ Tregs were all $CD44^{high}$, $CD62L^{low}$, and $Ly6C^{low}$ (Fig. 3A). In addition, CCR2$^+$ Tregs were the cells with the highest capacity to produce IL10 after phorbol 12-myristate 13-acetate–ionomycin stimulation compared with CCR2$^-$ Tregs, but also compared with CCR2$^+$ and CCR2$^-$ Th lymphocytes (Fig. 3B).

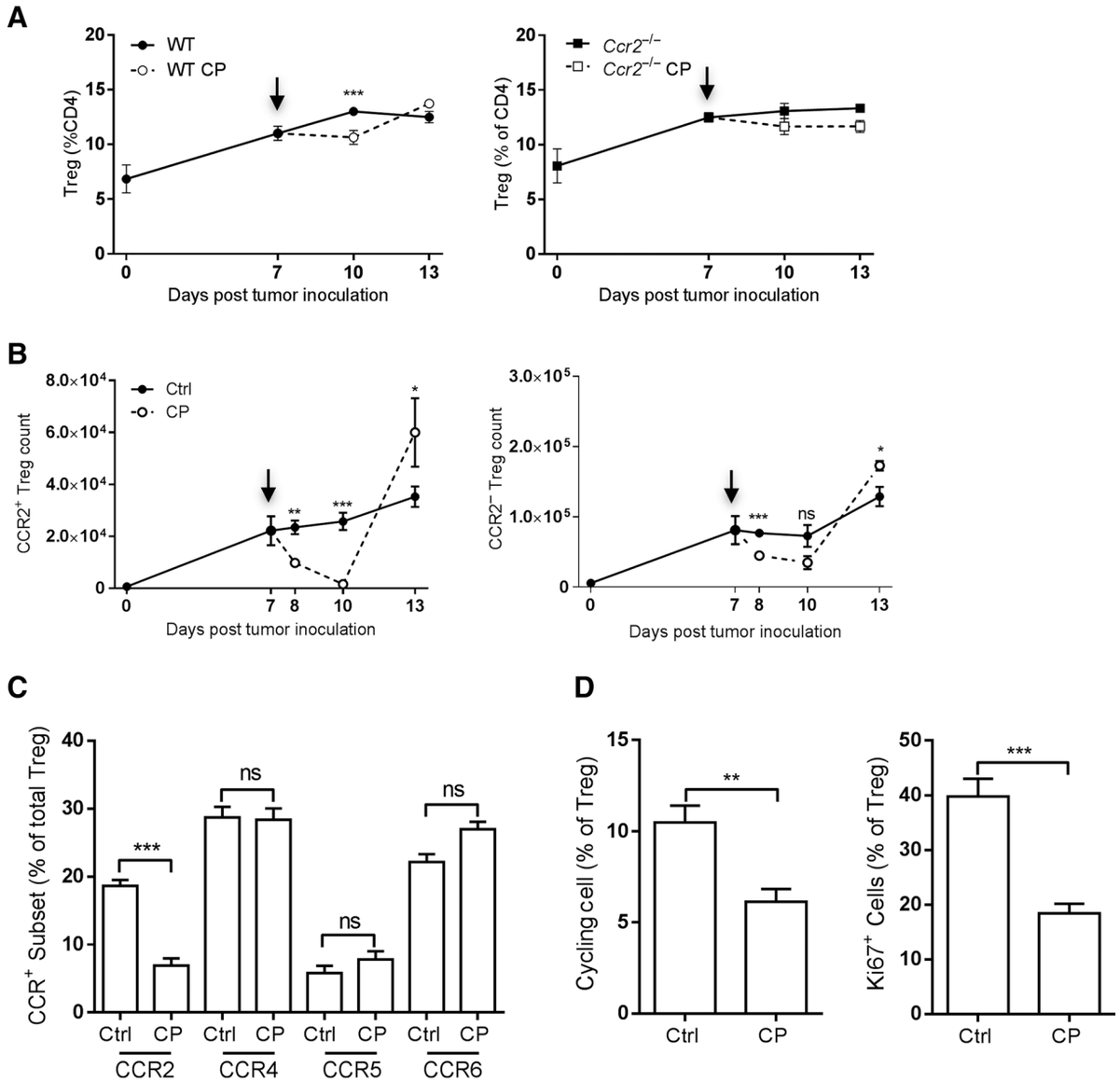


Figure 4.

CCR2$^+$ Tregs are preferentially depleted by low-dose cyclophosphamide treatment. **A,** graphs show percentage of dLN Tregs among CD4$^+$ T cells in WT (left) and *Ccr2*$^{-/-}$ mice (right) treated (dashed lines) or untreated (full lines) with low-dose cyclophosphamide (CP; 100 mg/kg) on day 7. Data, mean ± SEM ($n = 6$ to 10 mice from 2–5 independent experiments). **B,** quantification of the number of Treg CCR2$^+$ (left) and CCR2$^-$ (right) in WT mice. Data, mean ± SEM ($n = 6$ to 10 mice from 2–5 independent experiments). **C,** bars show the frequency of the indicated chemokine receptor among total Tregs in the dLN on day 10. Ctrl, control; ns, not significant. Data, mean ± SEM ($n = 5$ mice/group). One-way ANOVA tests with Bonferroni multiple comparison tests were used to compare treated with nontreated mice at each time point. **D,** bars represent the frequency of cycling (Hoechst$^+$, left; Ki67$^+$, right) Tregs in the dLN on day 10. Data, mean ± SEM ($n = 5$–8 mice/group, Student *t* test was performed; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$).

Accordingly, the CCR2$^+$ Treg subset in the dLN was cycling more than the CCR2$^-$ Treg subset as shown by Hoechst and Ki67 staining (Fig. 3C and D).

CD73 and CD39 expression on Tregs have been previously associated with strong immunosuppression (33). CD73 expression was similar in CCR2$^+$ and CCR2$^-$ Tregs, but CD39 expression was greater in the former (Fig. 3E). Finally, staining with OVA-323-339 MHCII tetramer (I-Ab OVA-323-339) revealed that tumor antigen–specific Tregs were more restricted to the CCR2$^+$ subset (Fig. 3F). We concluded that CCR2$^+$ Tregs represent proliferating tumor-activated Tregs with a high immunosuppressive activity.

CCR2$^+$ Tregs are preferentially depleted by low-dose cyclophosphamide treatment

Low dose of cyclophosphamide has been shown to specifically deplete Tregs, thereby enhancing anti-tumor T-cell priming and

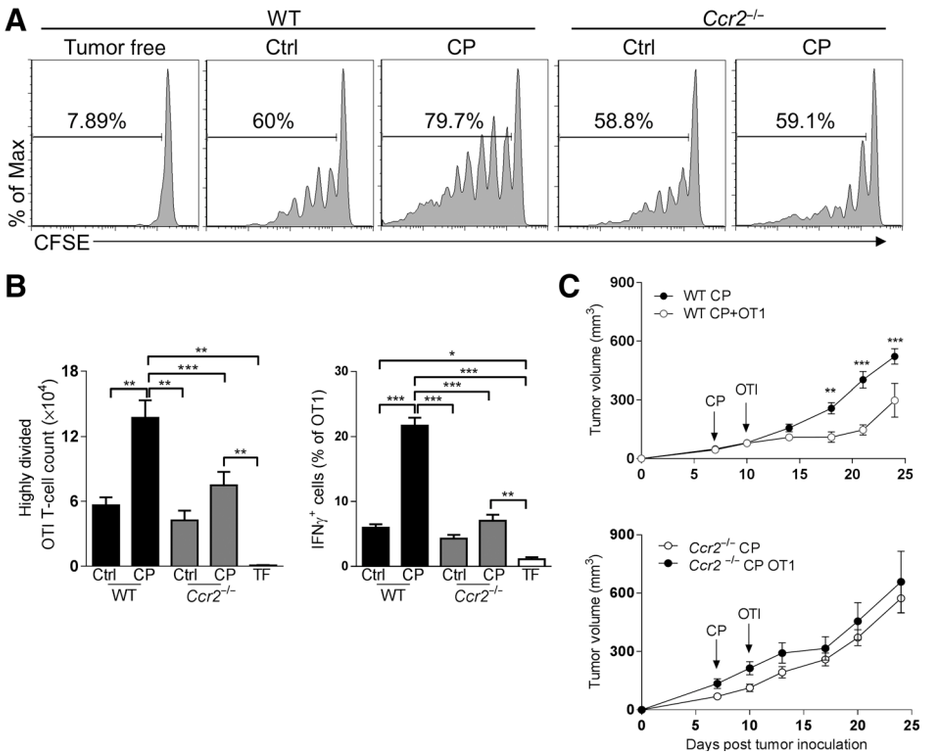


Figure 5.
Low-dose cyclophosphamide (CP) fails to enhance the priming of OT-1 in the dLN of *Ccr2*$^{-/-}$ mice. Three days after treatment with low-dose cyclophosphamide, CFSE-labeled OT-1 cells were transferred in tumor-bearing WT and *Ccr2*$^{-/-}$ mice. Proliferation and IFNγ production of OT-1 in dLN were analyzed 3 days later. **A,** representative dot plots show CFSE dilution gated on CD45.1^{+} OT-1 cells. Ctrl, control. **B,** quantification of OT-1 cell proliferation and INFγ production on day 13. Data, mean ± SEM ($n = 15$ mice from three independent experiments). **C,** tumor growth in cyclophosphamide-treated WT and *Ccr2*$^{-/-}$ mice with (white) or without (black) OT-1 adoptive transfer. Graphs represent mean ± SEM of 15 to 20 mice in each group from three independent experiments. Two-way ANOVA with Bonferroni multiple comparison test was used (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$).

proliferation (34, 35). We thought to analyze the impact of this alkylating agent on dLN CCR2^{+} Tregs.

As expected, after one single low dose of cyclophosphamide (100 mg/kg) on day 7, the percentage of Tregs in the dLN was reduced by 25% on day 10 and recovered on day 13 in WT mice. The percentage of Tregs remained barely affected in *Ccr2*$^{-/-}$ mice (Fig. 4A). The depletion observed in WT mice preferentially affected CCR2^{+} Tregs. Indeed, the absolute number of CCR2^{+} Tregs gradually decreased from day 7 to day 10 (93% depletion), whereas CCR2^{-} Tregs were less affected (52% depletion). For both subsets, Treg recovery occurred within 3 days (Fig. 4B). Cyclophosphamide sensitivity was selective to the CCR2^{+} Tregs compared with CCR4^{+}, CCR5^{+}, and CCR6^{+} Tregs, emphasizing the preferential targeting of the CCR2^{+} subset (Fig. 4C). The frequency of cycling Tregs among total Treg of the dLN confirmed that cyclophosphamide treatment preferentially ablated proliferating Tregs (Fig. 4D). Comparative cell-cycle analysis in the dLN on day 8 and day 13 first revealed that the proportion of Tregs but not Th cells engaged in cell cycle is higher in WT mice compared with *Ccr2*$^{-/-}$ mice. Nevertheless, the absolute numbers of cycling Tregs are identical, arguing that noncycling Tregs accumulate in the dLN of *Ccr2*$^{-/-}$ mice (Supplementary Fig. S4). We conclude that CCR2^{+} Tregs are preferentially targeted by low-dose cyclophosphamide due to their higher activating and proliferating state and that in the absence of CCR2, noncycling Tregs are retained in the dLN, leading to lower depletion after cyclophosphamide treatment.

Low-dose cyclophosphamide fails to enhance the priming of OT-1 in the dLN of *Ccr2*$^{-/-}$ mice

We previously showed that low-dose cyclophosphamide treatment transiently enhances antitumor CD8^{+} T-cell response against MCA-OVA tumor (31). To assess whether the reduced Treg depletion in *Ccr2*$^{-/-}$ mice treated with low-dose cyclophosphamide has a functional impact, we adoptively transferred naïve OT-1 CD8^{+} cytotoxic T cells 3 days after cyclophosphamide treatment and analyzed 3 days after transfer cell proliferation and IFNγ production in the dLN. In cyclophosphamide-treated WT mice, the proliferation rate of OT-1 cells was improved by 2.5-fold, whereas OT-1 cell count was not significantly changed in *Ccr2*$^{-/-}$ mice. The percentage of IFNγ-producing OT-1 was also increased in WT cyclophosphamide-treated mice but not in *Ccr2*$^{-/-}$ mice (Fig. 5A and B). Accordingly, the therapeutic combination did yield a significant reduction in tumor growth from day 18, when compared with mice treated with low-dose cyclophosphamide alone, but this beneficial effect was completely lost in *Ccr2*$^{-/-}$ mice (Fig. 5C). Altogether, these results indicate that preferential depletion of CCR2^{+} Tregs is associated with increased priming of tumor-specific CD8^{+} T cells. On the other hand, in *Ccr2*$^{-/-}$ mice, where Tregs are not as effectively depleted, low-dose cyclophosphamide failed to enhance the priming of tumor-specific CD8^{+} T cells.

CCR2^{+} Tregs accumulate within spontaneous mammary carcinoma and are preferentially depleted by low-dose cyclophosphamide

We next evaluated whether the CCR2^{+} Treg subset expansion could be applicable to a less inflammatory and a more progressive tumor model. CCL2^{AF647} was also used to stain CCR2^{+} CD4^{+} T cells in the spontaneous Cherry-OVA PyMT mammary carcinoma model, in which tumor apparition occurs at 23 ± 2.1 weeks of age. Consistent with the results in the MCA-OVA tumor model, CCL2 binding defined a higher proportion of CCR2^{+} Tregs compared with Th in the dLN, blood, and tumor. PyMT mice were treated

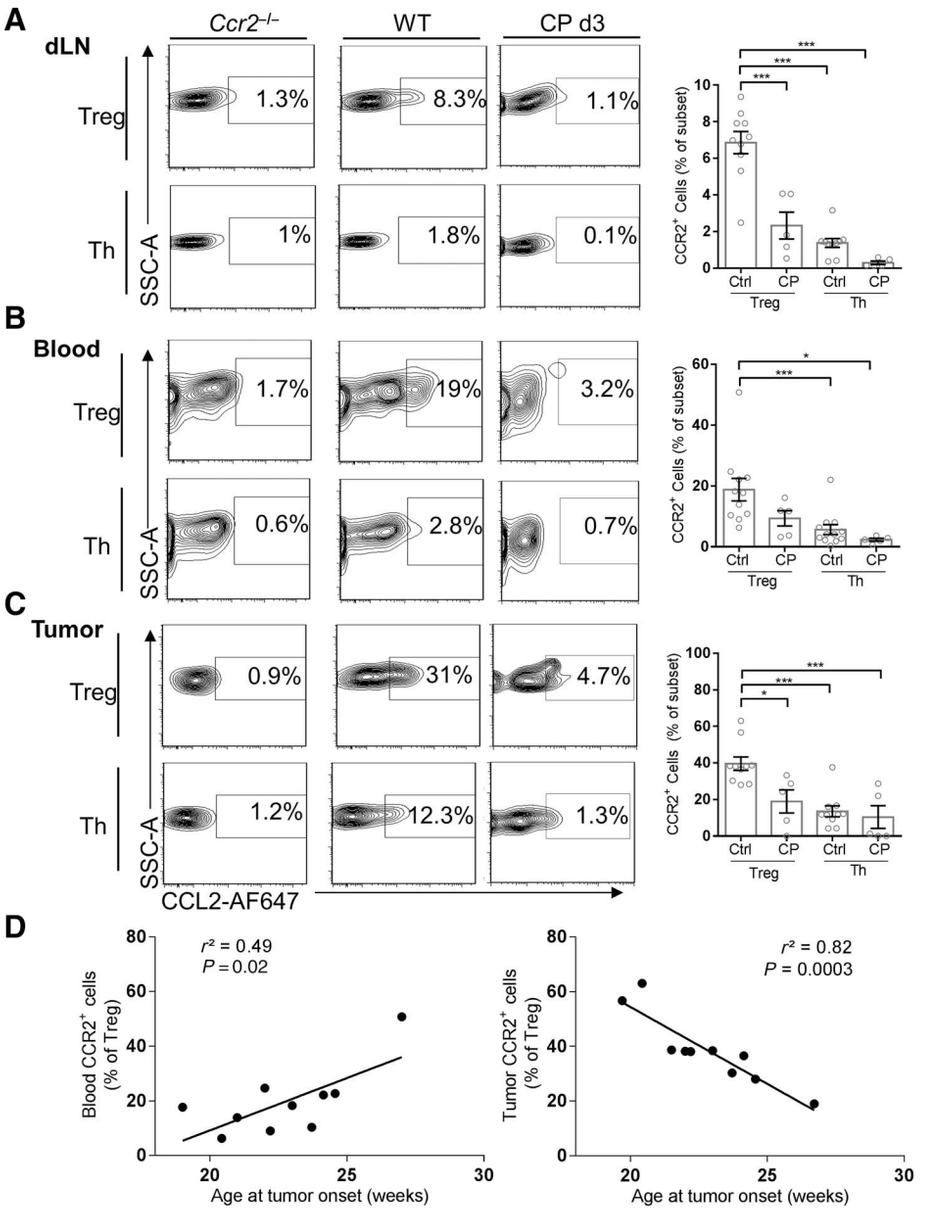


Figure 6.
CCR2$^+$ Tregs accumulate within spontaneous mammary carcinoma and are preferentially depleted by low-dose cyclophosphamide. **A–C,** representative contour plots (left) of CCL2 binding on Treg and Th cells from WT and *Ccr2*$^{-/-}$ MMTV-PyMT mice, 3 days after treatment with cyclophosphamide (CP) in dLN (**A**), blood (**B**), and tumor (**C**). Graphs, percentage of CCR2$^+$ Tregs and Th (right). One-way ANOVA with Bonferroni multiple comparison test was used (n = 5–10 mice). Ctrl, control. **D,** graphs show correlative analysis between the percentage of CCR2$^+$ Tregs and the age at tumor onset in the blood (left) and the tumor (right). Linear regression was calculated, and Pearson correlation coefficients are indicated. (*, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$).

with either PBS or low-dose cyclophosphamide once tumor nodules were palpable, and frequencies of CCR2$^+$ Tregs and Th cells were monitored 3 days after treatment. Similarly to the observations made in the MCA-OVA model, low-dose cyclophosphamide led to a preferential depletion of CCR2$^+$ Tregs in the different compartments (Fig. 6A–C). In addition, we found that a lower percentage of CCR2$^+$ Tregs in the blood and a higher percentage of CCR2$^+$ Tregs in the tumor correlated with an earlier onset of tumor development (Fig. 6D).

CCR2$^+$ Tregs accumulate within human OSCC

Finally, we examined the expression of CCR2 in Tregs (CD4$^+$CD25$^+$Foxp3$^+$CD127$^-$) and Th cells (CD4$^+$CD25$^{-/low}$Foxp3$^-$) isolated from blood and tumors of OSCC patients and compared with healthy blood donors and nontumor gingival tissues from patients undergoing wisdom tooth extraction. Compared with the mouse, the human anti-CCR2 antibody did provide a good signal quality on T cells. The specificity of CCR2 staining was confirmed by preincubating the cells with unlabeled CCL2 chemokine, which inhibited the binding of the CCR2 antibody and allowed to define our gating for CCR2$^+$ T cells (Fig. 7A). Although the proportions of CCR2$^+$ Th in the blood were similar between OSCC patients and control blood (13.9 ± 4.9%, 14.1 ± 6.7%), the percentage of CCR2$^+$ Tregs was significantly decreased in patients (10.9 ± 4 %) as compared with healthy donors (17.1 ± 5.3%; Fig. 7B). The frequency of CCR2$^+$ Th cells was also similar between tumor tissue and healthy gingiva. However, the percentage of CCR2$^+$ Tregs was increased to 38.6 ± 6.5% in tumor tissues as compared with healthy gingival (28.1 ± 7.9). In conclusion, in OSCC patients, we observed a reduced frequency of circulating CCR2$^+$ Tregs while they accumulated in the tumor microenvironment.

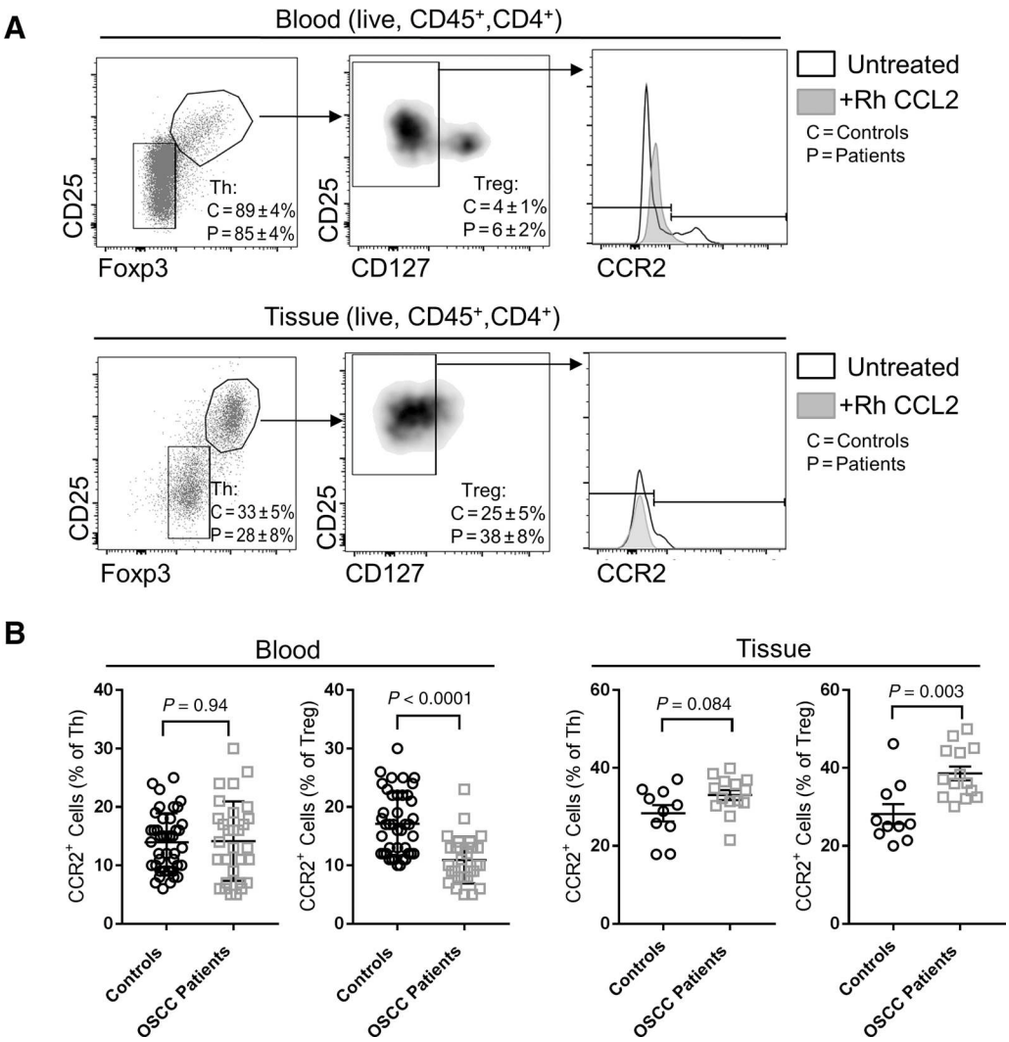


Figure 7.

CCR2$^+$ Tregs accumulate within human OSCC. **A,** gating strategy for Th and Treg cells in human fresh blood (top) and OSCC tumors (bottom). Mean percentage ± SD of Th cells and Tregs among total CD4$^+$ cells in healthy control subjects (C) or OSCC patients (P) are indicated. Histogram plots show CCR2 expression on Tregs after preincubation with rhCCL2 competitor (gray histogram) or not (empty histogram). **B,** frequency of CCR2$^+$ Th and Tregs in the blood of healthy ($n = 42$) or OSCC patients ($n = 30$; left) and healthy gingival tissues ($n = 10$) or OSCC tumors ($n = 14$; right). Two-tailed Mann–Whitney test was used (P values are indicated).

Discussion

Chemokine receptor–mediated immune cell migration is usually achieved through combinatorial expression of multiple chemokine receptors (1). So far, most studies on the direct role of the chemokine CCL2 and its main receptor CCR2 have focused on myeloid cells because of their higher CCR2 expression. However, tumor-derived CCL2 was shown to be sufficient to mediate the tumor tropism of adoptively transferred T cells (36). Reduction of intratumor Tregs was observed in previous study following CCL2 blockade (37), but the direct role of this axis in mediating the tumor homing of Tregs has not been studied in depth.

We investigated whether the CCL2 chemokine could also be used by Tregs for their homing toward solid tumors *in vivo*. The reduction of tumor growth in *Ccr2*$^{-/-}$ mice was associated with a drastic reduction in both the number and percentage of Tregs inside the tumor. Parabiosis experiments to track the fate of *Ccr2*$^{-/-}$ Tregs in analogous microenvironments suggest that CCR2 expression on Tregs is required for the migration toward the tumor of at least 50% of Tregs, representing approximately the fraction of CCR2$^+$ Tregs within the tumor. The CCR2$^+$ Treg subset started to expand in the dLN concomitantly with the appearance of differences in tumor size between WT and *Ccr2*$^{-/-}$ mice, as well as the tumor infiltration of CCR2$^+$ Tregs. These observations suggest the induction of two distinct, CCR2-independent and CCR2-dependent, phases of Treg recruitment. The CCR2$^+$ Treg subset phenotype was consistent with one of activated Treg, highly cycling and immunosuppressive compared with CCR2$^-$ Tregs. In addition, the dynamic behavior of endogenous Tregs was affected by CCR2 deficiency in the dLN but not in non-dLN.

Indeed, we found a significant enrichment of tumor antigen–specific Tregs in the $CCR2^+$ versus $CCR2^-$ fraction. As a result, CCR2 upregulation by Tregs might follow tumor-induced T-cell activation.

The spontaneous PyMT model relates more to a chronic inflammatory state, where tumors slowly develop compared with the more acute and aggressive inoculated cell lines (38). In this model, Treg ablation was demonstrated to reduce both primary and metastatic tumor progression though increased IFNγ production (39). In the same line, increased frequency and suppressive activity of Tregs were associated with advanced stages in OSCC patients (40–42). In both the PyMT model and human OSCC patients, we observed a lower blood frequency and higher tumor frequency of $CCR2^+$Tregs compared with healthy controls. In the PyMT model, the onset of tumor apparition correlated with increased $CCR2^+$ Treg blood frequency but decreased tumor frequency. In this case, increased recruitment of $CCR2^+$ Tregs to the tumor might explain the lowering of the blood frequency and suggests that intratumoral $CCR2^+$ Tregs favor immunosuppression and accelerate tumor escape. In the MCA model, both blood and dLN $CCR2^+$ Treg frequency peaked on day 10 after tumor inoculation and subsequently reduced. This observation might reflect the early establishment of immune tolerance after tumor inoculation that is difficult to observe during spontaneous long-term tumor development in mice and humans.

Preferential depletion of Treg versus non-Treg compartment by the chemotherapeutic agent cyclophosphamide allows for the induction of an improved response to immunotherapies in preclinical model and is under investigation in human clinical trials (34, 43, 44). We observed a more marked Treg depletion in the highly cycling $CCR2^+$ subset following low-dose cyclophosphamide treatment in mice models. These results are consistent with the previous observation that cycling Tregs having a phenotype associated with maximal suppression (45) are depleted by the same alkylating agent (46). Preferential $CCR2^+$ Treg eradication by low-dose cyclophosphamide in humans requires further investigations. Cyclophosphamide sensitivity *in vitro* has also been associated with reduced detoxification processes due to lower intracellular ATP (47). We observed that $CCR2^+$ Tregs expressed higher level of the ectonucleoside triphosphate diphosphorylase CD39, which could contribute to higher sensitivity of the subset. No preferential depletion of the $CD39^+CCR2^+$ Tregs was observed *in vivo*, suggesting that CD39 expression does not predict cyclophosphamide sensitivity in contrast to cell cycle. Exogenous CCL2 addition neither enhanced Treg proliferation nor cyclophosphamide sensitivity *in vitro* (data not shown), suggesting that CCR2 exerts exclusively migratory function on Tregs. Preferential depletion of $CCR2^+$ Tregs after low-dose cyclophosphamide also occurred in the spontaneous MMTV-PyMT mammary carcinoma model. Beyond the weak and transient depletion of the overall Treg population, the preferential depletion of the $CCR2^+$ antigen-specific Treg subset might thus explain the strong combinatorial antitumor effect mediated by OTI cell adoptive transfer.

Our data demonstrate a crucial role of CCR2 in the regulation of Treg-mediated immunosuppression and provide more insights in the antitumor immune response after low-dose cyclophosphamide. These observations allowed us to define a novel target to improve the efficacy of chemotherapy.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Authors' Contributions

Conception and design: P.-L. Loyher, C. Combadière, A. Boissonnas
Development of methodology: P.-L. Loyher, J. Rochefort, M. Guillot-Delost, A. Boissonnas
Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): P.-L. Loyher, J. Rochefort, C. Baudesson de Chanville, P. Hamon, C. Bertolus, A. Boissonnas
Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): P.-L. Loyher, J. Rochefort, A. Boissonnas
Writing, review, and/or revision of the manuscript: P.-L. Loyher, J. Rochefort, C. Baudesson de Chanville, P. Hamon, C. Bertolus, M. Guillot-Delost, F.M. Lemoine, C. Combadière, A. Boissonnas
Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): G. Lescaille, M.F. Krummel, F.M. Lemoine, C. Combadière, A. Boissonnas
Study supervision: C. Bertolus, A. Boissonnas

Acknowledgments

The authors wish to thank the Plateforme Imagerie Pitié-Salpêtrière (PICPS) for assistance with the two-photon microscope and the animal facility "NAC" for mice breeding assistance.

Grant Support

A. Boissonnas received funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement n°304810 – RAIDs, Inserm, la "Ligue contre le cancer", and "Association pour la Recherche sur le Cancer". P. Hamon is funded by la "Ligue contre le cancer".

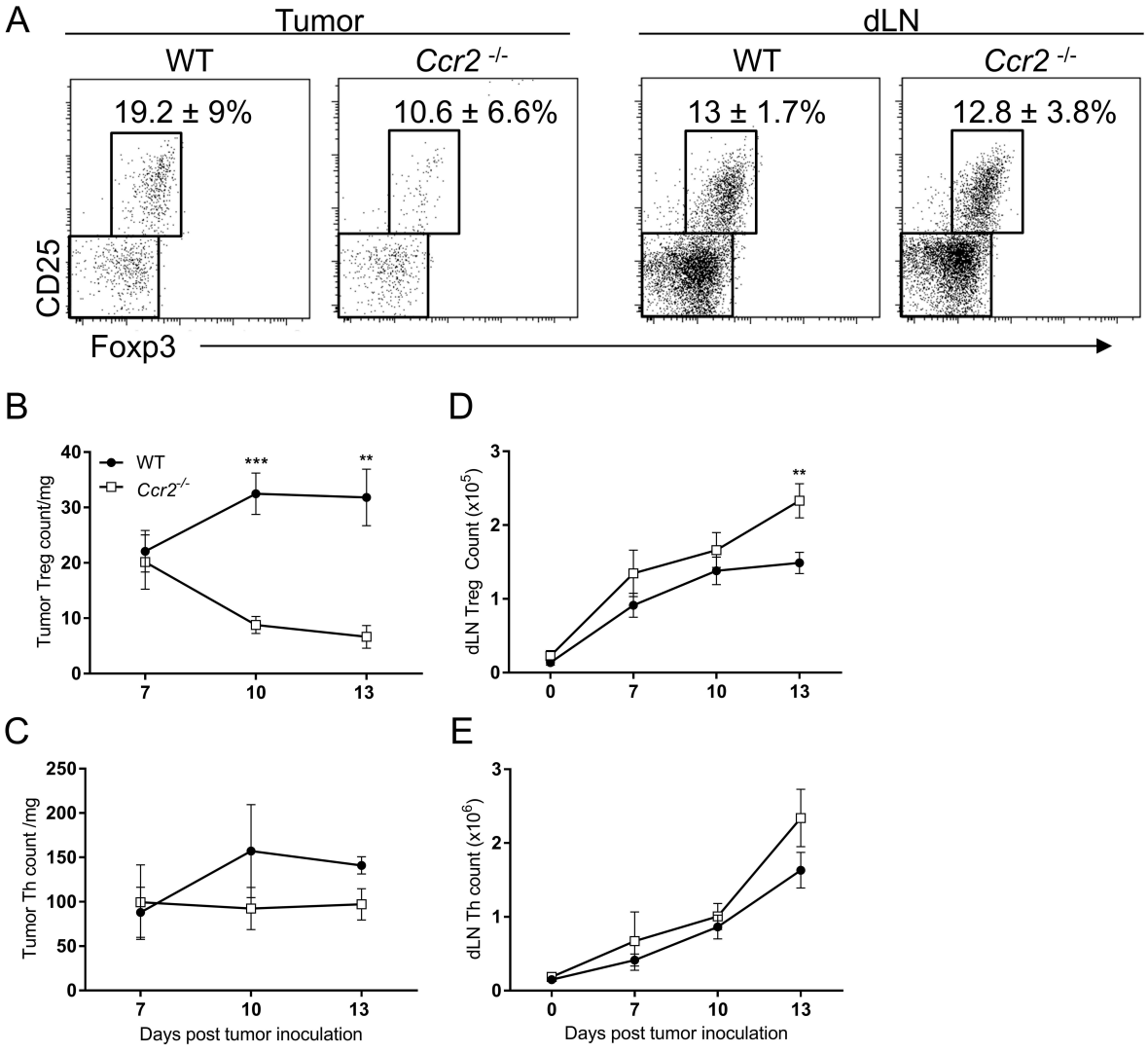
The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received April 12, 2016; revised September 7, 2016; accepted September 15, 2016; published OnlineFirst September 28, 2016.

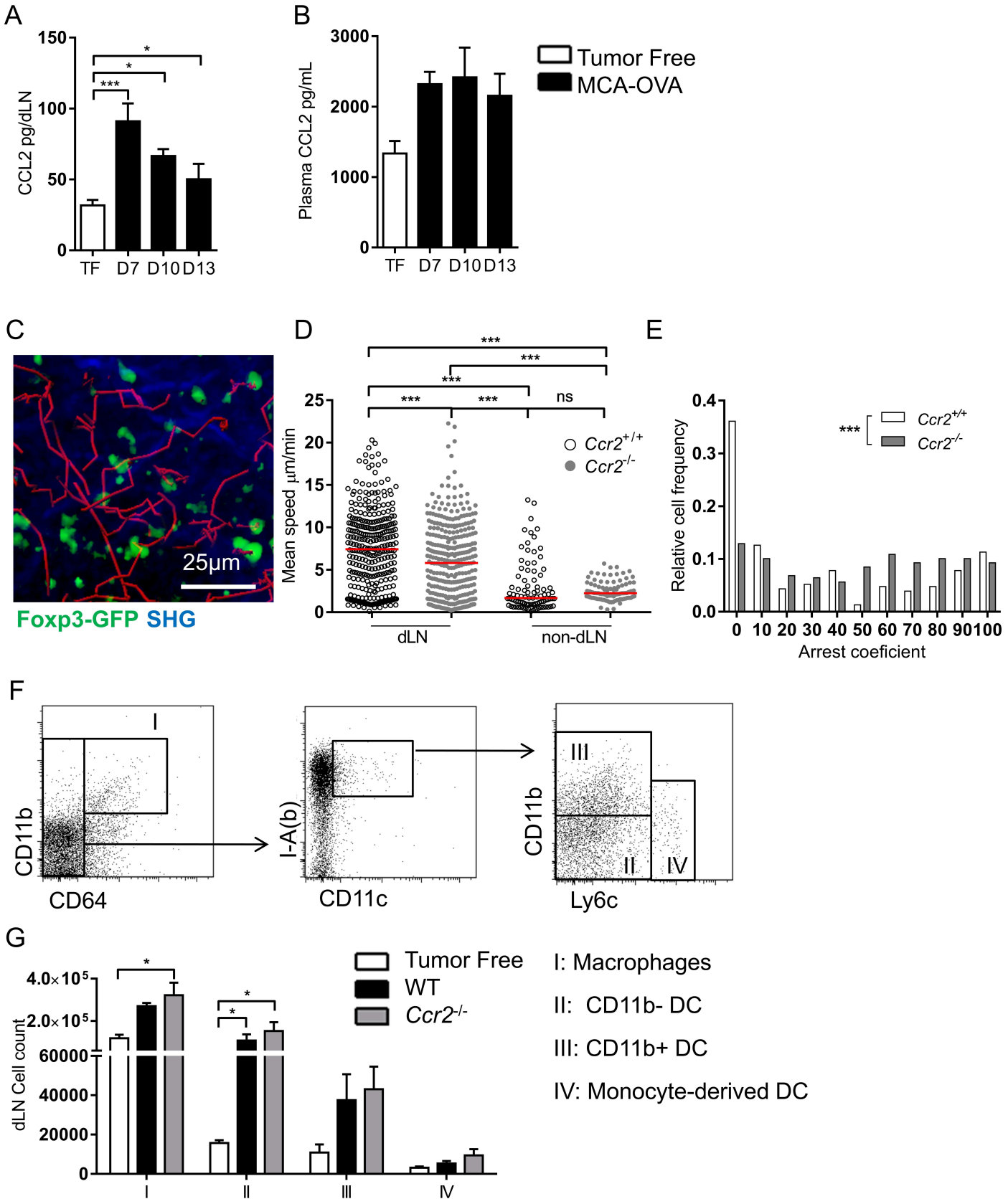
References

1. Franciszkiewicz K, Boissonnas A, Boutet M, Combadiere C, Mami-Chouaib F. Role of chemokines and chemokine receptors in shaping the effector phase of the antitumor immune response. Cancer Res 2012; 72:6325–32.
2. Chow MT, Luster AD. Chemokines in cancer. Cancer Immunol Res 2014; 2:1125–31.
3. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. Nat Rev Immunol 2011;11:762–74.
4. Amoura Z, Combadiere C, Faure S, Parizot C, Miyara M, Raphael D, et al. Roles of CCR2 and CXCR3 in the T cell-mediated response occurring during lupus flares. Arthritis Rheum 2003;48:3487–96.
5. Carr MW, Roth SJ, Luther E, Rose SS, Springer TA. Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. Proc Natl Acad Sci U S A 1994;91:3652–6.
6. Galluzzi L, Buque A, Kepp O, Zitvogel L, Kroemer G. Immunological effects of conventional chemotherapy and targeted anticancer agents. Cancer Cell 2015;28:690–714.
7. Qian BZ, Li J, Zhang H, Kitamura T, Zhang J, Campion LR, et al. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. Nature 2011;475:222–5.
8. Conti I, Rollins BJ. CCL2 (monocyte chemoattractant protein-1) and cancer. Semin Cancer Biol 2004;14:149–54.
9. Darrasse-Jeze G, Podsypanina K. How numbers, nature, and immune status of foxp3(+) regulatory T-cells shape the early immunological events in tumor development. Front Immunol 2013;4:292.
10. Ondondo B, Jones E, Godkin A, Gallimore A. Home sweet home: the tumor microenvironment as a haven for regulatory T cells. Front Immunol 2013;4:197.

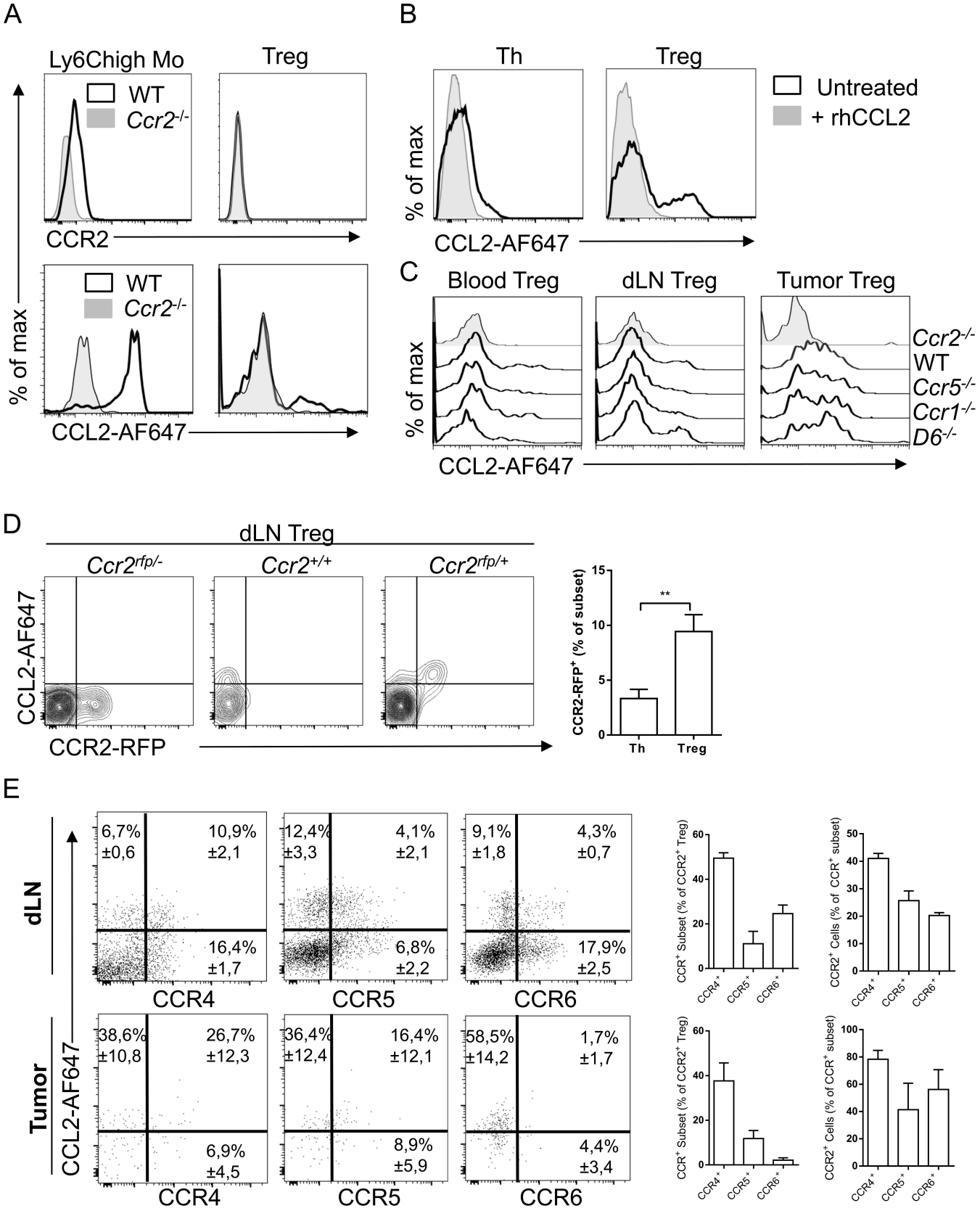
11. Curiel TJ. Tregs and rethinking cancer immunotherapy. J Clin Invest 2007;117:1167–74.
12. Shevach EM. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. Immunity 2009;30:636–45.
13. Munn DH, Mellor AL. The tumor-draining lymph node as an immune-privileged site. Immunol Rev 2006;213:146–58.
14. Wei S, Kryczek I, Zou W. Regulatory T-cell compartmentalization and trafficking. Blood 2006;108:426–31.
15. Campbell DJ, Koch MA. Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. Nat Rev Immunol 2011;11:119–30.
16. Rubtsov YP, Niec RE, Josefowicz S, Li L, Darce J, Mathis D, et al. Stability of the regulatory T cell lineage in vivo. Science 2010;329:1667–71.
17. Ding Y, Xu J, Bromberg JS. Regulatory T cell migration during an immune response. Trends Immunol 2012;33:174–80.
18. Lim HW, Broxmeyer HE, Kim CH. Regulation of trafficking receptor expression in human forkhead box P3+ regulatory T cells. J Immunol 2006;177:840–51.
19. Campbell DJ. Control of regulatory T cell migration, function, and homeostasis. J Immunol 2015;195:2507–13.
20. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. Nat Med 2004;10:942–9.
21. Gobert M, Treilleux I, Bendriss-Vermare N, Bachelot T, Goddard-Leon S, Arfi V, et al. Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. Cancer Res 2009; 69:2000–9.
22. Layseca-Espinosa E, Korniotis S, Montandon R, Gras C, Bouillie M, Gonzalez-Amaro R, et al. CCL22-producing CD8alpha- myeloid dendritic cells mediate regulatory T cell recruitment in response to G-CSF treatment. J Immunol 2013;191:2266–72.
23. Mitchell C, Couton D, Couty JP, Anson M, Crain AM, Bizet V, et al. Dual role of CCR2 in the constitution and the resolution of liver fibrosis in mice. Am J Pathol 2009;174:1766–75.
24. Bruhl H, Cihak J, Schneider MA, Plachy J, Rupp T, Wenzel I, et al. Dual role of CCR2 during initiation and progression of collagen-induced arthritis: evidence for regulatory activity of CCR2+ T cells. J Immunol 2004;172: 890–8.
25. Zhang N, Schroppel B, Lal G, Jakubzick C, Mao X, Chen D, et al. Regulatory T cells sequentially migrate from inflamed tissues to draining lymph nodes to suppress the alloimmune response. Immunity 2009;30:458–69.
26. Hamano R, Baba T, Sasaki S, Tomaru U, Ishizu A, Kawano M, et al. Ag and IL-2 immune complexes efficiently expand Ag-specific Treg cells that migrate in response to chemokines and reduce localized immune responses. Eur J Immunol 2014;44:1005–15.
27. Engelhardt JJ, Boldajipour B, Beemiller P, Pandurangi P, Sorensen C, Werb Z, et al. Marginating dendritic cells of the tumor microenvironment cross-present tumor antigens and stably engage tumor-specific T cells. Cancer Cell 2012;21:402–17.
28. Saederup N, Cardona AE, Croft K, Mizutani M, Cotleur AC, Tsou CL, et al. Selective chemokine receptor usage by central nervous system myeloid cells in CCR2-red fluorescent protein knock-in mice. PLoS One 2010;5:e13693.
29. Zeelenberg IS, van Maren WW, Boissonnas A, Van Hout-Kuijer MA, Den Brok MH, Wagenaars JA, et al. Antigen localization controls T cell-mediated tumor immunity. J Immunol 2011;187:1281–8.
30. Boissonnas A, Scholer-Dahirel A, Simon-Blancal V, Pace L, Valet F, Kissenpfennig A, et al. Foxp3+ T cells induce perforin-dependent dendritic cell death in tumor-draining lymph nodes. Immunity 2010;32:266–78.
31. Boissonnas A, Licata F, Poupel L, Jacquelin S, Fetler L, Krumeich S, et al. CD8+ tumor-infiltrating T cells are trapped in the tumor-dendritic cell network. Neoplasia 2013;15:85–94.
32. Ford LB, Cerovic V, Milling SW, Graham GJ, Hansell CA, Nibbs RJ. Characterization of conventional and atypical receptors for the chemokine CCL2 on mouse leukocytes. J Immunol 2014;193:400–11.
33. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. J Exp Med 2007;204: 1257–65.
34. Madondo MT, Quinn M, Plebanski M. Low dose cyclophosphamide: mechanisms of T cell modulation. Cancer Treat Rev 2016;42:3–9.
35. Ghiringhelli F, Menard C, Puig PE, Ladoire S, Roux S, Martin F, et al. Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. Cancer Immunol Immunother 2007;56:641–8.
36. Brown CE, Vishwanath RP, Aguilar B, Starr R, Najbauer J, Aboody KS, et al. Tumor-derived chemokine MCP-1/CCL2 is sufficient for mediating tumor tropism of adoptively transferred T cells. J Immunol 2007;179:3332–41.
37. Fridlender ZG, Buchlis G, Kapoor V, Cheng G, Sun J, Singhal S, et al. CCL2 blockade augments cancer immunotherapy. Cancer Res 2010;70:109–18.
38. Guy CT, Cardiff RD, Muller WJ. Induction of mammary tumors by expression of polyomavirus middle T oncogene: a transgenic mouse model for metastatic disease. Mol Cell Biol 1992;12:954–61.
39. Bos PD, Plitas G, Rudra D, Lee SY, Rudensky AY. Transient regulatory T cell ablation deters oncogene-driven breast cancer and enhances radiotherapy. J Exp Med 2013;210:2435–66.
40. Drennan S, Stafford ND, Greenman J, Green VL. Increased frequency and suppressive activity of CD127(low/−) regulatory T cells in the peripheral circulation of patients with head and neck squamous cell carcinoma are associated with advanced stage and nodal involvement. Immunology 2013;140:335–43.
41. Lim KP, Chun NA, Ismail SM, Abraham MT, Yusoff MN, Zain RB, et al. CD4+CD25hiCD127low regulatory T cells are increased in oral squamous cell carcinoma patients. PLoS One 2014;9:e103975.
42. Schott AK, Pries R, Wollenberg B. Permanent up-regulation of regulatory T-lymphocytes in patients with head and neck cancer. Int J Mol Med 2010;26:67–75.
43. Le DT, Jaffee EM. Regulatory T-cell modulation using cyclophosphamide in vaccine approaches: a current perspective. Cancer Res 2012; 72:3439–44.
44. Lutsiak ME, Semnani RT, De Pascalis R, Kashmiri SV, Schlom J, Sabzevari H. Inhibition of CD4(+)25+ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide. Blood 2005;105:2862–8.
45. Chen X, Subleski JJ, Kopf H, Howard OM, Mannel DN, Oppenheim JJ. Cutting edge: expression of TNFR2 defines a maximally suppressive subset of mouse CD4+CD25+FoxP3+ T regulatory cells: applicability to tumor-infiltrating T regulatory cells. J Immunol 2008;180:6467–71.
46. van der Most RG, Currie AJ, Mahendran S, Prosser A, Darabi A, Robinson BW, et al. Tumor eradication after cyclophosphamide depends on concurrent depletion of regulatory T cells: a role for cycling TNFR2-expressing effector-suppressor T cells in limiting effective chemotherapy. Cancer Immunol Immunother 2009;58:1219–28.
47. Zhao J, Cao Y, Lei Z, Yang Z, Zhang B, Huang B. Selective depletion of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells by low-dose cyclophosphamide is explained by reduced intracellular ATP levels. Cancer Res 2010; 70:4850–8.



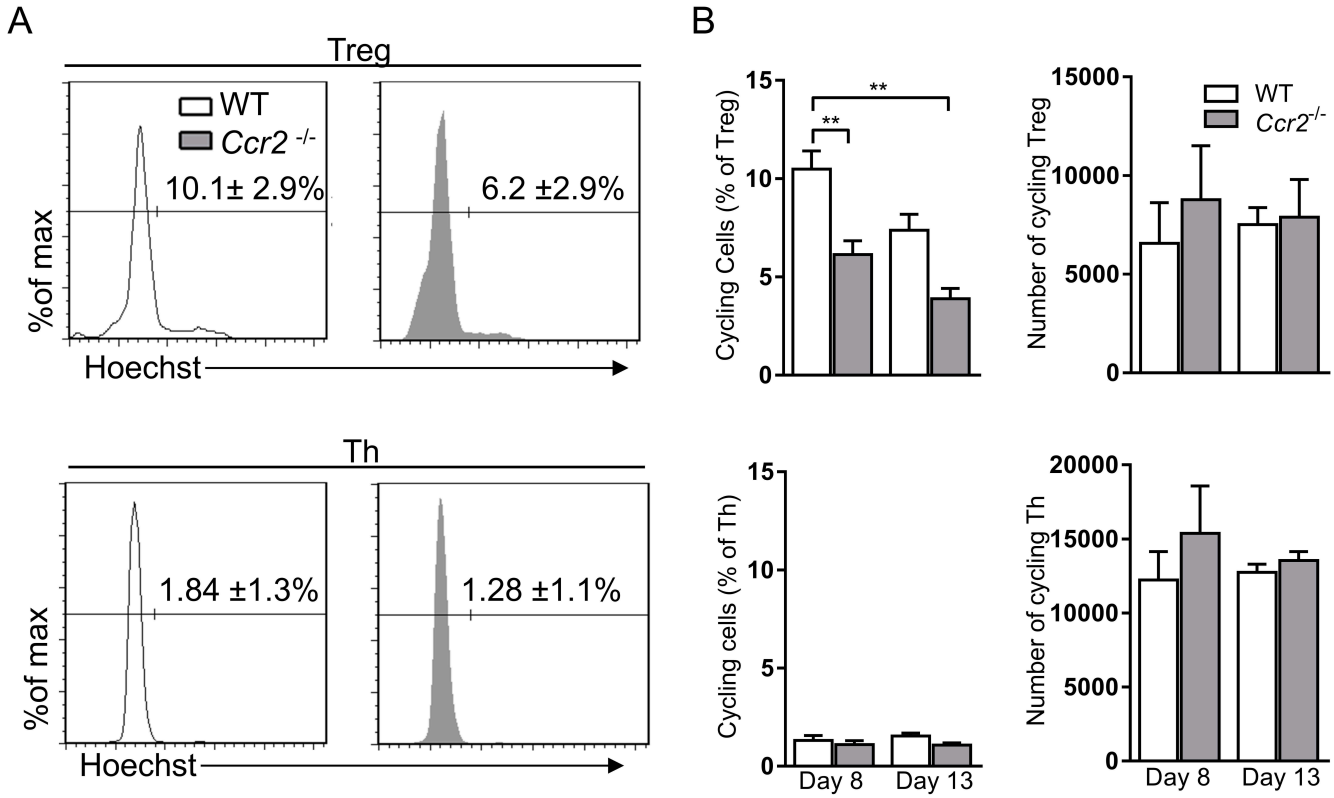
Supplemental figure 1: Tregs fail to migrate to the tumor in Ccr2$^{-/-}$ mice but accumulate in the dLN



Supplemental Figure 2: The dynamic of Tregs is reduced in the dLN of *Ccr2*$^{-/-}$ mice compared to WT mice



Supplemental Figure 3: CCL2-AF647 staining allows specific characterization of CCR2 receptor expression on Tregs



Supplemental figure 4: Non-cycling Tregs accumulate in the dLN of Ccr2$^{-/-}$ mice compare to WT mice

Supplementary Methods

Multiphoton imaging

All imaging experiments were performed on explanted tissue. LNs were carefully collected and were immobilized in an imaging chamber perfused with oxygenated (95% O_2 plus 5% CO_2) RPMI medium containing 10% FCS. Local temperature was monitored and maintained at 37℃. Lymph node imaging was perform ed 10 days after tumor inoculation. T cells could be detected up to 200 μm from the surface of LNs. Measurements were performed in at least three independent experiments.

The two-photon laser scanning microscopy (TPLSM) setup used was a Zeiss LSM 710 NLO multiphoton microscope (Carl Zeiss, Le Pecq, France) coupled to a Ti/sapphire crystal laser (Coherent Chameleon Ultra , Santa Clara, CA) that provides 140-fs pulses of near-infrared (NIR) light, selectively tunable between 680 and 1080 nm, and an acousto-optic modulator to control laser power.GFP was detected using two-dichroic mirrors (495 nm and 555 nm) with 520/35 bandpass filter. The excitation wavelength was 870 nm. Cell motility was measured every 30 seconds by 9 consecutive 5-μm z spacing stacks using a plan apochromat ×20 (NA = 1) water immersion objective. Fluorescent cells were monitored over time with three-dimensional automatic tracking and manual correction with Imaris software (Bitplane). The acquisition and analysis protocols for all experimental conditions to be compared were identical. The arrest coefficient was defined as the proportion of time each cell's instantaneous velocity (calculated for every 30 s interval) was less than 2 μm/min.

Antibodies

The following panel of anti-mouse surface antibodies was used: anti-CD4 (clone RM4-5), anti-CD3(clone 145-2C11), anti-CD25 (clone PC61), anti-Ly6c (clone AL-21), anti-CD44 (clone IM7), anti-CD62L (clone MEL-14), anti-CD69 (clone H1-2F3),

anti-CD45.1 (clone A20), anti-CD11b (clone M1/70), anti-I-A(b) (clone AF6-120-1), anti-CD11c (clone HL3), anti-CD45 (clone 30-F11), anti-IFNγ (clone XMG1.2), anti-CCR4 (clone 2G12), anti-CCR5 (clone 2D7), anti-CCR6 (clone 11A9),anti-CD16/32 (2.4G2; BD Biosciences), anti-CD64 (clone X54-5/7.1.1), anti-IL-10 (clone JES5-16E3), anti-CD39 (clone A1) (BioLegend, San Diego, CA, USA) ,anti-CCR2 (clone 475301;R&D systems), anti-CD73 (clone TY/11.8;eBioscience) .

The following panel of anti-human surface antibodies was used: anti-CD4 (clone VIT4), anti-CD25 (clone 4E3), anti-CD127 (clone MB15-18C9) (Miltenyi Biotec), anti-Foxp3 (clone 236A/E7; eBioscience), anti-CD45 (clone H130; BD Pharmigen) and anti-CCR2 (clone KO36C2; Biolegend).

Supplemental figure 1: Tregs fail to migrate to the tumor in Ccr2$^{-/-}$ mice but accumulate in the dLN

(A) Flow cytometric identification of Treg ($CD4^+CD3^+CD25^+Foxp3^+$) and Th ($CD4^+CD3^+CD25^-Foxp3^-$) subsets in the tumor and in the dLN at day 10 post tumor inoculation.

Quantification of the number of Treg (B-D) and Th (C-E) in tumors and dLNs of WT (black circles) and Ccr2$^{-/-}$ mice (white squares) at different time points post tumor inoculation. Data are representative of at least 10 mice in each group from at least 3 independent experiments. Two-way ANOVA with bonferoni's multiple-comparison test was used to compares means from WT and Ccr2$^{-/-}$ mice at each time points. (**p<0.01; ***p<0.001).

Supplemental figure 2: The dynamic of Treg is reduced in the dLN of Ccr2$^{-/-}$ mice compared to WT mice

ELISA detection of the CCL2 protein level in (A) dLN and (B) plasma at different time point following tumor inoculation of MCA-OVA or in tumor-free mice (TF). Bars represent means ±SEM of 8 mice in each group from two independent experiment. ANOVA with bonferoni's multiple-comparison test was performed.

(C) The dynamic of Tregs was analyzed by time-lapse two photon imaging of explanted LNs at day 10 post tumor innoculation in Foxp3-GFP mice. Representative images show typical Treg (green) track paths over time (red line). (D) Quantification of mean speed of Tregs in dLN and non-dLN. Median are indicated (red bars). Data are pooled from different movies out of three independent experiments. n=335 Treg for dLN of WT mice; n=340 for dLN of Ccr2$^{-/-}$ mice; n=90 for non-dLN of WT mice; n=106 for non-dLN of Ccr2$^{-/-}$ mice. One-way ANOVA with bonferoni's multiple-comparison test

was used. (E) Graph shows the distribution of arrest coefficients of Tregs in WT and Ccr2$^{-/-}$ mice in dLN at D10 after tumor inoculation. Mann-Whitney non-parametric t test was performed. Symbol used *** P<0.001. Scale bar: 25 µm

(F) FACS dot plots show the gating strategy for the different APC subsets in the dLN at D10. (G) Mean ± SEM of each indicated subset in the dLN of tumor free mice or WT and Ccr2$^{-/-}$ mice, 10 days after tumor inoculation. Data are representative of 4 mice in each group from two independent experiments. Two-way ANOVA with Bonferroni's for multiple comparison test was used. (*p< 0.05,***p<0.001).

Supplemental Figure 3: CCL2-AF647 staining allows specific characterization of CCR2 receptor expression on Treg cells

(A) Representative histograms plots of anti-CCR2 antibody staining on blood inflammatory monocytes (CD11b^{+}Ly6c^{high}) and Tregs (Upper panels) and CCL2-AF647 binding (Lower panels) in WT and Ccr2$^{-/-}$ tumor free mice.(B) Representative histograms plots of CCL2-AF647 binding inhibition on dLN Treg and Th using unlabelled rhCCL2 at day 8 post tumor innoculation. (C) Representative histograms plots of CCL2-AF647 binding on Tregs in the Blood, dLN, and tumor at day 10 post tumor innoculation in relevant chemokine receptor deficient mice compared to Ccr2$^{-/-}$ mice. Data are representative of 3 mice per groups. (D) Representative contour plots showing the expression of the Ccr2-transcriptional red fluorescent reporter (RFP) and CCL2-binding on dLN Tregs of tumor-bearing indicated mouse strains. Bars represent mean ±SEM of 8 mice from 3 independent experiments. (E) Representative dot plot showing the co-selection of CCR2^{+} Tregs with the indicated chemokine receptors in the dLN and the tumor, 10 days after tumor inoculation. Percent ±SD from 5 different mice are indicated for each quadrant. Left graphs show the proportion of each CCR

among CCR2^{+} Tregs. Right graphs show the proportion of CCR2^{+} Treg in each CCR+ Treg subsets. Data are mean ±SEM of 5 different mice.

Supplemental figure 4: Non-cycling Tregs accumulate in the dLN of Ccr2$^{-/-}$ mice compare to WT mice

(A) Representative histogram plots of DNA staining (hoechst) at day 8 post tumor inoculation, in Treg (upper panels) and Th (lower panels) in WT (white histograms) and Ccr2$^{-/-}$ (grey histograms). Percent of cell in S G2/M phases are indicated. (B) The percent (left panels) and absolute numbers (right panels) of cycling Treg and Th from WT (white bars) and Ccr2$^{-/-}$ (grey bars) mice were analyzed at day 8 and 13 post tumor inoculation. Bars represent mean ± SEM (n= 9 mice from three independent experiments at day 8 and n= 4 mice out of 2 experiments at day 13 post tumor inoculation). One-way ANOVA with Bonferroni‘s multiple comparison test was used for statistical analysis. (**p< 0.01).

Travaux collaboratifs « Rôle de CCR2 dans le co-recrutement de Treg et monocytes en réponse à la radiothérapie »

Michele mondini, Pierre-louis Loyher, Eric deutch, Alexandre Boissonnas

Contexte de l'étude

Plus de la moitié des patients atteints de cancer reçoivent un traitement radiothérapeutique, en combinaison ou non à des chimiothérapies ou interventions chirurgicales.

La radiothérapie peut induire l'arrêt du cycle cellulaire, la senescence ou l'apoptose des cellules tumorales via, notamment, des cassures double brin de l'ADN ou la production de dérivés réactifs de l'oxygène (Valerie et al., 2007). Alors que ces derniers effets sont bien étudiés, l'impact de la radiothérapie sur la composition cellulaire du TME l'est beaucoup moins. Pourtant, de nombreuses évidences indiquent que les modifications du TME induites par les thérapies ionisantes peuvent avoir des impacts profonds sur la biologie des cancers. Comme indiqué précédemment la radiothérapie pourrait induire une mort immunogène des tumeurs, mais comme la chimiothérapie, elle est souvent associée à une phase de rechute chez les patients (Leroi et al., 2016).

Dans des modèles précliniques de cancer VADS la récurrence des tumeurs après radiothérapie a été associé à une accumulation TAM (Connolly et al., 2016). D'autre part, une forte infiltration de Treg a été observée chez les patients atteints de tumeur VADS (Lim et al., 2014), mais leur rôle reste controversé dans ce contexte (Liu et al., 2016). Nous avons précédemment démontré que le récepteur de chimiokines CCR2 participe au recrutement de Treg et de monocytes au sein des tumeurs solides. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés au rôle de l'axe CCR2/CCL2 dans la distribution des Treg et macrophages/monocytes en réponse à la radiothérapie dans un modèle de tumeur VADS.

Principaux résultats

Dans cette étude, nous avons utilisé un modèle orthotopique de tumeur VADS base sur l'injection de cellule de la lignée TC-1 dans la joue des souris. Dans ce modèle nous étudions à différents points de cinétique la composition cellulaire de TME après une irradiation aux rayons X (7.5Gy) ciblée sur la zone tumorale (Figure 1).

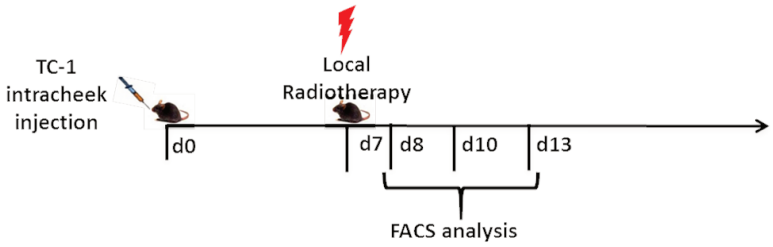


Figure 1 : Protocole expérimental utilisé

Dans ce modèle, la radiothérapie n'a qu'un rôle bénéfique transitoire sur la croissance tumorale. L'utilisation d'un vaccin thérapeutique basé sur la protéine E7 de HPV, exprimée par les cellules tumorales, augmente fortement l'efficacité de la radiothérapie (Mondini et al., 2015).

3 jours (D10) après la radiothérapie nous observons une augmentation massive et CCR2 dépendante de monocytes Ly6C^{high} circulants (Figure 2). Cette augmentation n'a pas lieu dans les souris irradiées en absence de tumeur, indiquant un rôle de facteurs sécrété au sein de la tumeur après radiothérapie (Figure 2). En effet, nous avons pu observer que l'irradiation des cellules tumorales, mais aussi de macrophages augmente leur production de la chimiokine CCL2 in vitro. La co-culture de macrophages et de tumeurs a un effet additionnel sur la production de CCL2 en réponse à la radiothérapie. L'augmentation de CCL2 est également observe dans le plasma des souris irradiée (Données non présentées).

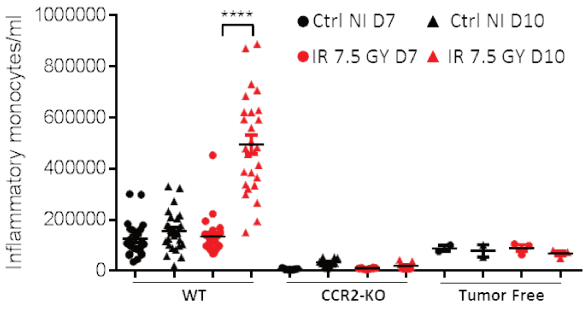


Figure 2 : Nombre de monocytes inflammatoires Ly6Chigh par millilitre de sang dans les souris WT, Ccr2$^{-/-}$ et dans les souris WT en absence de tumeur (Tumor Free).

Au sein de la tumeur, nous retrouvons une infiltration massive de monocytes Ly6C^{high} 3 jours après radiothérapie, en accord avec le rebond de ces cellules dans la circulation. L'augmentation

du nombre de monocyte est transitoire et leur nombre revient à des valeurs similaires à ceux des souris non-traitées 5 jours après radiothérapie. A ce point de cinétique, nous observons une forte augmentation du nombre de TAM, ce qui suggère une différenciation des monocytes Ly6C^{high} en TAM. Ces phénomènes n'étaient pas observables dans les souris déficientes pour le CCR2. Les nombres des autres populations myéloïdes analysées n'étaient pas significativement affectés par le traitement (Figure 3).

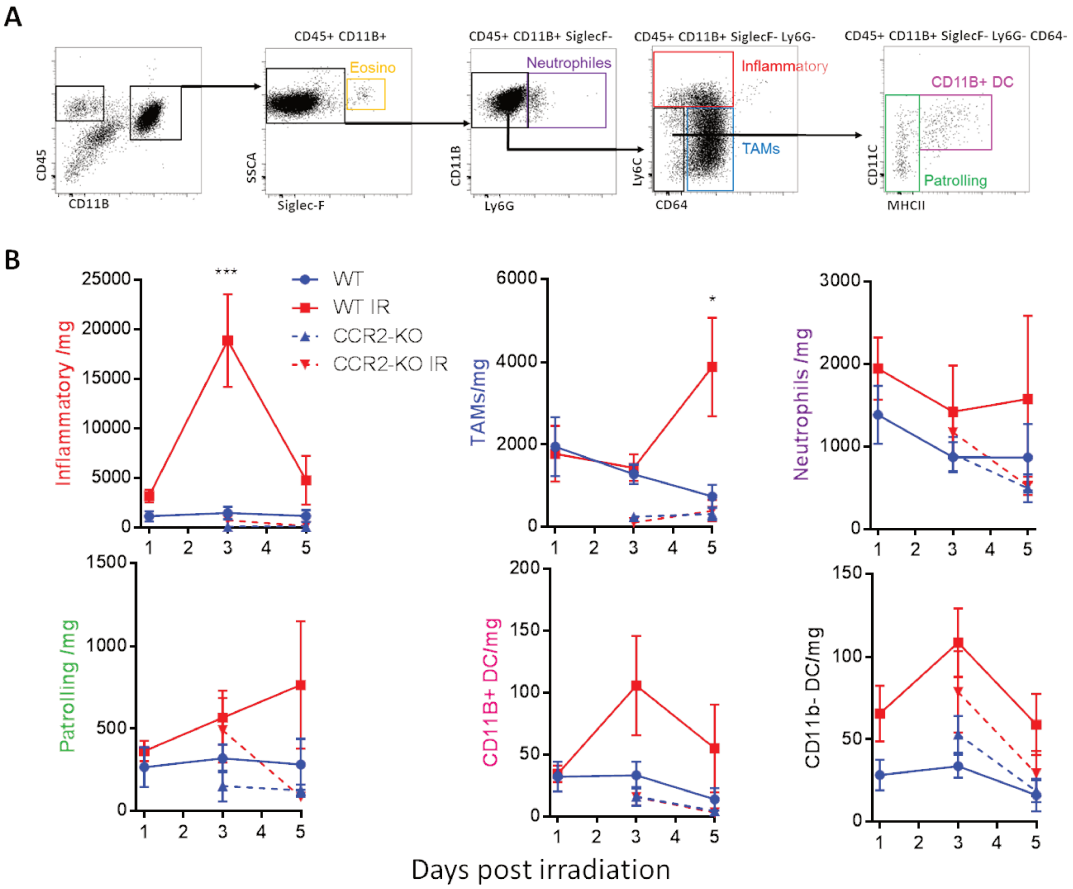


Figure 3 : A, Stratégies d'identification des différentes populations myéloïdes infiltrant la tumeur. B, Nombre de chaque population identifié normalisé par milligrammes de tumeurs après radiothérapie dans les souris WT et Ccr2$^{-/-}$(NI= Non-irradiées, IR= Irradiées).

Le nombre de Treg ainsi que leur proportion parmi les lymphocytes CD4$^+$ dans la tumeur est augmentée de manière CCR2 dépendante, 5 jours après irradiation. De plus, nous observons une augmentation de la proportion de Treg CCR2$^+$ dans le sang et une augmentation de leur nombre dans la tumeur. La proportion de lymphocytes CD4$^+$ conventionnels CCR2$^+$ et beaucoup plus faible comparée aux Treg et reste inchangée après irradiation (Figure 4).

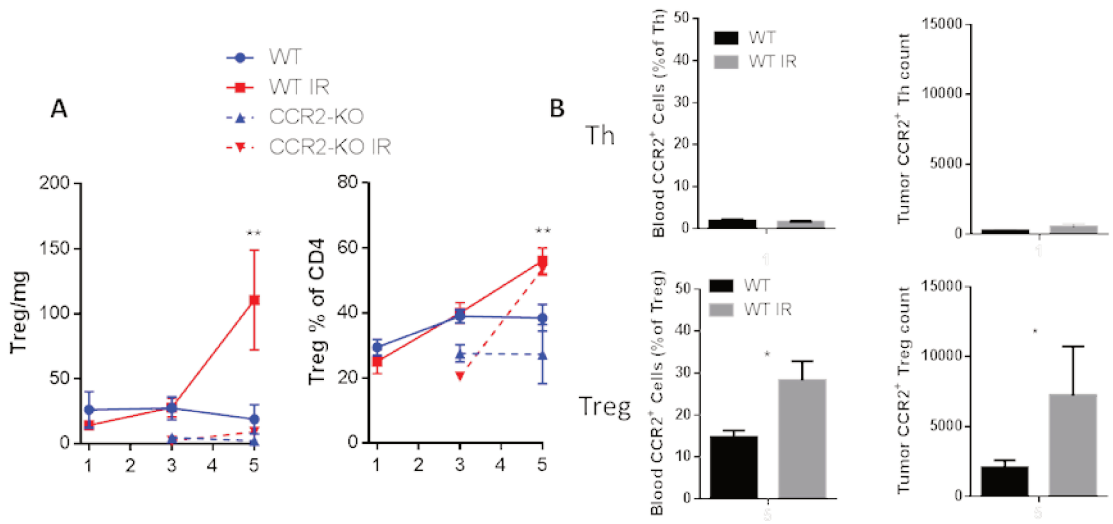


Figure 4 : A, Nombre de Treg par milligrammes de tumeur (Gauche) et pourcentage de Treg parmi les lymphocytes CD4+ (Droite). B, Expression du récepteur CCR2 a la surface des lymphocytes CD4+ conventionnels (Th) et des Treg dans le sang (gauche) et énumération des Treg CCR2+ et Th CCR2+ dans les tumeurs (Droite) (NI= Non-irradiées, IR= Irradiées).

Les souris WT et Ccr2$^{-/-}$ non-traitées ne présentaient pas de différence significative de survie. En revanche, après irradiation, la survie des souris Ccr2$^{-/-}$ est significativement prolongée par rapport aux souris WT (Figure 5).

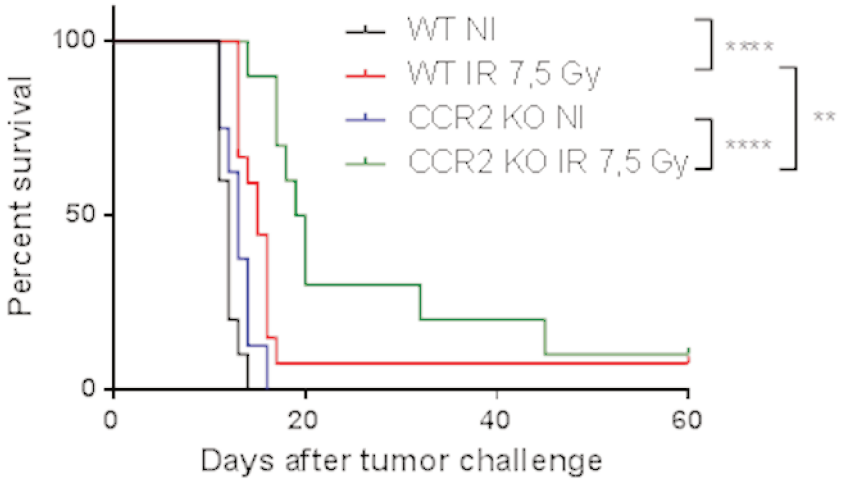


Figure 5 : Courbe de survie des souris WT et Ccr2$^{-/-}$ après irradiation. (NI= Non-irradiées, IR= Irradiées)

Afin d'étudier les interactions de Treg et de monocytes/macrophages nous avons croisé les souris Macblue avec les souris Fox3^{EGFP}. Nous avons confirmé par cytométrie que les cellules ECFP^{+} étaient principalement composées de monocytes ou de macrophages alors que seuls les Treg sont EGFP^{+} dans ce modèle (Données non présentées). Les Treg sont capables d'effectuer de multiples interactions de courte durée avec les monocytes ou macrophages dans les tumeurs

irradiées. Ces interactions peuvent parfois mener à la formation d'agrégat de monocytes/macrophages autour des Treg (Figure 6).

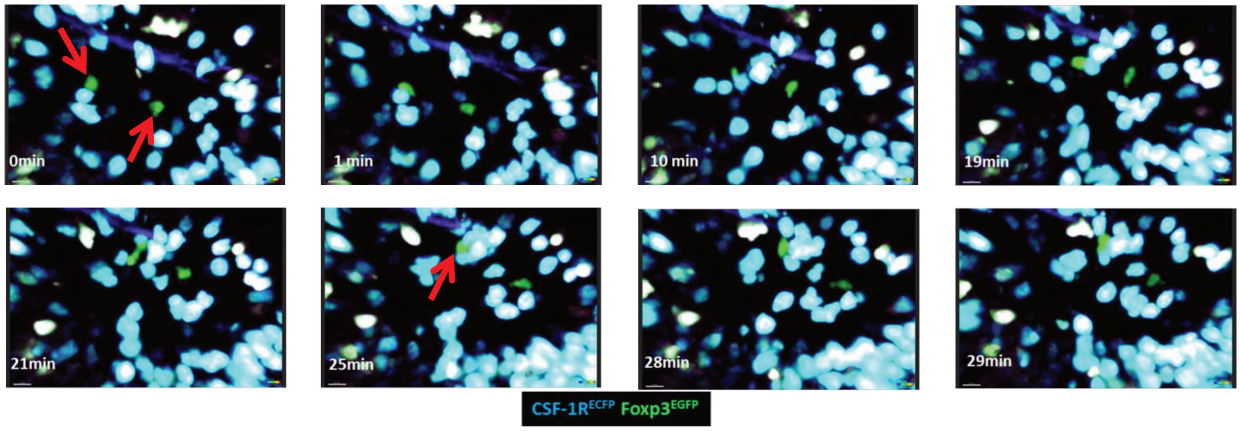


Figure 6 : Imagerie biphotonique de tumeur de souris Macblue X FoxP3EGFP 5 jours après irradiation représentant un exemple d'interactions de Treg (vert) et de monocytes/macrophages (bleu). Les flèches rouges indiquent la localisation des Treg.

Discussion et perspectives

Nous avons montré que la radiothérapie induit un recrutement de monocytes LyC6^{high} au sein de la tumeur. Ces monocytes semblent, en se différenciant, contribuer à une augmentation de la population de TAM. Dans le même temps une augmentation préférentielle du nombre Treg infiltrant la tumeur comparé aux CD4$^+$ conventionnels est observée. Ceci est associé à une expansion présentielle du compartiment de Treg CCR2$^+$ dans le sang et la tumeur. L'infiltration de monocytes et de Treg est dépendante du récepteur CCR2 et est associé à une production accrue de CCL2. Nos résultats suggèrent qu'après radiothérapie les cellules tumorales et/ou les TAM augmentent leur production de CCL2, par ce qui contribuerait au co-recrutement de monocytes et Treg vers la tumeur. L'augmentation de la densité de TAM et de Treg pourrait favoriser l'immunosuppression et la rechute des tumeurs après radiothérapie. En absence de CCR2 l'expansion du compartiment de TAM et de Treg n'a pas lieu, ce qui est associé à une augmentation de l'efficacité de la radiothérapie. Ainsi, l'axe CCR2/CCL2 pourrait représenter un obstacle à l'efficacité optimale des radiothérapies.

Une augmentation de l'activité suppressive des Treg après irradiation a été observée, mais les mécanismes associés à ce phénomène sont peu connues. Certaines études suggèrent que les Treg sont préférentiellement radiorésistants en comparaison avec les CD4$^+$ conventionnels, ce qui pourrait favoriser leur enrichissement après irradiation (Persa et al., 2015). Nos résultats

indiquent que l'expression de CCR2 par les Treg et la forte production de CCL2 par le TME pourraient représenter un mécanisme d'enrichissement des Treg dans les tumeurs irradiées.

Nous avons fait la preuve de concept que l'utilisation commune de l'axe CCR2/CCL2 par les Tregs et monocytes permet leur co-recrutement et leurs interactions au sein de la tumeur. Il a été démontré que les Treg sont capable d'affecter directement la polarisation des macrophages, favorisant notamment, un phénotype de type M2 (Tiemessen et al., 2007). La suite des travaux consistera à déterminer le rôle des Treg sur le recrutement et la différenciation des monocytes, ainsi que sur la polarisation fonctionnelle des macrophages in vivo. Pour ce faire, nous induirons une ablation du compartiment Treg au même moment que la radiothérapie après administration de la toxine diphtérique dans les souris $Foxp3^{DTR}$. Afin d'étudier le rôle spécifique du recrutement de Treg $CCR2^{+}$ au sein de la tumeur, nous effectuerons une inactivation conditionnelle du CCR2 sur les Tregs grâce aux souris $Ccr2^{fl/fl}$ X $Foxp3^{cre}$ et étudierons l'impact de cette invalidation sur la réponse à la radiothérapie. Finalement, la pertinence de nos résultats pourra être vérifiée par l'analyse des monocytes et Tregs du sang et de tumeurs de patients atteints de cancer VADS après un traitement radiothérapeutique.

Conclusion générale et perspectives

Les cellules et molécules inflammatoires sont d'important constituent de l'environnement locale des tumeurs. L'inflammation a de nombreux effets pro-tumoraux, elle peut favoriser la prolifération, la survie, les métastases mais aussi altérer les réponses aux agents thérapeutiques anti-cancéreux. La découverte des mécanismes inflammatoires associés aux cancers permet l'identification de nouvelles cibles et l'amélioration des diagnostiques et thérapies.

La chimiokines CCL2 est un important médiateur de l'inflammation, elle est rapidement secrétée en réponses à une lésion tissulaire pour permettre le recrutement monocytes $CCR2^{+}$. Cette chimiokines est également communément produite au sein des tumeurs solides, où les monocytes peuvent se différencier en macrophages pro-tumoraux.

Durand mes travaux de thèse, nous avons pu mettre évidence que ce même axe peut être utilisé pour la mise en place des fonctions immunosuppressives des Treg en contrôlant leur distribution en contexte tumoral. Notre étude apporte de nouvelles connaissances fondamentales sur la biologie des Treg et décrit un sous-type de Treg $CCR2^{+}$ qui pourrait servir de biomarqueur de la réponse chimiothérapeutique.

D'autre part, nous avons montré que le recouvrement CCR2 dépendent de TAM dérivés de monocytes est associé à la rechute des tumeurs après chimiothérapie myeloablative. Nous avons également décrit les mécanismes par lesquels l'anti-VEGF permet de limiter cette phase de rechute en ciblant spécifiquement le programme de développement des TAM.

De manière notable, le CCR2 n'est pas nécessaire pour l'accumulation des populations de TAM issus de macrophages résidents au sein des métastases pulmonaire. Ces derniers ont des fonctions protumorales complémentaires aux TAM recrutés. L'hétérogénéité cellulaire du TME pourrait être ainsi dictée par la composition initiale en macrophages des tissus affectés par des lésions cancéreuses. Il reste en revanche à étudier la contribution des TAM résidents dans d'autre type de tumeurs solides. Ces connaissances laissent envisager une meilleure compréhension de la diversité de statuts immunitaires des tumeurs et de leurs réponses aux traitements.

Après radiothérapie, l'axe CCR2/CCL2 permet le co-recrutement de Treg et de TAM favorisant ainsi la rechute des tumeurs. En orchestrant la co-localisation de deux protagonistes pro-tumoraux clefs, l'axe CCR2/CCL2 pourrait générer une boucle d'amplification de la progression tumorale. La suite des travaux consistera à caractériser les voies de signalisation et

acteurs moléculaire impliqués dans les fonctions protumorales associées aux interactions de différents sous-types de cellules $CCR2^{+}$.

Mes travaux renforcent le rôle central de l'axe CCR2/CCL2 dans la mise en place de l'immunosubversion dans les cancers. Ces connaissances permettront de mieux comprendre l'impact qu'aura le ciblage de cet axe dans le contexte de nouvelles stratégies anticancéreuses.

Bibliographie

Afik, R., Zigmond, E., Vugman, M., Klepfish, M., Shimshoni, E., Pasmanik-Chor, M., Shenoy, A., Bassat, E., Halpern, Z., Geiger, T., et al. (2016). Tumor macrophages are pivotal constructors of tumor collagenous matrix. J Exp Med 213, 2315-2331.

Akagi, T., Saitoh, T., O'Kelly, J., Akira, S., Gombart, A. F., and Koeffler, H. P. (2008). Impaired response to GM-CSF and G-CSF, and enhanced apoptosis in C/EBPbeta-deficient hematopoietic cells. Blood 111, 2999-3004.

Alizadeh, D., Katsanis, E., and Larmonier, N. (2014). Chemotherapeutic targeting of myeloid-derived suppressor cells. Oncoimmunology 3, e27359.

Andre, F., Escudier, B., Angevin, E., Tursz, T., and Zitvogel, L. (2004). Exosomes for cancer immunotherapy. Ann Oncol 15 Suppl 4, iv141-144.

Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Tesniere, A., Criollo, A., Ortiz, C., Lidereau, R., Mariette, C., Chaput, N., Mira, J. P., Delaloge, S., et al. (2007). The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy. Immunol Rev 220, 47-59.

Auffray, C., Fogg, D., Garfa, M., Elain, G., Join-Lambert, O., Kayal, S., Sarnacki, S., Cumano, A., Lauvau, G., and Geissmann, F. (2007). Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. Science 317, 666-670.

Baba, T., Badr Mel, S., Tomaru, U., Ishizu, A., and Mukaida, N. (2012). Novel process of intrathymic tumor-immune tolerance through CCR2-mediated recruitment of Sirpalpha+ dendritic cells: a murine model. PLoS One 7, e41154.

Bauer, C. A., Kim, E. Y., Marangoni, F., Carrizosa, E., Claudio, N. M., and Mempel, T. R. (2014). Dynamic Treg interactions with intratumoral APCs promote local CTL dysfunction. J Clin Invest 124, 2425-2440.

Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J. H., Lanier, L. L., and Spies, T. (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. Science 285, 727-729.

Bertolini, F., Paul, S., Mancuso, P., Monestiroli, S., Gobbi, A., Shaked, Y., and Kerbel, R. S. (2003). Maximum tolerable dose and low-dose metronomic chemotherapy have opposite effects on the mobilization and viability of circulating endothelial progenitor cells. Cancer Res 63, 4342-4346.

Besse, B., Charrier, M., Lapierre, V., Dansin, E., Lantz, O., Planchard, D., Le Chevalier, T., Livartoski, A., Barlesi, F., Laplanche, A., et al. (2016). Dendritic cell-derived exosomes as maintenance immunotherapy after first line chemotherapy in NSCLC. Oncoimmunology 5, e1071008.

Biswas, S. K., and Mantovani, A. (2010). Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. Nat Immunol 11, 889-896.

Blankenstein, T., Coulie, P. G., Gilboa, E., and Jaffee, E. M. (2012). The determinants of tumour immunogenicity. Nat Rev Cancer 12, 307-313.

Boissonnas, A., Fetler, L., Zeelenberg, I. S., Hugues, S., and Amigorena, S. (2007). In vivo imaging of cytotoxic T cell infiltration and elimination of a solid tumor. J Exp Med 204, 345-356.

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

Boissonnas, A., Scholer-Dahirel, A., Simon-Blancal, V., Pace, L., Valet, F., Kissenpfennig, A., Sparwasser, T., Malissen, B., Fetler, L., and Amigorena, S. (2010). Foxp3+ T cells induce perforin-dependent dendritic cell death in tumor-draining lymph nodes. Immunity 32, 266-278.

Boldajipour, B., Nelson, A., and Krummel, M. F. (2016). Tumor-infiltrating lymphocytes are dynamically desensitized to antigen but are maintained by homeostatic cytokine. JCI Insight 1, e89289.

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

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

Boussiotis, V. A. (2016). Molecular and Biochemical Aspects of the PD-1 Checkpoint Pathway. N Engl J Med 375, 1767-1778.

Bousso, P. (2008). T-cell activation by dendritic cells in the lymph node: lessons from the movies. Nat Rev Immunol 8, 675-684.

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

Braumuller, H., Wieder, T., Brenner, E., Assmann, S., Hahn, M., Alkhaled, M., Schilbach, K., Essmann, F., Kneilling, M., Griessinger, C., et al. (2013). T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. Nature 494, 361-365.

Breart, B., Lemaitre, F., Celli, S., and Bousso, P. (2008). Two-photon imaging of intratumoral CD8+ T cell cytotoxic activity during adoptive T cell therapy in mice. J Clin Invest 118, 1390-1397.

Briesemeister, D., Sommermeyer, D., Loddenkemper, C., Loew, R., Uckert, W., Blankenstein, T., and Kammertoens, T. (2011). Tumor rejection by local interferon gamma induction in established tumors is associated with blood vessel destruction and necrosis. Int J Cancer 128, 371-378.

Bronte, V., Brandau, S., Chen, S. H., Colombo, M. P., Frey, A. B., Greten, T. F., Mandruzzato, S., Murray, P. J., Ochoa, A., Ostrand-Rosenberg, S., et al. (2016). Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. Nat Commun 7, 12150.

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

Brooks, C. L., Schietinger, A., Borisova, S. N., Kufer, P., Okon, M., Hirama, T., Mackenzie, C. R., Wang, L. X., Schreiber, H., and Evans, S. V. (2010). Antibody recognition of a unique tumor-specific glycopeptide antigen. Proc Natl Acad Sci U S A 107, 10056-10061.

Broz, M. L., Binnewies, M., Boldajipour, B., Nelson, A. E., Pollack, J. L., Erle, D. J., Barczak, A., Rosenblum, M. D., Daud, A., Barber, D. L., et al. (2014). Dissecting the tumor myeloid compartment reveals rare activating antigen-presenting cells critical for T cell immunity. Cancer Cell 26, 638-652.

Bruchard, M., Mignot, G., Derangere, V., Chalmin, F., Chevriaux, A., Vegran, F., Boireau, W., Simon, B., Ryffel, B., Connat, J. L., et al. (2013). Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth. Nat Med 19, 57-64.

Bruhl, H., Cihak, J., Schneider, M. A., Plachy, J., Rupp, T., Wenzel, I., Shakarami, M., Milz, S., Ellwart, J. W., Stangassinger, M., et al. (2004). Dual role of CCR2 during initiation and progression of collagen-induced arthritis: evidence for regulatory activity of CCR2+ T cells. J Immunol 172, 890-898.

Buckanovich, R. J., Facciabene, A., Kim, S., Benencia, F., Sasaroli, D., Balint, K., Katsaros, D., O'Brien-Jenkins, A., Gimotty, P. A., and Coukos, G. (2008). Endothelin B receptor mediates the endothelial barrier to T cell homing to tumors and disables immune therapy. Nat Med 14, 28-36.

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

Carter, P. H., Brown, G. D., Cherney, R. J., Batt, D. G., Chen, J., Clark, C. M., Cvijic, M. E., Duncia, J. V., Ko, S. S., Mandlekar, S., et al. (2015). Discovery of a Potent and Orally Bioavailable Dual Antagonist of CC Chemokine Receptors 2 and 5. ACS Med Chem Lett 6, 439-444.

Casazza, A., Di Conza, G., Wenes, M., Finisguerra, V., Deschoemaeker, S., and Mazzone, M. (2014). Tumor stroma: a complexity dictated by the hypoxic tumor microenvironment. Oncogene 33, 1743-1754.

Castellino, F., Huang, A. Y., Altan-Bonnet, G., Stoll, S., Scheinecker, C., and Germain, R. N. (2006). Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8+ T cells to sites of CD4+ T cell-dendritic cell interaction. Nature 440, 890-895.

Chang, A. Y., Bhattacharya, N., Mu, J., Setiadi, A. F., Carcamo-Cavazos, V., Lee, G. H., Simons, D. L., Yadegarynia, S., Hemati, K., Kapelner, A., et al. (2013). Spatial organization of dendritic cells within tumor draining lymph nodes impacts clinical outcome in breast cancer patients. J Transl Med 11, 242.

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

Chaput, N., Darrasse-Jeze, G., Bergot, A. S., Cordier, C., Ngo-Abdalla, S., Klatzmann, D., and Azogui, O. (2007a). Regulatory T cells prevent CD8 T cell maturation by inhibiting CD4 Th cells at tumor sites. J Immunol 179, 4969-4978.

Chaput, N., De Botton, S., Obeid, M., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Panaretakis, T., Flament, C., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2007b). Molecular determinants of immunogenic cell death: surface exposure of calreticulin makes the difference. J Mol Med (Berl) 85, 1069-1076.

Chen, J., Ganguly, A., Mucsi, A. D., Meng, J., Yan, J., Detampel, P., Munro, F., Zhang, Z., Wu, M., Hari, A., et al. (2017). Strong adhesion by regulatory T cells induces dendritic cell cytoskeletal polarization and contact-dependent lethargy. J Exp Med 214, 327-338.

Chen, Q., Zhang, X. H., and Massague, J. (2011). Macrophage binding to receptor VCAM-1 transmits survival signals in breast cancer cells that invade the lungs. Cancer Cell 20, 538-549.

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

Chittezhath, M., Dhillon, M. K., Lim, J. Y., Laoui, D., Shalova, I. N., Teo, Y. L., Chen, J., Kamaraj, R., Raman, L., Lum, J., et al. (2014). Molecular profiling reveals a tumor-promoting phenotype of monocytes and macrophages in human cancer progression. Immunity 41, 815-829.

Chousterman, B. G., Boissonnas, A., Poupel, L., Baudesson de Chanville, C., Adam, J., Tabibzadeh, N., Licata, F., Lukaszewicz, A. C., Lombes, A., Deterre, P., et al. (2016). Ly6Chigh Monocytes Protect against Kidney Damage during Sepsis via a CX3CR1-Dependent Adhesion Mechanism. J Am Soc Nephrol 27, 792-803.

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

Colegio, O. R., Chu, N. Q., Szabo, A. L., Chu, T., Rhebergen, A. M., Jairam, V., Cyrus, N., Brokowski, C. E., Eisenbarth, S. C., Phillips, G. M., et al. (2014). Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. Nature 513, 559-563.

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

Corey, D. M., Rinkevich, Y., and Weissman, I. L. (2016). Dynamic Patterns of Clonal Evolution in Tumor Vasculature Underlie Alterations in Lymphocyte-Endothelial Recognition to Foster Tumor Immune Escape. Cancer Res 76, 1348-1353.

Cortez-Retamozo, V., Etzrodt, M., Newton, A., Rauch, P. J., Chudnovskiy, A., Berger, C., Ryan, R. J., Iwamoto, Y., Marinelli, B., Gorbatov, R., et al. (2012). Origins of tumor-associated macrophages and neutrophils. Proc Natl Acad Sci U S A 109, 2491-2496.

Corthay, A., Skovseth, D. K., Lundin, K. U., Rosjo, E., Omholt, H., Hofgaard, P. O., Haraldsen, G., and Bogen, B. (2005). Primary antitumor immune response mediated by CD4+ T cells. Immunity 22, 371-383.

Corzo, C. A., Condamine, T., Lu, L., Cotter, M. J., Youn, J. I., Cheng, P., Cho, H. I., Celis, E., Quiceno, D. G., Padhya, T., et al. (2010). HIF-1alpha regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. J Exp Med 207, 2439-2453.

Curiel, T. J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J. R., Zhang, L., Burow, M., et al. (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. Nat Med 10, 942-949.

Darrasse-Jeze, G., and Podsypanina, K. (2013). How numbers, nature, and immune status of foxp3(+) regulatory T-cells shape the early immunological events in tumor development. Front Immunol 4, 292.

Day, G. L., Blot, W. J., Shore, R. E., Schoenberg, J. B., Kohler, B. A., Greenberg, R. S., Liff, J. M., Preston-Martin, S., Austin, D. F., McLaughlin, J. K., and et al. (1994). Second cancers following oral and pharyngeal cancer: patients' characteristics and survival patterns. Eur J Cancer B Oral Oncol 30B, 381-386.

Deguine, J., Breart, B., Lemaitre, F., Di Santo, J. P., and Bousso, P. (2010). Intravital imaging reveals distinct dynamics for natural killer and CD8(+) T cells during tumor regression. Immunity 33, 632-644.

DeNardo, D. G., Brennan, D. J., Rexhepaj, E., Ruffell, B., Shiao, S. L., Madden, S. F., Gallagher, W. M., Wadhwani, N., Keil, S. D., Junaid, S. A., et al. (2011). Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. Cancer Discov 1, 54-67.

Desbois, M., Rusakiewicz, S., Locher, C., Zitvogel, L., and Chaput, N. (2012). Natural killer cells in non-hematopoietic malignancies. Front Immunol 3, 395.

Diefenbach, A., Jamieson, A. M., Liu, S. D., Shastri, N., and Raulet, D. H. (2000). Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. Nat Immunol 1, 119-126.

Dieu-Nosjean, M. C., Giraldo, N. A., Kaplon, H., Germain, C., Fridman, W. H., and Sautes-Fridman, C. (2016). Tertiary lymphoid structures, drivers of the anti-tumor responses in human cancers. Immunol Rev 271, 260-275.

Dijkgraaf, E. M., Heusinkveld, M., Tummers, B., Vogelpoel, L. T., Goedemans, R., Jha, V., Nortier, J. W., Welters, M. J., Kroep, J. R., and van der Burg, S. H. (2013). Chemotherapy alters monocyte differentiation to favor generation of cancer-supporting M2 macrophages in the tumor microenvironment. Cancer Res 73, 2480-2492.

Doedens, A. L., Stockmann, C., Rubinstein, M. P., Liao, D., Zhang, N., DeNardo, D. G., Coussens, L. M., Karin, M., Goldrath, A. W., and Johnson, R. S. (2010). Macrophage expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha suppresses T-cell function and promotes tumor progression. Cancer Res 70, 7465-7475.

Doyon, J., Coesemans, E., Boeckx, S., Buntinx, M., Hermans, B., Van Wauwe, J. P., Gilissen, R. A., De Groot, A. H., Corens, D., and Van Lommen, G. (2008). Discovery of potent, orally bioavailable small-molecule inhibitors of the human CCR2 receptor. ChemMedChem 3, 660-669.

Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Robbins, P. F., Yang, J. C., Hwu, P., Schwartzentruber, D. J., Topalian, S. L., Sherry, R., Restifo, N. P., Hubicki, A. M., et al. (2002). Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. Science 298, 850-854.

Durand, R. E. (1989). Synergism of cisplatin and mitomycin C in sensitive and resistant cell subpopulations of a tumor model. Int J Cancer 44, 911-917.

Dustin, M. L. (2004). Stop and go traffic to tune T cell responses. Immunity 21, 305-314.

Dutta, P., Hoyer, F. F., Grigoryeva, L. S., Sager, H. B., Leuschner, F., Courties, G., Borodovsky, A., Novobrantseva, T., Ruda, V. M., Fitzgerald, K., et al. (2015). Macrophages retain hematopoietic stem cells in the spleen via VCAM-1. J Exp Med 212, 497-512.

El Sharouni, S. Y., Kal, H. B., and Battermann, J. J. (2003). Accelerated regrowth of non-small-cell lung tumours after induction chemotherapy. Br J Cancer 89, 2184-2189.

Engelhardt, J. J., Boldajipour, B., Beemiller, P., Pandurangi, P., Sorensen, C., Werb, Z., Egeblad, M., and Krummel, M. F. (2012). Marginating dendritic cells of the tumor microenvironment cross-present tumor antigens and stably engage tumor-specific T cells. Cancer Cell 21, 402-417.

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

Francisco, L. M., Salinas, V. H., Brown, K. E., Vanguri, V. K., Freeman, G. J., Kuchroo, V. K., and Sharpe, A. H. (2009). PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. J Exp Med 206, 3015-3029.

Franciszkiewicz, K., Boissonnas, A., Boutet, M., Combadiere, C., and Mami-Chouaib, F. (2012). Role of chemokines and chemokine receptors in shaping the effector phase of the antitumor immune response. Cancer Res 72, 6325-6332.

Franciszkiewicz, K., Le Floc'h, A., Jalil, A., Vigant, F., Robert, T., Vergnon, I., Mackiewicz, A., Benihoud, K., Validire, P., Chouaib, S., et al. (2009). Intratumoral induction of CD103 triggers tumor-specific CTL function and CCR5-dependent T-cell retention. Cancer Res 69, 6249-6255.

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

Frantz, S., Hofmann, U., Fraccarollo, D., Schafer, A., Kranepuhl, S., Hagedorn, I., Nieswandt, B., Nahrendorf, M., Wagner, H., Bayer, B., et al. (2013). Monocytes/macrophages prevent healing defects and left ventricular thrombus formation after myocardial infarction. FASEB J 27, 871-881.

Fridlender, Z. G., Buchlis, G., Kapoor, V., Cheng, G., Sun, J., Singhal, S., Crisanti, M. C., Wang, L. C., Heitjan, D., Snyder, L. A., and Albelda, S. M. (2010). CCL2 blockade augments cancer immunotherapy. Cancer Res 70, 109-118.

Fridman, W. H., Dieu-Nosjean, M. C., Pages, F., Cremer, I., Damotte, D., Sautes-Fridman, C., and Galon, J. (2013). The immune microenvironment of human tumors: general significance and clinical impact. Cancer Microenviron 6, 117-122.

Friedl, P., and Brocker, E. B. (2000). The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. Cell Mol Life Sci 57, 41-64.

Friedl, P., Wolf, K., and Lammerding, J. (2011). Nuclear mechanics during cell migration. Curr Opin Cell Biol 23, 55-64.

Gabrilovich, D. I., and Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. Nat Rev Immunol 9, 162-174.

Gabrilovich, D. I., Ostrand-Rosenberg, S., and Bronte, V. (2012). Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. Nat Rev Immunol 12, 253-268.

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

Galon, J., Pages, F., Marincola, F. M., Thurin, M., Trinchieri, G., Fox, B. A., Gajewski, T. F., and Ascierto, P. A. (2012). The immune score as a new possible approach for the classification of cancer. J Transl Med 10, 1.

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

Gao, D., Vahdat, L. T., Wong, S., Chang, J. C., and Mittal, V. (2012). Microenvironmental regulation of epithelial-mesenchymal transitions in cancer. Cancer Res 72, 4883-4889.

Gardai, S. J., McPhillips, K. A., Frasch, S. C., Janssen, W. J., Starefeldt, A., Murphy-Ullrich, J. E., Bratton, D. L., Oldenborg, P. A., Michalak, M., and Henson, P. M. (2005). Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. Cell 123, 321-334.

Gerbitz, A., Sukumar, M., Helm, F., Wilke, A., Friese, C., Fahrenwaldt, C., Lehmann, F. M., Loddenkemper, C., Kammertoens, T., Mautner, J., et al. (2012). Stromal interferon-gamma signaling and cross-presentation are required to eliminate antigen-loss variants of B cell lymphomas in mice. PLoS One 7, e34552.

Germain, C., Gnjatic, S., Tamzalit, F., Knockaert, S., Remark, R., Goc, J., Lepelley, A., Becht, E., Katsahian, S., Bizouard, G., et al. (2014). Presence of B cells in tertiary lymphoid structures is associated with a protective immunity in patients with lung cancer. Am J Respir Crit Care Med 189, 832-844.

Ghiringhelli, F., Apetoh, L., Tesniere, A., Aymeric, L., Ma, Y., Ortiz, C., Vermaelen, K., Panaretakis, T., Mignot, G., Ullrich, E., et al. (2009). Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. Nat Med 15, 1170-1178.

Ghiringhelli, F., Puig, P. E., Roux, S., Parcellier, A., Schmitt, E., Solary, E., Kroemer, G., Martin, F., Chauffert, B., and Zitvogel, L. (2005). Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. J Exp Med 202, 919-929.

Gil-Bernabe, A. M., Ferjancic, S., Tlalka, M., Zhao, L., Allen, P. D., Im, J. H., Watson, K., Hill, S. A., Amirkhosravi, A., Francis, J. L., et al. (2012). Recruitment of monocytes/macrophages by tissue factor-mediated coagulation is essential for metastatic cell survival and premetastatic niche establishment in mice. Blood 119, 3164-3175.

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

Ginhoux, F., Schultze, J. L., Murray, P. J., Ochando, J., and Biswas, S. K. (2016). New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function. Nat Immunol 17, 34-40.

Gobert, M., Treilleux, I., Bendriss-Vermare, N., Bachelot, T., Goddard-Leon, S., Arfi, V., Biota, C., Doffin, A. C., Durand, I., Olive, D., et al. (2009). Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. Cancer Res 69, 2000-2009.

Goc, J., Germain, C., Vo-Bourgais, T. K., Lupo, A., Klein, C., Knockaert, S., de Chaisemartin, L., Ouakrim, H., Becht, E., Alifano, M., et al. (2014). Dendritic cells in tumor-associated tertiary lymphoid structures signal a Th1 cytotoxic immune contexture and license the positive prognostic value of infiltrating CD8+ T cells. Cancer Res 74, 705-715.

Godfrey, V. L., Wilkinson, J. E., Rinchik, E. M., and Russell, L. B. (1991). Fatal lymphoreticular disease in the scurfy (sf) mouse requires T cells that mature in a sf thymic environment: potential model for thymic education. Proc Natl Acad Sci U S A 88, 5528-5532.

Goel, S., Wong, A. H., and Jain, R. K. (2012). Vascular normalization as a therapeutic strategy for malignant and nonmalignant disease. Cold Spring Harb Perspect Med 2, a006486.

Gordon, S. (2002). Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. Cell 111, 927-930.

Gordon, S., and Martinez, F. O. (2010). Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. Immunity 32, 593-604.

Gosselin, D., Link, V. M., Romanoski, C. E., Fonseca, G. J., Eichenfield, D. Z., Spann, N. J., Stender, J. D., Chun, H. B., Garner, H., Geissmann, F., and Glass, C. K. (2014). Environment drives selection and function of enhancers controlling tissue-specific macrophage identities. Cell 159, 1327-1340.

Griffith, J. W., Sokol, C. L., and Luster, A. D. (2014). Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. Annu Rev Immunol 32, 659-702.

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

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

Guo, C., Yi, H., Yu, X., Hu, F., Zuo, D., Subjeck, J. R., and Wang, X. Y. (2012). Absence of scavenger receptor A promotes dendritic cell-mediated cross-presentation of cell-associated antigen and antitumor immune response. Immunol Cell Biol 90, 101-108.

Guy, C. T., Cardiff, R. D., and Muller, W. J. (1992). Induction of mammary tumors by expression of polyomavirus middle T oncogene: a transgenic mouse model for metastatic disease. Mol Cell Biol 12, 954-961.

Halle, S., Keyser, K. A., Stahl, F. R., Busche, A., Marquardt, A., Zheng, X., Galla, M., Heissmeyer, V., Heller, K., Boelter, J., et al. (2016). In Vivo Killing Capacity of Cytotoxic T Cells Is Limited and Involves Dynamic Interactions and T Cell Cooperativity. Immunity 44, 233-245.

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

Hamzah, J., Jugold, M., Kiessling, F., Rigby, P., Manzur, M., Marti, H. H., Rabie, T., Kaden, S., Grone, H. J., Hammerling, G. J., et al. (2008). Vascular normalization in Rgs5-deficient tumours promotes immune destruction. Nature 453, 410-414.

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

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

Herbst, R. S., Soria, J. C., Kowanetz, M., Fine, G. D., Hamid, O., Gordon, M. S., Sosman, J. A., McDermott, D. F., Powderly, J. D., Gettinger, S. N., et al. (2014). Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. Nature 515, 563-567.

Hettinger, J., Richards, D. M., Hansson, J., Barra, M. M., Joschko, A. C., Krijgsveld, J., and Feuerer, M. (2013). Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. Nat Immunol 14, 821-830.

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

Hoechst, B., Ormandy, L. A., Ballmaier, M., Lehner, F., Kruger, C., Manns, M. P., Greten, T. F., and Korangy, F. (2008). A new population of myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients induces CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells. Gastroenterology 135, 234-243.

Hong, S., Beja-Glasser, V. F., Nfonoyim, B. M., Frouin, A., Li, S., Ramakrishnan, S., Merry, K. M., Shi, Q., Rosenthal, A., Barres, B. A., et al. (2016). Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. Science 352, 712-716.

Huang, Y., Chen, H., Wang, J., Bunjhoo, H., Xiong, W., Xu, Y., and Zhao, J. (2013). Relationship between CCR2-V64I polymorphism and cancer risk: a meta-analysis. Gene 524, 54-58.

Hughes-Davies, L., Huntsman, D., Ruas, M., Fuks, F., Bye, J., Chin, S. F., Milner, J., Brown, L. A., Hsu, F., Gilks, B., et al. (2003). EMSY links the BRCA2 pathway to sporadic breast and ovarian cancer. Cell 115, 523-535.

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

Hugues, S., Scholer, A., Boissonnas, A., Nussbaum, A., Combadiere, C., Amigorena, S., and Fetler, L. (2007). Dynamic imaging of chemokine-dependent CD8+ T cell help for CD8+ T cell responses. Nat Immunol 8, 921-930.

Hung, K., Hayashi, R., Lafond-Walker, A., Lowenstein, C., Pardoll, D., and Levitsky, H. (1998). The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. J Exp Med 188, 2357-2368.

Huppa, J. B., Gleimer, M., Sumen, C., and Davis, M. M. (2003). Continuous T cell receptor signaling required for synapse maintenance and full effector potential. Nat Immunol 4, 749-755.

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

Jain, R. K. (2013). Normalizing tumor microenvironment to treat cancer: bench to bedside to biomarkers. J Clin Oncol 31, 2205-2218.

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

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

Josefowicz, S. Z., Lu, L. F., and Rudensky, A. Y. (2012). Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. Annu Rev Immunol 30, 531-564.

Joyce, J. A., and Fearon, D. T. (2015). T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. Science 348, 74-80.

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

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

Khallouf, H., Marten, A., Serba, S., Teichgraber, V., Buchler, M. W., Jager, D., and Schmidt, J. (2012). 5-Fluorouracil and interferon-alpha immunochemotherapy enhances immunogenicity of murine pancreatic cancer through upregulation of NKG2D ligands and MHC class I. J Immunother 35, 245-253.

Klarquist, J., Tobin, K., Farhangi Oskuei, P., Henning, S. W., Fernandez, M. F., Dellacecca, E. R., Navarro, F. C., Eby, J. M., Chatterjee, S., Mehrotra, S., et al. (2016). Ccl22 Diverts T Regulatory Cells and Controls the Growth of Melanoma. Cancer Res 76, 6230-6240.

Klemm, F., and Joyce, J. A. (2015). Microenvironmental regulation of therapeutic response in cancer. Trends Cell Biol 25, 198-213.

Klug, F., Prakash, H., Huber, P. E., Seibel, T., Bender, N., Halama, N., Pfirschke, C., Voss, R. H., Timke, C., Umansky, L., et al. (2013). Low-dose irradiation programs macrophage differentiation to an iNOS(+)/M1 phenotype that orchestrates effective T cell immunotherapy. Cancer Cell 24, 589-602.

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

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

Kumamoto, Y., Mattei, L. M., Sellers, S., Payne, G. W., and Iwasaki, A. (2011). CD4+ T cells support cytotoxic T lymphocyte priming by controlling lymph node input. Proc Natl Acad Sci U S A 108, 8749-8754.

Laoui, D., Keirsse, J., Morias, Y., Van Overmeire, E., Geeraerts, X., Elkrim, Y., Kiss, M., Bolli, E., Lahmar, Q., Sichien, D., et al. (2016). The tumour microenvironment harbours ontogenically distinct dendritic cell populations with opposing effects on tumour immunity. Nat Commun 7, 13720.

Lavergne, E., Combadiere, C., Iga, M., Boissonnas, A., Bonduelle, O., Maho, M., Debre, P., and Combadiere, B. (2004). Intratumoral CC chemokine ligand 5 overexpression delays tumor growth and increases tumor cell infiltration. J Immunol 173, 3755-3762.

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

Le, D. T., and Jaffee, E. M. (2012). Regulatory T-cell modulation using cyclophosphamide in vaccine approaches: a current perspective. Cancer Res 72, 3439-3444.

Leroi, N., Lallemand, F., Coucke, P., Noel, A., and Martinive, P. (2016). Impacts of Ionizing Radiation on the Different Compartments of the Tumor Microenvironment. Front Pharmacol 7, 78.

Levine, A. G., Arvey, A., Jin, W., and Rudensky, A. Y. (2014). Continuous requirement for the TCR in regulatory T cell function. Nat Immunol 15, 1070-1078.

Levine, A. G., Hemmers, S., Baptista, A. P., Schizas, M., Faire, M. B., Moltedo, B., Konopacki, C., Schmidt-Supprian, M., Germain, R. N., Treuting, P. M., and Rudensky, A. Y. (2017). Suppression of lethal autoimmunity by regulatory T cells with a single TCR specificity. J Exp Med.

Lim, K. P., Chun, N. A., Ismail, S. M., Abraham, M. T., Yusoff, M. N., Zain, R. B., Ngeow, W. C., Ponniah, S., and Cheong, S. C. (2014). CD4+CD25hiCD127low regulatory T cells are increased in oral squamous cell carcinoma patients. PLoS One 9, e103975.

Lim, S. Y., Yuzhalin, A. E., Gordon-Weeks, A. N., and Muschel, R. J. (2016). Targeting the CCL2-CCR2 signaling axis in cancer metastasis. Oncotarget 7, 28697-28710.

Lin, E. Y., Nguyen, A. V., Russell, R. G., and Pollard, J. W. (2001). Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. J Exp Med 193, 727-740.

Lin, E. Y., and Pollard, J. W. (2004). Macrophages: modulators of breast cancer progression. Novartis Found Symp 256, 158-168; discussion 168-172, 259-169.

Liu, S., Liu, D., Li, J., Zhang, D., and Chen, Q. (2016). Regulatory T cells in oral squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med 45, 635-639.

Liu, Z., Gerner, M. Y., Van Panhuys, N., Levine, A. G., Rudensky, A. Y., and Germain, R. N. (2015). Immune homeostasis enforced by co-localized effector and regulatory T cells. Nature 528, 225-230.

Lu, Y. C., Yao, X., Crystal, J. S., Li, Y. F., El-Gamil, M., Gross, C., Davis, L., Dudley, M. E., Yang, J. C., Samuels, Y., et al. (2014). Efficient identification of mutated cancer antigens recognized by T cells associated with durable tumor regressions. Clin Cancer Res 20, 3401-3410.

Lugade, A. A., Sorensen, E. W., Gerber, S. A., Moran, J. P., Frelinger, J. G., and Lord, E. M. (2008). Radiation-induced IFN-gamma production within the tumor microenvironment influences antitumor immunity. J Immunol 180, 3132-3139.

Ma, Y., Adjemian, S., Mattarollo, S. R., Yamazaki, T., Aymeric, L., Yang, H., Portela Catani, J. P., Hannani, D., Duret, H., Steegh, K., et al. (2013). Anticancer chemotherapy-induced intratumoral recruitment and differentiation of antigen-presenting cells. Immunity 38, 729-741.

Mantovani, A., Marchesi, F., Malesci, A., Laghi, L., and Allavena, P. (2017). Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. Nat Rev Clin Oncol.

Marigo, I., Zilio, S., Desantis, G., Mlecnik, B., Agnellini, A. H., Ugel, S., Sasso, M. S., Qualls, J. E., Kratochvill, F., Zanovello, P., et al. (2016). T Cell Cancer Therapy Requires CD40-CD40L Activation of Tumor Necrosis Factor and Inducible Nitric-Oxide-Synthase-Producing Dendritic Cells. Cancer Cell 30, 651.

Martinet, L., Garrido, I., Filleron, T., Le Guellec, S., Bellard, E., Fournie, J. J., Rochaix, P., and Girard, J. P. (2011). Human solid tumors contain high endothelial venules: association with T- and B-lymphocyte infiltration and favorable prognosis in breast cancer. Cancer Res 71, 5678-5687.

Marvel, D., and Gabrilovich, D. I. (2015). Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected. J Clin Invest 125, 3356-3364.

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

Matheu, M. P., Othy, S., Greenberg, M. L., Dong, T. X., Schuijs, M., Deswarte, K., Hammad, H., Lambrecht, B. N., Parker, I., and Cahalan, M. D. (2015). Imaging regulatory T cell dynamics and CTLA4-mediated suppression of T cell priming. Nat Commun 6, 6219.

Matsuoka, Y., Nakayama, H., Yoshida, R., Hirosue, A., Nagata, M., Tanaka, T., Kawahara, K., Sakata, J., Arita, H., Nakashima, H., et al. (2016). IL-6 controls resistance to radiation by suppressing oxidative stress via the Nrf2-antioxidant pathway in oral squamous cell carcinoma. Br J Cancer 115, 1234-1244.

Matsushima, K., Larsen, C. G., DuBois, G. C., and Oppenheim, J. J. (1989). Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line. J Exp Med 169, 1485-1490.

McKercher, S. R., Torbett, B. E., Anderson, K. L., Henkel, G. W., Vestal, D. J., Baribault, H., Klemsz, M., Feeney, A. J., Wu, G. E., Paige, C. J., and Maki, R. A. (1996). Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. EMBO J 15, 5647-5658.

Mellor, A. L., and Munn, D. H. (2004). IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. Nat Rev Immunol 4, 762-774.

Mildner, A., Yona, S., and Jung, S. (2013). A close encounter of the third kind: monocyte-derived cells. Adv Immunol 120, 69-103.

Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J., and Hill, A. M. (2000). M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. J Immunol 164, 6166-6173.

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

Mok, S., Koya, R. C., Tsui, C., Xu, J., Robert, L., Wu, L., Graeber, T. G., West, B. L., Bollag, G., and Ribas, A. (2014). Inhibition of CSF-1 receptor improves the antitumor efficacy of adoptive cell transfer immunotherapy. Cancer Res 74, 153-161.

Mondini, M., Nizard, M., Tran, T., Mauge, L., Loi, M., Clemenson, C., Dugue, D., Maroun, P., Louvet, E., Adam, J., et al. (2015). Synergy of Radiotherapy and a Cancer Vaccine for the Treatment of HPV-Associated Head and Neck Cancer. Mol Cancer Ther 14, 1336-1345.

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

Mori, K., Hiroi, M., Shimada, J., and Ohmori, Y. (2011). Infiltration of m2 tumor-associated macrophages in oral squamous cell carcinoma correlates with tumor malignancy. Cancers (Basel) 3, 3726-3739.

Motz, G. T., Santoro, S. P., Wang, L. P., Garrabrant, T., Lastra, R. R., Hagemann, I. S., Lal, P., Feldman, M. D., Benencia, F., and Coukos, G. (2014). Tumor endothelium FasL establishes a selective immune barrier promoting tolerance in tumors. Nat Med 20, 607-615.

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

Mrass, P., Kinjyo, I., Ng, L. G., Reiner, S. L., Pure, E., and Weninger, W. (2008). CD44 mediates successful interstitial navigation by killer T cells and enables efficient antitumor immunity. Immunity 29, 971-985.

Mrass, P., Takano, H., Ng, L. G., Daxini, S., Lasaro, M. O., Iparraguirre, A., Cavanagh, L. L., von Andrian, U. H., Ertl, H. C., Haydon, P. G., and Weninger, W. (2006). Random migration precedes stable target cell interactions of tumor-infiltrating T cells. J Exp Med 203, 2749-2761.

Muller, A., Brandenburg, S., Turkowski, K., Muller, S., and Vajkoczy, P. (2015). Resident microglia, and not peripheral macrophages, are the main source of brain tumor mononuclear cells. Int J Cancer 137, 278-288.

Mullins, I. M., Slingluff, C. L., Lee, J. K., Garbee, C. F., Shu, J., Anderson, S. G., Mayer, M. E., Knaus, W. A., and Mullins, D. W. (2004). CXC chemokine receptor 3 expression by activated CD8+ T cells is associated with survival in melanoma patients with stage III disease. Cancer Res 64, 7697-7701.

Munn, D. H., and Mellor, A. L. (2006). The tumor-draining lymph node as an immune-privileged site. Immunol Rev 213, 146-158.

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

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

Noman, M. Z., Desantis, G., Janji, B., Hasmim, M., Karray, S., Dessen, P., Bronte, V., and Chouaib, S. (2014). PD-L1 is a novel direct target of HIF-1alpha, and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. J Exp Med 211, 781-790.

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

O'Connor, T., Borsig, L., and Heikenwalder, M. (2015). CCL2-CCR2 Signaling in Disease Pathogenesis. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets 15, 105-118.

Obeid, M., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Fimia, G. M., Apetoh, L., Perfettini, J. L., Castedo, M., Mignot, G., Panaretakis, T., Casares, N., et al. (2007). Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. Nat Med 13, 54-61.

Onizuka, S., Tawara, I., Shimizu, J., Sakaguchi, S., Fujita, T., and Nakayama, E. (1999). Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. Cancer Res 59, 3128-3133.

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

Pacholczyk, R., Kern, J., Singh, N., Iwashima, M., Kraj, P., and Ignatowicz, L. (2007). Nonself-antigens are the cognate specificities of Foxp3+ regulatory T cells. Immunity 27, 493-504.

Pardoll, D. M., and Topalian, S. L. (1998). The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity. Curr Opin Immunol 10, 588-594.

Parker, K. H., Beury, D. W., and Ostrand-Rosenberg, S. (2015). Myeloid-Derived Suppressor Cells: Critical Cells Driving Immune Suppression in the Tumor Microenvironment. Adv Cancer Res 128, 95-139.

Peranzoni, E., Rivas-Caicedo, A., Bougherara, H., Salmon, H., and Donnadieu, E. (2013). Positive and negative influence of the matrix architecture on antitumor immune surveillance. Cell Mol Life Sci 70, 4431-4448.

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

Perez-Diez, D., Salgado-Fernandez, J., Vazquez-Gonzalez, N., Calvino-Santos, R., Vazquez-Rodriguez, J. M., Aldama-Lopez, G., Garcia-Barreiro, J. J., and Castro-Beiras, A. (2007). Images in cardiovascular medicine. Percutaneous retrieval of a lost guidewire that caused cardiac tamponade. Circulation 115, e629-631.

Persa, E., Balogh, A., Safrany, G., and Lumniczky, K. (2015). The effect of ionizing radiation on regulatory T cells in health and disease. Cancer Lett 368, 252-261.

Pilon-Thomas, S., Mackay, A., Vohra, N., and Mule, J. J. (2010). Blockade of programmed death ligand 1 enhances the therapeutic efficacy of combination immunotherapy against melanoma. J Immunol 184, 3442-3449.

Pitt, J. M., Charrier, M., Viaud, S., Andre, F., Besse, B., Chaput, N., and Zitvogel, L. (2014). Dendritic cell-derived exosomes as immunotherapies in the fight against cancer. J Immunol 193, 1006-1011.

Platzer, B., Stout, M., and Fiebiger, E. (2014). Antigen cross-presentation of immune complexes. Front Immunol 5, 140.

Powles, T., Eder, J. P., Fine, G. D., Braiteh, F. S., Loriot, Y., Cruz, C., Bellmunt, J., Burris, H. A., Petrylak, D. P., Teng, S. L., et al. (2014). MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. Nature 515, 558-562.

Qian, B. Z., Li, J., Zhang, H., Kitamura, T., Zhang, J., Campion, L. R., Kaiser, E. A., Snyder, L. A., and Pollard, J. W. (2011). CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. Nature 475, 222-225.

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

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

Quail, D. F., and Joyce, J. A. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. Nat Med 19, 1423-1437.

Raulet, D. H., Gasser, S., Gowen, B. G., Deng, W., and Jung, H. (2013). Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. Annu Rev Immunol 31, 413-441.

Reinhold, M. I., Lindberg, F. P., Plas, D., Reynolds, S., Peters, M. G., and Brown, E. J. (1995). In vivo expression of alternatively spliced forms of integrin-associated protein (CD47). J Cell Sci 108 (Pt 11), 3419-3425.

Roberts, E. W., Broz, M. L., Binnewies, M., Headley, M. B., Nelson, A. E., Wolf, D. M., Kaisho, T., Bogunovic, D., Bhardwaj, N., and Krummel, M. F. (2016). Critical Role for CD103(+)/CD141(+) Dendritic Cells Bearing CCR7 for Tumor Antigen Trafficking and Priming of T Cell Immunity in Melanoma. Cancer Cell 30, 324-336.

Rodriguez, P. C., and Ochoa, A. C. (2008). Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. Immunol Rev 222, 180-191.

Rollins, B. J. (1997). Chemokines. Blood 90, 909-928.

Rosenberg, S. A., and Restifo, N. P. (2015). Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. Science 348, 62-68.

Rosenberg, S. A., Sherry, R. M., Morton, K. E., Scharfman, W. J., Yang, J. C., Topalian, S. L., Royal, R. E., Kammula, U., Restifo, N. P., Hughes, M. S., et al. (2005). Tumor progression can occur despite the induction of very high levels of self/tumor antigen-specific CD8+ T cells in patients with melanoma. J Immunol 175, 6169-6176.

Roychoudhuri, R., Eil, R. L., and Restifo, N. P. (2015). The interplay of effector and regulatory T cells in cancer. Curr Opin Immunol 33, 101-111.

Ruan, H., Hao, S., Young, P., and Zhang, H. (2015). Targeting Cathepsin B for Cancer Therapies. Horiz Cancer Res 56, 23-40.

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

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

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

Salmon, H., Franciszkiewicz, K., Damotte, D., Dieu-Nosjean, M. C., Validire, P., Trautmann, A., Mami-Chouaib, F., and Donnadieu, E. (2012). Matrix architecture defines the preferential localization and migration of T cells into the stroma of human lung tumors. J Clin Invest 122, 899-910.

Sanders, S. K., Crean, S. M., Boxer, P. A., Kellner, D., LaRosa, G. J., and Hunt, S. W., 3rd (2000). Functional differences between monocyte chemotactic protein-1 receptor A and monocyte chemotactic protein-1 receptor B expressed in a Jurkat T cell. J Immunol 165, 4877-4883.

Sangaletti, S., Di Carlo, E., Gariboldi, S., Miotti, S., Cappetti, B., Parenza, M., Rumio, C., Brekken, R. A., Chiodoni, C., and Colombo, M. P. (2008). Macrophage-derived SPARC bridges tumor cell-extracellular matrix interactions toward metastasis. Cancer Res 68, 9050-9059.

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

Sauter, K. A., Pridans, C., Sehgal, A., Tsai, Y. T., Bradford, B. M., Raza, S., Moffat, L., Gow, D. J., Beard, P. M., Mabbott, N. A., et al. (2014b). Pleiotropic effects of extended blockade of CSF1R signaling in adult mice. J Leukoc Biol 96, 265-274.

Savina, A., Jancic, C., Hugues, S., Guermonprez, P., Vargas, P., Moura, I. C., Lennon-Dumenil, A. M., Seabra, M. C., Raposo, G., and Amigorena, S. (2006). NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells. Cell 126, 205-218.

Schietinger, A., Arina, A., Liu, R. B., Wells, S., Huang, J., Engels, B., Bindokas, V., Bartkowiak, T., Lee, D., Herrmann, A., et al. (2013). Longitudinal confocal microscopy imaging of solid tumor destruction following adoptive T cell transfer. Oncoimmunology 2, e26677.

Scholer, A., Hugues, S., Boissonnas, A., Fetler, L., and Amigorena, S. (2008). Intercellular adhesion molecule-1-dependent stable interactions between T cells and dendritic cells determine CD8+ T cell memory. Immunity 28, 258-270.

Schumacher, T. N., and Schreiber, R. D. (2015). Neoantigens in cancer immunotherapy. Science 348, 69-74.

Segura, E., Kapp, E., Gupta, N., Wong, J., Lim, J., Ji, H., Heath, W. R., Simpson, R., and Villadangos, J. A. (2010). Differential expression of pathogen-recognition molecules between dendritic cell subsets revealed by plasma membrane proteomic analysis. Mol Immunol 47, 1765-1773.

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

Shaked, Y., and Kerbel, R. S. (2007). Antiangiogenic strategies on defense: on the possibility of blocking rebounds by the tumor vasculature after chemotherapy. Cancer Res 67, 7055-7058.

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

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

Sharma, S., Dubinett, S., and Salgia, R. (2012). CD14(+)S100A9(+) myeloid-derived suppressor cells portend decreased survival in patients with advanced lung cancer. Am J Respir Crit Care Med 186, 940-941.

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

Shimizu, J., Yamazaki, S., and Sakaguchi, S. (1999). Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. J Immunol 163, 5211-5218.

Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K. P., Oltz, E. M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., Stall, A. M., and et al. (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. Cell 68, 855-867.

Sistigu, A., Yamazaki, T., Vacchelli, E., Chaba, K., Enot, D. P., Adam, J., Vitale, I., Goubar, A., Baracco, E. E., Remedios, C., et al. (2014). Cancer cell-autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy. Nat Med 20, 1301-1309.

Smyth, M. J., Crowe, N. Y., and Godfrey, D. I. (2001). NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. Int Immunol 13, 459-463.

Solito, S., Marigo, I., Pinton, L., Damuzzo, V., Mandruzzato, S., and Bronte, V. (2014). Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity in human cancers. Ann N Y Acad Sci 1319, 47-65.

Spiotto, M. T., Rowley, D. A., and Schreiber, H. (2004). Bystander elimination of antigen loss variants in established tumors. Nat Med 10, 294-298.

Stamatiades, E. G., Tremblay, M. E., Bohm, M., Crozet, L., Bisht, K., Kao, D., Coelho, C., Fan, X., Yewdell, W. T., Davidson, A., et al. (2016). Immune Monitoring of Trans-endothelial Transport by Kidney-Resident Macrophages. Cell 166, 991-1003.

Street, S. E., Trapani, J. A., MacGregor, D., and Smyth, M. J. (2002). Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma. J Exp Med 196, 129-134.

Sun, T., Mary, L. G., Oh, W. K., Freedman, M. L., Pomerantz, M., Pienta, K. J., and Kantoff, P. W. (2011). Inherited variants in the chemokine CCL2 gene and prostate cancer aggressiveness in a Caucasian cohort. Clin Cancer Res 17, 1546-1552.

Swirski, F. K., Nahrendorf, M., Etzrodt, M., Wildgruber, M., Cortez-Retamozo, V., Panizzi, P., Figueiredo, J. L., Kohler, R. H., Chudnovskiy, A., Waterman, P., et al. (2009). Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. Science 325, 612-616.

Tadokoro, C. E., Shakhar, G., Shen, S., Ding, Y., Lino, A. C., Maraver, A., Lafaille, J. J., and Dustin, M. L. (2006). Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo. J Exp Med 203, 505-511.

Takeshima, T., Chamoto, K., Wakita, D., Ohkuri, T., Togashi, Y., Shirato, H., Kitamura, H., and Nishimura, T. (2010). Local radiation therapy inhibits tumor growth through the generation of tumor-specific CTL: its potentiation by combination with Th1 cell therapy. Cancer Res 70, 2697-2706.

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

Thomas, G. D., Hanna, R. N., Vasudevan, N. T., Hamers, A. A., Romanoski, C. E., McArdle, S., Ross, K. D., Blatchley, A., Yoakum, D., Hamilton, B. A., et al. (2016). Deleting an Nr4a1 Super-Enhancer Subdomain Ablates Ly6Clow Monocytes while Preserving Macrophage Gene Function. Immunity 45, 975-987.

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

Tiemessen, M. M., Jagger, A. L., Evans, H. G., van Herwijnen, M. J., John, S., and Taams, L. S. (2007). CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A 104, 19446-19451.

Topalian, S. L., Drake, C. G., and Pardoll, D. M. (2015). Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. Cancer Cell 27, 450-461.

Tsaur, I., Noack, A., Makarevic, J., Oppermann, E., Waaga-Gasser, A. M., Gasser, M., Borgmann, H., Huesch, T., Gust, K. M., Reiter, M., et al. (2015). CCL2 Chemokine as a Potential Biomarker for Prostate Cancer: A Pilot Study. Cancer Res Treat 47, 306-312.

Tsou, C. L., Peters, W., Si, Y., Slaymaker, S., Aslanian, A. M., Weisberg, S. P., Mack, M., and Charo, I. F. (2007). Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. J Clin Invest 117, 902-909.

Tumeh, P. C., Harview, C. L., Yearley, J. H., Shintaku, I. P., Taylor, E. J., Robert, L., Chmielowski, B., Spasic, M., Henry, G., Ciobanu, V., et al. (2014). PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. Nature 515, 568-571.

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

Vacchelli, E., Enot, D. P., Pietrocola, F., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2016). Impact of Pattern Recognition Receptors on the Prognosis of Breast Cancer Patients Undergoing Adjuvant Chemotherapy. Cancer Res 76, 3122-3126.

Vacchelli, E., Ma, Y., Baracco, E. E., Sistigu, A., Enot, D. P., Pietrocola, F., Yang, H., Adjemian, S., Chaba, K., Semeraro, M., et al. (2015). Chemotherapy-induced antitumor immunity requires formyl peptide receptor 1. Science 350, 972-978.

Vahl, J. C., Drees, C., Heger, K., Heink, S., Fischer, J. C., Nedjic, J., Ohkura, N., Morikawa, H., Poeck, H., Schallenberg, S., et al. (2014). Continuous T cell receptor signals maintain a functional regulatory T cell pool. Immunity 41, 722-736.

Valerie, K., Yacoub, A., Hagan, M. P., Curiel, D. T., Fisher, P. B., Grant, S., and Dent, P. (2007). Radiation-induced cell signaling: inside-out and outside-in. Mol Cancer Ther 6, 789-801.

Valkovic, T., Lucin, K., Krstulja, M., Dobi-Babic, R., and Jonjic, N. (1998). Expression of monocyte chemotactic protein-1 in human invasive ductal breast cancer. Pathol Res Pract 194, 335-340.

van den Broek, M. E., Kagi, D., Ossendorp, F., Toes, R., Vamvakas, S., Lutz, W. K., Melief, C. J., Zinkernagel, R. M., and Hengartner, H. (1996). Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. J Exp Med 184, 1781-1790.

van Furth, R., and Cohn, Z. A. (1968). The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. J Exp Med 128, 415-435.

van Mierlo, G. J., Boonman, Z. F., Dumortier, H. M., den Boer, A. T., Fransen, M. F., Nouta, J., van der Voort, E. I., Offringa, R., Toes, R. E., and Melief, C. J. (2004). Activation of dendritic cells that cross-present tumor-derived antigen licenses CD8+ CTL to cause tumor eradication. J Immunol 173, 6753-6759.

Varol, C., Landsman, L., Fogg, D. K., Greenshtein, L., Gildor, B., Margalit, R., Kalchenko, V., Geissmann, F., and Jung, S. (2007). Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. J Exp Med 204, 171-180.

Verdegaal, E. M., de Miranda, N. F., Visser, M., Harryvan, T., van Buuren, M. M., Andersen, R. S., Hadrup, S. R., van der Minne, C. E., Schotte, R., Spits, H., et al. (2016). Neoantigen landscape dynamics during human melanoma-T cell interactions. Nature 536, 91-95.

Vetsika, E. K., Koinis, F., Gioulbasani, M., Aggouraki, D., Koutoulaki, A., Skalidaki, E., Mavroudis, D., Georgoulias, V., and Kotsakis, A. (2014). A circulating subpopulation of monocytic myeloid-derived suppressor cells as an independent prognostic/predictive factor in untreated non-small lung cancer patients. J Immunol Res 2014, 659294.

Vignali, D. A., Collison, L. W., and Workman, C. J. (2008). How regulatory T cells work. Nat Rev Immunol 8, 523-532.

Villablanca, E. J., Raccosta, L., Zhou, D., Fontana, R., Maggioni, D., Negro, A., Sanvito, F., Ponzoni, M., Valentinis, B., Bregni, M., et al. (2010). Tumor-mediated liver X receptor-alpha activation inhibits CC chemokine receptor-7 expression on dendritic cells and dampens antitumor responses. Nat Med 16, 98-105.

Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V. E., Zhou, S., Diaz, L. A., Jr., and Kinzler, K. W. (2013). Cancer genome landscapes. Science 339, 1546-1558.

Wang, X., Yang, X., Tsai, Y., Yang, L., Chuang, K. H., Keng, P. C., Lee, S. O., and Chen, Y. (2017). IL-6 Mediates Macrophage Infiltration after Irradiation via Up-regulation of CCL2/CCL5 in Non-small Cell Lung Cancer. Radiat Res 187, 50-59.

Weiskopf, K., Jahchan, N. S., Schnorr, P. J., Cristea, S., Ring, A. M., Maute, R. L., Volkmer, A. K., Volkmer, J. P., Liu, J., Lim, J. S., et al. (2016). CD47-blocking immunotherapies stimulate macrophage-mediated destruction of small-cell lung cancer. J Clin Invest 126, 2610-2620.

Welford, A. F., Biziato, D., Coffelt, S. B., Nucera, S., Fisher, M., Pucci, F., Di Serio, C., Naldini, L., De Palma, M., Tozer, G. M., and Lewis, C. E. (2011). TIE2-expressing macrophages limit the therapeutic efficacy of the vascular-disrupting agent combretastatin A4 phosphate in mice. J Clin Invest 121, 1969-1973.

Whilding, L. M., and Maher, J. (2015). CAR T-cell immunotherapy: The path from the by-road to the freeway? Mol Oncol 9, 1994-2018.

Wiedemann, A., Depoil, D., Faroudi, M., and Valitutti, S. (2006). Cytotoxic T lymphocytes kill multiple targets simultaneously via spatiotemporal uncoupling of lytic and stimulatory synapses. Proc Natl Acad Sci U S A 103, 10985-10990.

Wiktor-Jedrzejczak, W., Bartocci, A., Ferrante, A. W., Jr., Ahmed-Ansari, A., Sell, K. W., Pollard, J. W., and Stanley, E. R. (1990). Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse. Proc Natl Acad Sci U S A 87, 4828-4832.

Willimsky, G., and Blankenstein, T. (2005). Sporadic immunogenic tumours avoid destruction by inducing T-cell tolerance. Nature 437, 141-146.

Wilson, W. R., and Hay, M. P. (2011). Targeting hypoxia in cancer therapy. Nat Rev Cancer 11, 393-410.

Wolf, K., Muller, R., Borgmann, S., Brocker, E. B., and Friedl, P. (2003). Amoeboid shape change and contact guidance: T-lymphocyte crawling through fibrillar collagen is independent of matrix remodeling by MMPs and other proteases. Blood 102, 3262-3269.

Wyckoff, J., Wang, W., Lin, E. Y., Wang, Y., Pixley, F., Stanley, E. R., Graf, T., Pollard, J. W., Segall, J., and Condeelis, J. (2004). A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. Cancer Res 64, 7022-7029.

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

Wynn, T. A., Chawla, A., and Pollard, J. W. (2013). Macrophage biology in development, homeostasis and disease. Nature 496, 445-455.

Xiong, W., Frasch, S. C., Thomas, S. M., Bratton, D. L., and Henson, P. M. (2013). Induction of TGF-beta1 synthesis by macrophages in response to apoptotic cells requires activation of the scavenger receptor CD36. PLoS One 8, e72772.

Xu, X., Rao, G. S., Groh, V., Spies, T., Gattuso, P., Kaufman, H. L., Plate, J., and Prinz, R. A. (2011). Major histocompatibility complex class I-related chain A/B (MICA/B) expression in tumor tissue and serum of pancreatic cancer: role of uric acid accumulation in gemcitabine-induced MICA/B expression. BMC Cancer 11, 194.

Xue, J., Schmidt, S. V., Sander, J., Draffehn, A., Krebs, W., Quester, I., De Nardo, D., Gohel, T. D., Emde, M., Schmidleithner, L., et al. (2014). Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. Immunity 40, 274-288.

Yan, J., Liu, B., Shi, Y., and Qi, H. (2017). Class II MHC-independent suppressive adhesion of dendritic cells by regulatory T cells in vivo. J Exp Med 214, 319-326.

Yeamans, C., Wang, D., Paz-Priel, I., Torbett, B. E., Tenen, D. G., and Friedman, A. D. (2007). C/EBPalpha binds and activates the PU.1 distal enhancer to induce monocyte lineage commitment. Blood 110, 3136-3142.

Yona, S., Kim, K. W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Guilliams, M., Misharin, A., et al. (2013). Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. Immunity 38, 79-91.

Yoshimura, T., Robinson, E. A., Tanaka, S., Appella, E., Kuratsu, J., and Leonard, E. J. (1989). Purification and amino acid analysis of two human glioma-derived monocyte chemoattractants. J Exp Med 169, 1449-1459.

Younis, R. H., Han, K. L., and Webb, T. J. (2016). Human Head and Neck Squamous Cell Carcinoma-Associated Semaphorin 4D Induces Expansion of Myeloid-Derived Suppressor Cells. J Immunol 196, 1419-1429.

Zhang, B., Karrison, T., Rowley, D. A., and Schreiber, H. (2008). IFN-gamma- and TNF-dependent bystander eradication of antigen-loss variants in established mouse cancers. J Clin Invest 118, 1398-1404.

Zhang, J., Patel, L., and Pienta, K. J. (2010). Targeting chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) as an example of translation of cancer molecular biology to the clinic. Prog Mol Biol Transl Sci 95, 31-53.

Zhang, L., Conejo-Garcia, J. R., Katsaros, D., Gimotty, P. A., Massobrio, M., Regnani, G., Makrigiannakis, A., Gray, H., Schlienger, K., Liebman, M. N., et al. (2003). Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. N Engl J Med 348, 203-213.

Zhang, L., Liu, W., Alizadeh, D., Zhao, D., Farrukh, O., Lin, J., Badie, S. A., and Badie, B. (2011). S100B attenuates microglia activation in gliomas: possible role of STAT3 pathway. Glia 59, 486-498.

Zhang, N., Schroppel, B., Lal, G., Jakubzick, C., Mao, X., Chen, D., Yin, N., Jessberger, R., Ochando, J. C., Ding, Y., and Bromberg, J. S. (2009). Regulatory T cells sequentially migrate from inflamed tissues to draining lymph nodes to suppress the alloimmune response. Immunity 30, 458-469.

Zhang, Q. W., Liu, L., Gong, C. Y., Shi, H. S., Zeng, Y. H., Wang, X. Z., Zhao, Y. W., and Wei, Y. Q. (2012). Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature. PLoS One 7, e50946.

Zhao, S., Jiang, T., Zhang, L., Yang, H., Liu, X., Jia, Y., and Zhou, C. (2016). Clinicopathological and prognostic significance of regulatory T cells in patients with non-small cell lung cancer: A systematic review with meta-analysis. Oncotarget 7, 36065-36073.

Zheng, Y., Qin, L., Zacarias, N. V., de Vries, H., Han, G. W., Gustavsson, M., Dabros, M., Zhao, C., Cherney, R. J., Carter, P., et al. (2016). Structure of CC chemokine receptor 2 with orthosteric and allosteric antagonists. Nature 540, 458-461.

Zomer, A., Maynard, C., Verweij, F. J., Kamermans, A., Schafer, R., Beerling, E., Schiffelers, R. M., de Wit, E., Berenguer, J., Ellenbroek, S. I., et al. (2015). In Vivo imaging reveals extracellular vesicle-mediated phenocopying of metastatic behavior. Cell 161, 1046-1057.