

Fonctions associées au chimiotactisme	40
Fonctions du couple CX3CL1/ CX3CR1	41
D Chimioquinas et cancer	42
Chimioquinas, transformation cellulaire et croissance tumorale	43
Chimioquinas et formation de métastases.....	45
Implication du couple CX3CL1/CX3CR1.....	48
E Agonistes /Antagonistes des chimioquinas et de leurs récepteurs	52
II INTERACTIONS ENTRE LE SYSTEME IMMUNITAIRE ET LES TUMEURS	55
A La réponse immune antitumorale	55
B Rôle pro tumoral du système immunitaire	62
Les lymphocytes T régulateurs.....	62
Les macrophages associés aux tumeurs (TAMs).....	64
TAMs et contrôle de la croissance tumorale	65
Implication de CCR2 sur la mobilisation des TAMs	67
Les cellules Myéloïdes suppressives	67
C Chimiothérapie et immuno modulation	71
III DEVELOPPEMENT ET FONCTIONS DU SYSTEME MONOCYTAIRE	74
A La Moelle osseuse	74
Structure et fonction de la moelle osseuse	75
Le cadre osseux et les cellules fonctionnelles.....	75
Le compartiment vasculaire	76
Le microenvironnement médullaire myéloïde.....	76
Le parenchyme hématopoïétique	78
Etude morphologique et fonctionnelle de la moelle osseuse par imagerie dynamique	79
Anatomie du réseau médullaire de l'os crânien	81
Chimioquinas et molécules d'adhésion dans la moelle osseuse	83
B Les monocytes.....	84
Origine et différenciation des monocytes.....	84
Ontogénie des monocytes	84
Cytokine et développement monocyttaire	85

Caractérisation et propriétés fonctionnelles des monocytes	86
Monocytes Ly6-C ^{high} « monocytes classiques ou inflammatoires »	86
Propriétés fonctionnelles de monocytes Ly6-C ^{high} et rôle de CCR2	87
Monocytes Ly6-C ^{low/-} ou « résidents »	88
Propriétés fonctionnelles des monocytes Ly6-C ^{low/-} et rôle CX3CR1.....	88
Relation entre les monocytes Ly6-C ^{high} et Ly6-C ^{low}	89
Différenciation et plasticité des monocytes	91
Différenciation en DCs.....	91
Différenciation en macrophage	92
Environnement cytokinique et polarisation monocyttaire	92
Caractérisation des monocytes humains	95
Les monocytes CD14 ⁺ CD16 ⁻ CCR2 ⁺ CX3CR1 ^{low}	95
Monocytes CD14 ⁺ CD16 ⁺ CX3CR1 ^{high} CCR2 ^{low}	95
Monocytes CD14 ^{dim} CD16 ⁺ LFA-1 ⁺	95
IV OBJECTIF DE LA THESE.....	97
RESULTATS	99
1-Impact de la chimiothérapie anti tumorale sur les populations myéloïdes.	99
Article 1	101
Résultats complémentaires.....	102
2-Etudes des mécanismes chimiokines impliqués dans la mobilisation monocyttaire au cours de la chimiothérapie.....	105
Article 2	108
Discussion	109
CONCLUSIONS.....	122
BIBLIOGRAPHIE	124

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier les membres de mon jury le Dr Claude Leclerc et le Dr Gwendal Lazennec de m'avoir fait l'honneur d'évaluer mon manuscrit ainsi que mon travail.

Je voudrais ensuite remercier le Professeur Olivier Hermine d'avoir accepté de faire partie de mon jury. Olivier ta présence a une importance toute particulière pour moi.

Je voudrais également remercier mon Directeur de thèse, le Dr Christophe Combadière, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail et d'avoir fait le nécessaire pour que tout se déroule pour le mieux. Je voudrais, bien sûr, remercier Le Dr Alexandre BOISSONNAS pour son encadrement de proximité, sa grande patience ainsi que le sang froid dont il a su faire preuve face à mes nombreuses angoisses. J'ai passé de très bons moments à tes côtés merci aussi pour cela.

Je ne pourrais oublier Marie Ange et Pascale qui ont été de très très loin les personnes les plus précieuses pour moi durant ces trois dernières années. Marie Ange tu n'es pas de ce monde les mots me manquent pour décrire à quel point j'ai apprécié ton aide, ton soutien du regard, ta gentillesse, ton humilité bref ton humanité MERCI, MERCI, MERCI. Pascale je me souviendrai de ta gentillesse, ton attention et ton écoute. Je me souviendrai aussi Mesdames à quel point votre travail et votre écoute m'ont simplifié la vie, merci encore.

Il faut aussi remercier l'équipe de C.Combadière, une équipe trop LOL, et chaleureuse. Plus particulièrement, je voudrais remercier Virginie Felouzis pour sa gentillesse, Marie Christelle pour ses petites attentions et sa bonne humeur quotidienne. Je remercie aussi Fabrice Licata pour son soutien technique.

Je voudrais également remercier le reste du 6^e Etage en rendant au passage un hommage aux Beruriers, porteurs de valeurs d'une époque révolue. Je voudrais donc ainsi remercier toutes ces personnes qui m'ont fait apprécier mon séjour dans ces locaux sinistres. Merci à toi Darragh Duffy, merci pour ton fidelity ! Merci à toi Nora Yahia, merci à toi Sophie, merci à toi Marion, merci à toi Louis, merci à toi François, merci à toi Mélody, merci à toi insanity. Merci à toi Victor Appay, Merci, merci à toi Delphine Saucé de ne pas m'avoir assaisonné, merci à toi Solène, merci à toi Tiphaine, merci à toi Olivia merci aussi pour tes petits plats. Merci à toi Antoine Roux même si concernant l'OM tu n'as aucun goût. Merci à toi Gisèle,

merci pour ton rhume éternel. Merci à toi Arnaud Morris, merci à toi Sylvain, merci à toi Alexandra, merci à toi S Graff du Bois, Merci à toi Pierre-Grégoire merci à toi aussi Julian. Merci à toi Julien Guernon même si t'es pas vraiment breton, merci à toi Céline, merci à toi Amandine merci à toi Yoan d'avoir ressuscité George Michael. Merci à toi Karim Dorgham, merci à toi Cervi, merci à toi animalerie, Merci à toi gant MAPPA, Merci à toi TFD9, merci à toi bac à vaisselle, merci à toi l'autoclave, merci à toi cage d'escalier, merci pour ce que tu m'as révélé.

Abréviations

Aa : Acide aminé

Ac : Anticorps

APC : Cellules présentatrices d'antigènes

CFP : « Cyan fluorescent protein »

CK: Chimiokines

IL: Interleukine

INF: Interféron

DC(s): Cellules dendritique(s)

GFP : « green fluorescent protein »

GM-Csf: «Granulocyte Macrophage-Colony stimulating factor »

GMP: « granulocyte monocyte progenitor »

GVHD: maladie du greffon contre l'hôte

HSC: cellule souche hématopoïétique

LT: Lymphocytes T

M-Csf: Macrophage-colony stimulating factor

MDSC: Cellule Myélo-Suppressive

MGG: May Grünwald Giemsa

NO: Nitroxyde d'azote

RCK: Récepteur de chimiokine

ROS: espèces réactives à l'oxygène

SCF: Stem cell Factor

STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription

Résumé

Les chimiokines (CKs) jouent un rôle important dans l'orchestration de la réponse immunitaire en contrôlant notamment la mobilisation des cellules immunitaires. Les cellules myéloïdes et, en particulier, les monocytes sont impliquées dans le processus inflammatoire et notamment dans le développement des cancers. En effet, les cellules dérivées des monocytes ou macrophages associés aux tumeurs sont fortement représentés dans le micro environnement tumoral et sont souvent associés à un mauvais pronostic. La caractérisation des mécanismes aboutissant au recrutement des monocytes dans la tumeur représentent donc un enjeu majeur pour l'optimisation des protocoles thérapeutiques anti-cancéreux. Chez la souris, deux populations monocytaires sont caractérisées sur la base de l'expression différentielle des récepteurs aux chimiokines CCR2 et CX3CR1 et interviennent dans leur recrutement et leur différenciation en macrophages dans les tissus, les monocytes inflammatoires (CCR2⁺, CX3CR1^{low}) et les monocytes dits résidents (CCR2⁻, CX3CR1^{high}). L'objectif principal de mon projet de recherche a été de mieux comprendre les mécanismes contrôlant la mobilisation des monocytes suite à un traitement chimiothérapeutique. J'ai entrepris d'étudier le rôle des récepteurs aux chimiokines, en particulier CX3CR1, dans la reconstitution monocyttaire après traitement chimiothérapeutique par le cyclophosphamide (CP), un agent alkylant reconnu pour son activité myélosuppressive. Le CP provoque un renouvellement des monocytes et une forte infiltration de la tumeur par les LT spécifiques de la tumeur (issus d'un transfert adoptif) associés à la réactivation de la réponse immune anti-tumorale. Cependant, les LTs spécifiques de l'antigène de la tumeur se localisent préférentiellement dans des zones riches en cellules dendritiques associées à la tumeur (TuDCs) et sont piégés par ces dernières. Ces interactions diminuent potentiellement le nombre de contacts entre les LT et les cellules tumorales suggérant un rôle pro tumoral des TuDCs. Le traitement au CP provoque une déplétion des cellules myéloïdes suivie d'une reconstitution massive des réservoirs de monocytes (moelle osseuse et rate). Au cours de la reconstitution monocyttaire, l'expression de CX3CR1 diminue et est corrélée à une diminution de l'adhérence ex vivo des cellules médullaires. Nous avons mis en évidence une mobilisation accrue des monocytes inflammatoires au sein des souris CX3CR1^{-/-} comparée aux souris WT et CCR2^{-/-}. L'imagerie in vivo de la moelle osseuse au sein de souris CX3CR1^{-/-} ou à l'aide d'un antagoniste de CX3CR1 nous a permis de montrer un rôle spécifique de CX3CR1 dans le « crawling » sur les cellules endothéliales et le confinement des cellules monocytaires au niveau des sinus et du parenchyme médullaire. Nous suggérons qu'au cours de la mobilisation cellulaire induite par le CP le récepteur CX3CR1 contrôle la rétention médullaire des monocytes. Nous pensons que la modulation du taux de mobilisation cellulaire au cours de la reconstitution induite par CP et/ou le ciblage de CX3CR1 pourrait, par augmentation du pool de cellules myéloïdes leucocytaires d'un hôte, contribuer à l'amélioration des réponses cellulaires à la suite d'une lésion tissulaire ou d'un dysfonctionnement des défenses immunitaires. De plus, le ciblage de CX3CR1 pourrait trouver des applications dans le domaine de la greffe de HSCs.

Summary

Chemokines orchestrate immune response especially by leucocytes mobilization. Myeloid cells, notably monocytes, are involved in inflammation and cancer development. Indeed monocyte-derived cells and macrophages are strongly represented in tumour microenvironment and are associated with a bad prognosis. Characterization of mechanisms leading to monocytes recruitment within the tumor is thus a major issue in anti-cancer therapeutic protocols optimization. Based on the differential expression of chemokine receptors CCR2 and CX3CR1, two populations of monocytes, inflammatory monocytes (CCR2⁺, CX3CR1^{low}) and resident monocytes (CCR2⁻, CX3CR1^{high}) have been characterized in mice which are involved in monocytes recruitment and differentiation into macrophages. The main objective of my work was to better understand the mechanisms of monocytes mobilization following chemotherapeutic treatment. I started to study the role of chemokine receptors with a focus on CX3CR1 in monocytes reconstitution following cyclophosphamide (CP) treatment. CP is an alkylant agent known for its myelosuppressive properties. This chemotherapeutic agent induces a transitory anti tumour immune response associated with a monocyte renewal and a strong infiltration of the tumour by adoptively transferred T lymphocytes. However, antigen-specific T cells are trapped by tumour-associated dendritic cells (TuDCs). This potentially decreases interactions between T lymphocytes and tumour cells suggesting an immunosuppressive role of TuDCs. CP induces a strong depletion of myeloid cells followed by a massive reconstitution of bone marrow and spleen monocytes reservoirs. CX3CR1 expression on bone marrow monocytes is decreased during reconstitution and correlated with a decreasing adhesion of these cells to CX3CL1 ex vivo. We highlighted an increased mobilization of inflammatory monocytes in CX3CR1^{-/-} mice compared to WT and CCR2^{-/-}. Intra vital imaging of bone marrow within CX3CR1^{-/-} mice or with the help of a CX3CR1 antagonist allowed us to show a specific role of CX3CR1 in the lumen crawling and confinement of monocyte-derived cells in both sinusoid and parenchyma of the bone marrow. We suggest that CX3CR1 controls the release of bone marrow monocytes during CP-induced mobilization. We think that modulating the rate of cellular mobilization, by increasing the host's leukocyte pool during CP induced reconstitution, and/or targeting CX3CR1, could contribute to improve cellular response following tissue damage or immune cell dysfunction. Furthermore, targeting CX3CR1 could provide applications in the stem cell transplantation domain.

INTRODUCTION

Introduction

Le cancer est une pathologie qui constitue un problème de santé publique. Le développement cancéreux est un processus complexe impliquant de nombreux acteurs cellulaires et moléculaires. Les cellules du système immunitaire jouent un rôle complexe dans ce contexte. Parmi elles, les cellules du système phagocytaire sont éminemment représentées au sein d'une tumeur. Leur présence est souvent associée à un mauvais pronostic de survie. Néanmoins, elles participent à l'activation de la réponse immune anti-tumorale au cours d'un traitement chimiothérapeutique. Au cours de mon étude, je me suis intéressé aux mécanismes qui régulent le recrutement des monocytes issus de la moelle osseuse. J'ai porté un intérêt plus particulier au rôle des récepteurs de chimiokines CCR2 et CX3CR1 et à leur(s) ligand(s) respectif(s) exprimés sur les monocytes. Ce manuscrit introduisant mon travail de thèse est composé de trois parties principales. Nous ferons état, dans un premier temps, des connaissances qui ont permis de comprendre les étapes qui conduisent à la transformation d'une cellule saine en une cellule cancéreuse. Nous expliquerons également comment une tumeur se développe et se dissémine au sein d'un organisme. Le chimiotactisme, la migration cellulaire et la dissémination tumorale sont des processus qui mettent en jeu les chimiokines. Nous détaillerons précisément la structure et les fonctions de ces molécules et de leurs récepteurs. Nous expliquerons ensuite les mécanismes et les étapes qui contrôlent la mobilité cellulaire et la migration trans-endothéliale. Enfin, nous insisterons sur le rôle que jouent les chimiokines en présence d'une tumeur. Dans la seconde partie du manuscrit, nous discuterons de la relation complexe entre les cellules tumorales et le système immunitaire. Nous commencerons par discuter du rôle du système immunitaire dans la réponse anti tumorale et du concept d'immuno-édition tumoral. Nous détaillerons ensuite les fonctions anti et pro-tumorale des leucocytes associés à la tumeur et nous introduirons brièvement le rôle de la chimiothérapie et la capacité de certains traitements à moduler la réponse immune anti tumorale. Dans la troisième partie de cette introduction, nous porterons notre attention sur le développement et les fonctions du système monocyttaire. Nous commencerons par une description structurale et fonctionnelle de la moelle osseuse ainsi que de son rôle dans le contrôle de la maturation des cellules hématopoïétiques, puis nous détaillerons l'ontogénie et les fonctions des monocytes. Nous insisterons plus particulièrement dans ce dernier chapitre

d'introduction sur le rôle des récepteurs de chimiokines CCR2 et CX3CR1 dans le contrôle de la rétention et de la libération de monocytes médullaires.

I Cancer chimiotactisme et mobilité cellulaire

Au cours de ce chapitre, nous expliquerons comment une cellule tumorale émerge puis se développe en un réseau complexe par l'intermédiaire de nombreux types cellulaires et facteurs moléculaires. Nous décrirons les différentes acquisitions de fonctions nécessaires au développement d'une cellule tumorale.

A Cancer et développement tumoral

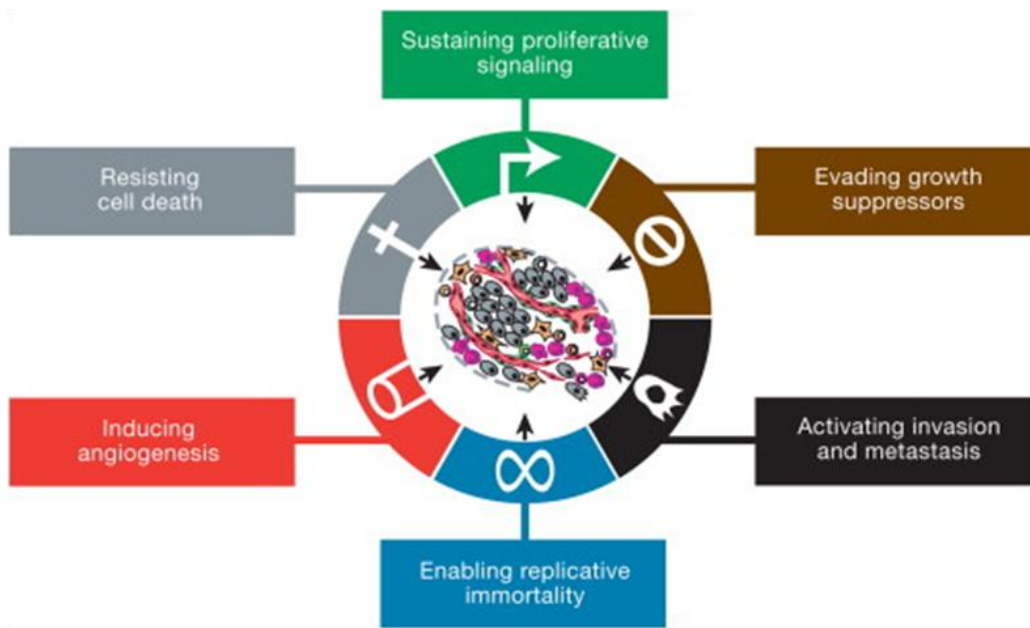
Le cancer est une pathologie causant un problème de santé publique. En effet, en France il est la première cause de décès prématuré avant 65 ans pour l'homme comme pour la femme. En effet, il a été responsable de 38% des décès masculins et 47% des décès féminins entre 2004 et 2008. Par ailleurs, le cancer du poumon (chez l'homme) et le cancer du sein (chez la femme) sont les premières causes de décès (toutes causes confondues) entre 45 et 64 ans (source Institut National du cancer, www.e-cancer.fr). Les cellules cancéreuses sont caractérisées par plusieurs propriétés, notamment un potentiel de réplication illimité. Initialement, l'identification de mutations génétiques sur ces cellules a permis de mettre à jour l'implication de deux catégories de gènes dont l'expression pouvait être modifiée : [1] les proto oncogènes qui favorisent la prolifération et [2] les gènes suppresseurs de tumeurs qui inhibent la prolifération ou facilitent l'apoptose. Les oncogènes sont modifiés par des mutations qui leur font acquérir une fonction alors que les gènes suppresseurs subissent une mutation délétère traduite par une perte de fonction. Depuis, de nombreuses autres modifications génétiques transformantes ont été identifiées dans le génome des cellules cancéreuses. Les cellules acquièrent par ces mutations des fonctions leur permettant d'échapper aux différents systèmes de contrôle de l'organisme, ce qui aboutit à une prolifération anarchique des cellules cancéreuses. Cependant, une tumeur n'est pas seulement constituée d'une masse isolée de cellules en prolifération. En effet, elle est associée à un micro environnement complexe constitué de diverses populations cellulaires [1] produisant divers facteurs moléculaires [2] participant au processus de genèse et de développement tumoral (Hanahan and Coussens, 2012; Hanahan and Weinberg, 2011). [1] Au niveau cellulaire, on note la présence de fibroblastes, de cellules mésenchymateuses, de

cellules endothéliales, de péricytes et de leucocytes. [2] Les acteurs moléculaires comprennent la matrice extracellulaire et les protéines solubles dont des enzymes, des cytokines, des facteurs de croissance et des chimiokines (molécules auxquelles je consacrerai un chapitre). Tous ces acteurs, de par leurs interactions avec les cellules tumorales, sont modifiés ou modifient les cellules environnantes, ce qui a pour conséquence de favoriser l'acquisition de propriétés particulières nécessaires à la survie et au développement tumoral. Hanahan et Weinberg ont décrit 6 capacités acquises indispensables à la plupart des cellules tumorales (Figure1A). Ils distinguent : [1] l'autosuffisance envers les signaux de prolifération, [2] l'insensibilité à l'inhibition de contact, [3] l'invasion tissulaire et métastatique, [4] l'acquisition d'un potentiel de réplication illimité, [5] l'induction d'angiogénèse, [6] la résistance à la mort cellulaire programmée (Hanahan and Weinberg, 2000).

[1] l'autosuffisance envers les signaux de prolifération

En situation normale, la production et la libération de facteurs de croissance sont finement contrôlées afin de maintenir une prolifération limitée assurant le maintien de la structure du tissu et de ses fonctions. Deux paramètres sont connus pour réguler la quantité de facteurs de croissance : [1] le taux de sécrétion, [2] la biodisponibilité. Les signaux mitogènes sont déclenchés par des facteurs de croissance qui se lient à des récepteurs membranaires spécifiques. Le plus souvent, ces récepteurs présentent des domaines intra-cellulaires contenant des tyrosines kinases. La signalisation déclenchée par ces récepteurs aboutit à la transcription de gène(s) impliqué(s) dans la survie et la prolifération cellulaire. Les cellules cancéreuses sont capables de dérégler ces signaux afin de devenir "maître de leur destinée". Pour ce faire, elles peuvent adopter plusieurs stratégies (Witsch et al., 2010) : [1] Induire la production de facteur de croissance et ainsi assurer leur prolifération par voie autocrine. [2] Envoyer des signaux stimulant les cellules environnantes qui vont libérer des facteurs de croissance en réponse. [3] Sur exprimer un récepteur de facteurs de croissance. [4] Activer constitutivement un récepteur ou une protéine impliquée dans les voies de prolifération.

A



B

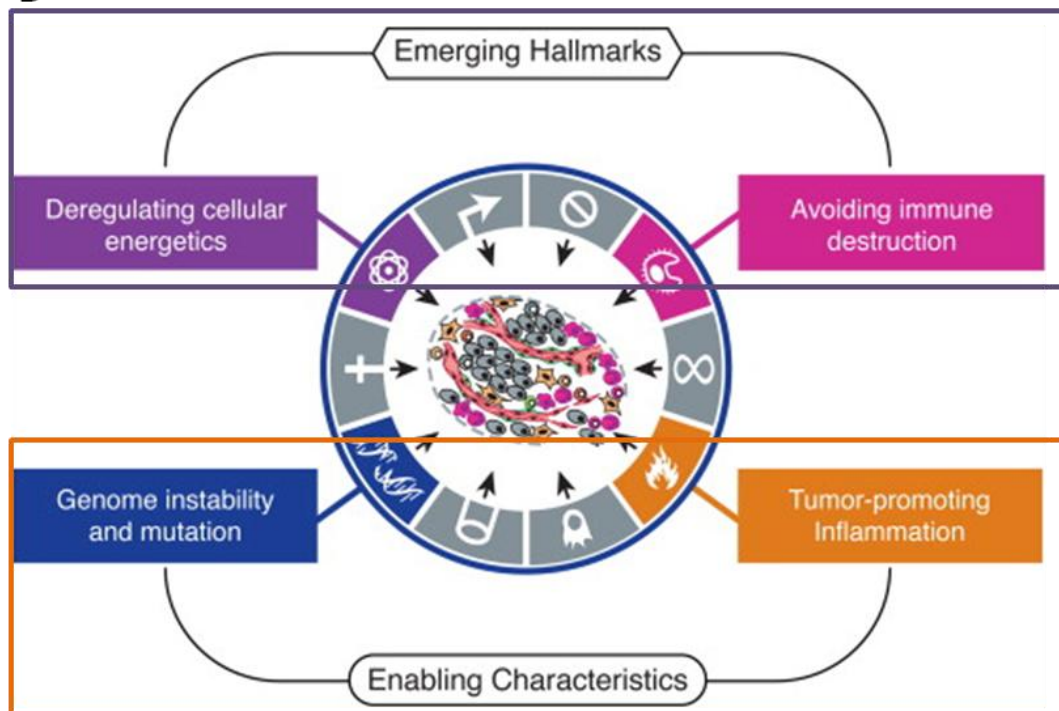


Figure 1 : Les capacités acquises par la tumeur et les caractéristiques favorisant le développement des capacités.

A) Schéma synthétique des six capacités acquises nécessaires au développement tumoral. B) (Encadré violet) Les capacités émergentes et (encadré orange) les propriétés favorisant l'acquisition des capacités tumorales. D'après (Hanahan and Weinberg, 2000; Hanahan and Weinberg, 2011).

[2] l'insensibilité à l'inhibition de contact

Le nombre de cellules ainsi que l'organisation architecturale au sein d'un tissu sont conservés par l'inhibition de contact. Ce contrôle est exercé par des interactions entre les cellules qui aboutissent à une inhibition de la croissance. Ainsi, les gènes impliqués dans ce processus sont des gènes suppresseurs de tumeurs. Récemment, des mécanismes d'inhibition de croissance ont été décrits. La protéine Merlin codée par le gène NF2 renforce l'adhésion inter cellulaire par couplage des protéines d'adhésion (ex cadhérine) au domaine transmembranaire de récepteur à tyrosine kinase. De plus, la protéine Merlin limite les signaux mitogéniques en séquestrant des récepteurs aux facteurs de croissance (Curto et al., 2007; Okada et al., 2005). D'autres protéines onco-suppressives comme LKB1, P53 et RB (protéine associée au rétinoblastome) peuvent être impliquées dans l'acquisition de l'insensibilité à l'inhibition de contact. Une mutation ou la perte de fonction d'une de ces protéines peut rendre une cellule résistante à l'inhibition de contact.

[3] l'invasion tissulaire et métastatique

Les cellules cancéreuses malignes sont caractérisées par leur aptitude à envahir les tissus et à former des métastases distantes de la tumeur primaire. La dissémination tumorale s'initie par la migration des cellules dans les tissus vers un vaisseau lymphatique ou sanguin. Une fois la circulation atteinte, les cellules tumorales peuvent se disséminer à travers l'organisme. La dissémination métastatique peut s'effectuer selon différents mécanismes : [1] par la libération et l'action d'une enzyme capable de dégrader la matrice extracellulaire (ex métalloprotéase) (Joyce and Pollard, 2009; Kessenbrock et al., 2010), [2] par la modulation d'expression de protéines d'adhérence (Bex and van Roy, 2009; Cavallaro and Christofori, 2004). La dissémination métastatique peut également être orchestrée par les chimiokines. Ce processus sera détaillé dans un chapitre dédié à ces molécules. L'invasion tissulaire et métastatique pourrait être orchestrée par un phénomène de dédifférenciation ou reprogrammation cellulaire nommé transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Cette transition cellulaire est régulée par l'action du TGF β et permet à la cellule tumorale d'acquérir une motilité favorisant ses capacités d'invasion, de dissémination et de résistance à l'apoptose (Klymkowsky and Savagner, 2009; Polyak and Weinberg, 2009; Thiery et al., 2009). Certaines cellules du microenvironnement notamment les leucocytes associés à la tumeur peuvent permettre aux cellules tumorales d'acquérir une capacité migratoire. Nous

détaillerons plus précisément l'implication de ces cellules, plus particulièrement celles des cellules myéloïdes plus tard.

[4] l'acquisition d'un potentiel de réplication illimitée

Les cellules normales ont un potentiel de réplication limité et déterminé. En effet, le processus de sénescence ou vieillissement cellulaire se traduit par le raccourcissement des télomères (extrémités des chromosomes) à la suite de chaque cycle de réplication. La succession des divisions entraîne donc un rétrécissement télomérique létal qui aboutit à la mort cellulaire programmée de la cellule. Les télomères jouent donc un rôle essentiel dans le potentiel réplicatif des cellules et le maintien de l'intégrité de l'information génétique. Il existe une enzyme (la télomérase) capable d'ajouter de nouveaux fragments télomériques à l'extrémité des chromosomes. Cette enzyme est peu ou pas exprimée dans la plupart des cellules somatiques mais s'exprime de manière significative dans 90% des cellules tumorales (Blasco, 2005; Hanahan and Weinberg, 2011). Ainsi, ces cellules résistent à l'induction de sénescence et/ou l'apoptose acquérant ainsi un potentiel de réplication illimité.

[5] l'induction d'angiogénèse

Les cellules, pour croître et survivre, ont besoin d'être approvisionnées en nutriments, en oxygène et d'éliminer leurs déchets métaboliques. Ceci est assuré par le réseau vasculaire sanguin. Le réseau vasculaire est mis en place durant l'organogénèse et n'évolue que très peu durant l'âge adulte. Ainsi, les modifications du réseau vasculaire ont lieu lors des processus de cicatrisation ou au cours des cycles de reproduction féminins. Au cours de leur croissance, la plupart des tumeurs initient un programme d'angiogénèse leur permettant d'induire la synthèse de nouveaux vaisseaux sanguins (Hanahan and Folkman, 1996). L'angiogénèse est un processus régulé par des facteurs pro et anti angiogénique. L'hypoxie au sein de la masse tumorale va notamment induire l'expression de ces médiateurs par l'activation du facteur de transcription HIF-1 α . Les principaux facteurs pro-angiogéniques sont les VEGFs {Vascular endothelial growth factor} et les FGFs {Fibroblast growth factors}. Les leucocytes associés à la tumeur participent activement à la néo vascularisation de la tumeur. Nous reviendrons plus précisément sur les populations cellulaires impliquées au cours de ce processus dans le manuscrit.

[6] résistance à la mort cellulaire programmée

La mort cellulaire programmée ou apoptose est un processus pouvant être assimilé à un suicide cellulaire. Cette désagrégation de la cellule peut être déclenchée selon deux voies [1] intrinsèque ou [2] extrinsèque. La voie intrinsèque est déclenchée, le plus souvent, suite à un endommagement conséquent de l'ADN (mettant en jeu la protéine p53) ou par hyperactivation d'un oncogène. En situation normale, cet état devrait initier un processus d'apoptose. L'activation de l'apoptose s'effectue, dans ce cas, par une dépolarisation mitochondriale qui va induire la libération du cytochrome c, la formation de l'apoptosome, puis l'activation d'enzymes protéolytiques (les caspases) qui dégradent les constituants cellulaires. La libération du cytochrome c est contrôlée par les protéines de la famille BCL2 qui comportent des membres pro ou anti-apoptotiques. La perte de l'équilibre en faveur des protéines pro-apoptotiques aboutit à la formation de pores dans la mitochondrie qui vont permettre la libération du cytochrome c. [2] La voie extrinsèque est initiée par la voie des récepteurs de mort (TNF α et Fas). L'activation de ces récepteurs conduit à une signalisation activatrice des caspases qui vont dégrader la cellule et aboutir à la formation de vésicules apoptotiques.

Les cellules tumorales sont caractérisées par une dérégulation de la signalisation par des protéines oncogéniques et des dommages au niveau de l'ADN dûs aux mutations et à leur taux élevé de prolifération. Ces cellules survivent car elles ont développé des mécanismes de résistance. En effet, dans près de 50% des cas, les tumeurs sont caractérisées par une perte d'expression du gène de la protéine p53. On constate également, dans de nombreuses tumeurs, une augmentation de l'expression des protéines anti apoptotiques BCL2 et/ou une diminution des protéines pro-apoptotiques. Ces modifications rendent ainsi les cellules tumorales résistantes à l'apoptose.

Les capacités acquises par la cellule tumorale lui permettent de survivre, se diviser et de se disséminer. Nous avons décrit ces six capacités identifiées par Hanahan et Weinberg. Au cours des dix dernières années, d'autres caractéristiques ont été identifiées. Les mêmes auteurs les ont nommées « caractéristiques émergentes ». Ils ont distingué, parmi elles, deux étapes essentielles au développement et à la progression des cancers : [1] les modifications du métabolisme énergétique des cellules tumorales. [2] l'échappement au système immunitaire. De même, ils ont mis en évidence deux facteurs consécutifs dûs à la

transformation néoplasique initiale qui facilitent et supportent le développement tumoral : [1] l'instabilité et les mutations du génome des cellules tumorales, [2] l'inflammation pro tumorale (Figure 1B). L'inflammation est orchestrée par de nombreux médiateurs solubles. Parmi ces médiateurs, les chimiokines (CKs) et leurs récepteurs (RCK) dont l'étude de leur implication dans la mobilisation leucocytaire est au centre de mes travaux. Dans la suite de ce manuscrit, nous nous intéresserons donc à ces molécules impliquées dans le processus d'inflammation, de recrutement leucocytaire ainsi que dans la dissémination des cellules tumorales.

B Les chimiokines et leurs récepteurs

Nous débuterons ce chapitre par la définition suivie d'un bref historique de la découverte des CKs, puis nous détaillerons leur classification ainsi que leur structure. Nous présenterons ensuite brièvement les interactions de ces médiateurs avec leurs récepteurs et les signalisations qui en découlent. Au cours de mon étude, je me suis plus particulièrement intéressé à l'axe CX3CL1/CX3CR1. Nous détaillerons donc, plus particulièrement, la structure et les fonctions de cet axe tout au long de ce manuscrit. L'étude de la motilité et du recrutement cellulaire ayant également constitué une part significative de mon travail, j'insisterai ensuite sur le modèle de recrutement et de transmigration leucocytaire. Puis, nous détaillerons précisément les associations entre les CKs, le développement tumoral et la dissémination métastatique. Enfin, nous verrons que les CKs peuvent constituer une cible d'intérêt thérapeutique d'intérêt et que les entreprises pharmaceutiques se sont considérablement investies dans le développement d'outils visant à moduler les fonctions des CKs et de leurs récepteurs ces dernières années.

Définition

Les CKs sont des cytokines chimio attractantes et constituent un groupe d'environ 50 protéines de 8 à 14Kda (70 à 127 acides aminés). Elles sont caractérisées par leur capacité à orienter les cellules au sein de l'organisme et notamment au cours de la réponse immunitaire.

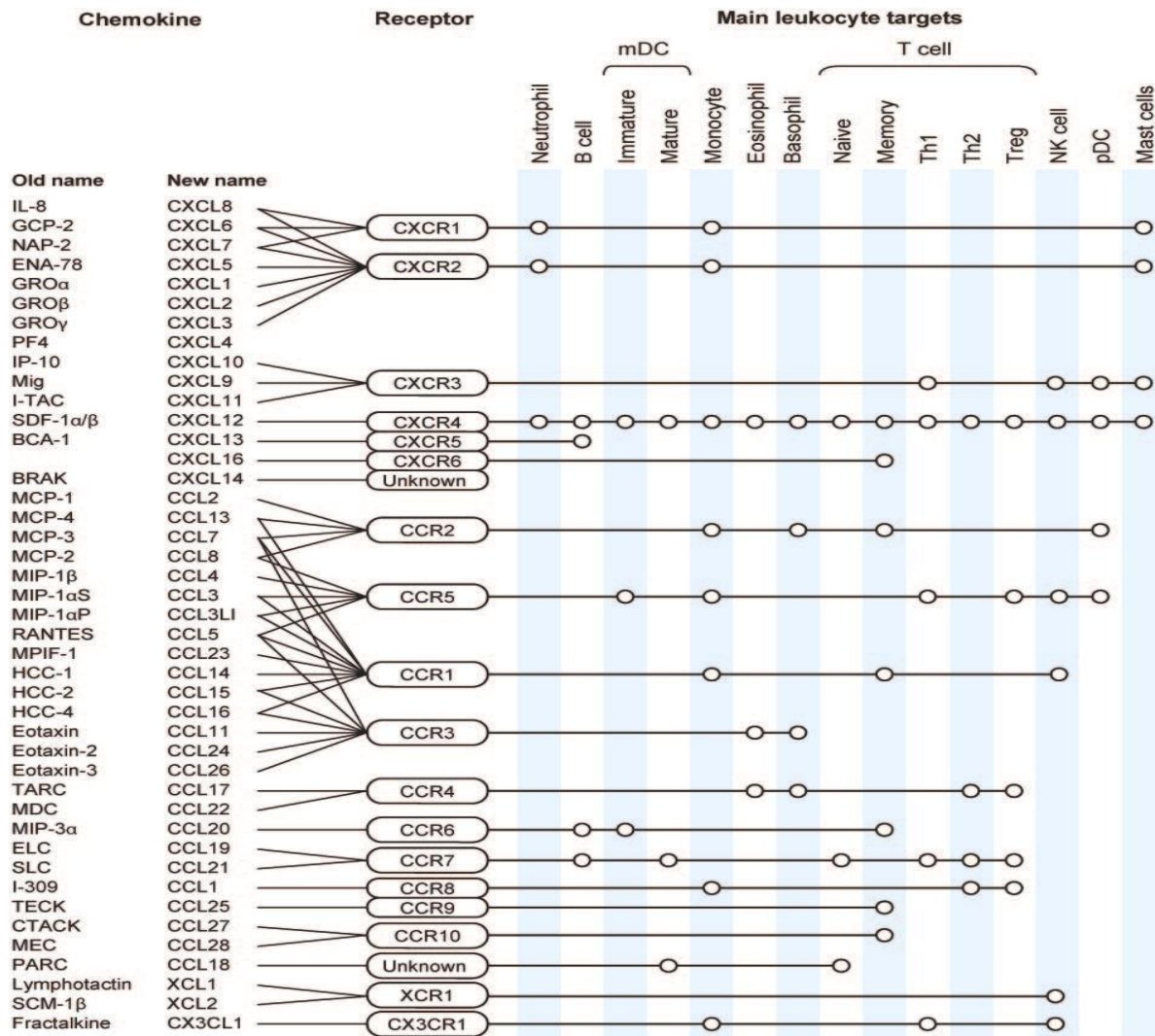
En 1987, le groupe de Leonard a identifié un facteur soluble appelé interleukine 8 (IL-8) produit par des monocytes activés possédant un effet chimio attractant des neutrophiles (Yoshimura et al., 1987). L'IL-8 est maintenant reconnue comme la première chimiokine

découverte. En 1989, CCL2 fut la première chimiokine purifiée (Yoshimura et al., 1989a; Yoshimura et al., 1989b).

Les CKs sont produites par toutes les cellules de l'organisme, notamment par les cellules hématopoïétiques, mais aussi par les cellules épithéliales et endothéliales (Loetscher et al., 2000; Murphy, 2002; Murphy et al., 2000; Thelen, 2001). Elles constituent un système complexe qui orchestre la circulation leucocytaire en situation homéostatique ou inflammatoire. (Yoshie et al., 2001; Zlotnik and Yoshie, 2000). La principale fonction cellulaire déclenchée par les CK est le chimiotactisme qui est une migration cellulaire orientée selon un gradient croissant de concentration de chimiokines. Elles participent aussi à de nombreuses fonctions cellulaires comme la prolifération, la production de cytokines et la mort cellulaire. Elles sont, de fait, impliquées dans des processus physiologiques comme l'angiogénèse, le développement embryonnaire, le maintien et la compartimentalisation des cellules au sein d'organes (Kunkel, 1999; Loetscher et al., 2000; Taub et al., 1996). Les CKs interagissent avec des récepteurs de Chimiokines (RCKs) constitués de sept domaines transmembranaires (Baggiolini and Moser, 1997) et couplés aux protéines G hétérotrimériques..

Classification et nomenclature

Le système chimiokinique est constitué de plus de 50 ligands et 20 récepteurs (Figure 2). Afin de faciliter leur classification, une nomenclature officielle des CKs a été mise en place sur la base de l'emplacement des cystéines conservées au niveau de leur région N terminale et du nombre d'Aas qui les sépare (Murphy et al., 2000; Zlotnik and Yoshie, 2000).



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

Figure 2 : Classification structurale des chimiokines

Anciennes et nouvelles appellations des chimiokines. Les récepteurs et les principaux leucocytes ciblés sont indiqués. D'après (Viola and Luster, 2008)

Ce motif caractéristique en N-terminal est composé de deux cystéines pouvant être adjacentes, séparées par un ou trois acides aminés et engagées dans deux ponts disulfures. Quatre familles ont été ainsi dénommées : CCL, CXCL, CX3CL, et les XCL seule famille à ne pas comporter de signature peptidique caractéristique. (Figure 3)

Les CC chimiokines sont au nombre de 27 chez l'homme. Elles comptent 70% d'homologie de séquence en Aas. Leur expression est associée à des inflammations aiguës et chroniques caractérisées par un infiltrat cellulaire myéloïde et lymphoïde. Les CXC chimiokines sont composées de 17 membres chez l'homme. Elles comptent 90% d'homologie de séquence en Aas. Elles sont associées à des inflammations aiguës. Cette famille de CKs est séparée en deux groupes définis par la présence ou l'absence d'un motif tri-peptidique ELR (glutamate, leucine, arginine) localisé en amont de la première cystéine conservée. Les ELR+ sont définies comme chimiokines pro-angiogéniques (Bikfalvi, 2004; Strieter et al., 2004). Elles seraient impliquées dans le développement embryonnaire, la cicatrisation (Romagnani et al., 2004), mais aussi dans le développement tumoral (Strieter et al., 2004). Les CKs sans motifs ELR(-) sont, pour nombre d'entre elles, produites en réponse aux interférons(INF). Par exemple CXCL10 est induite par les trois interférons ($INF\alpha$, $INF\beta$, $INF\gamma$) (Rollins, 1997). A l'opposé des chimiokines ELR+, elles sont décrites comme angiostatiques (à l'exception de CXCL12) et auraient un rôle de rétrocontrôle sur l'angiogénèse induite par les chimiokines CXC-ELR+ (Rossi and Zlotnik, 2000; Strieter et al., 2004; Strieter et al., 1995b). Toutes les CXC-CKs sont produites sous forme soluble à l'exception de CXCL16 qui peut être également produite sous forme membranaire (Matloubian et al., 2000).

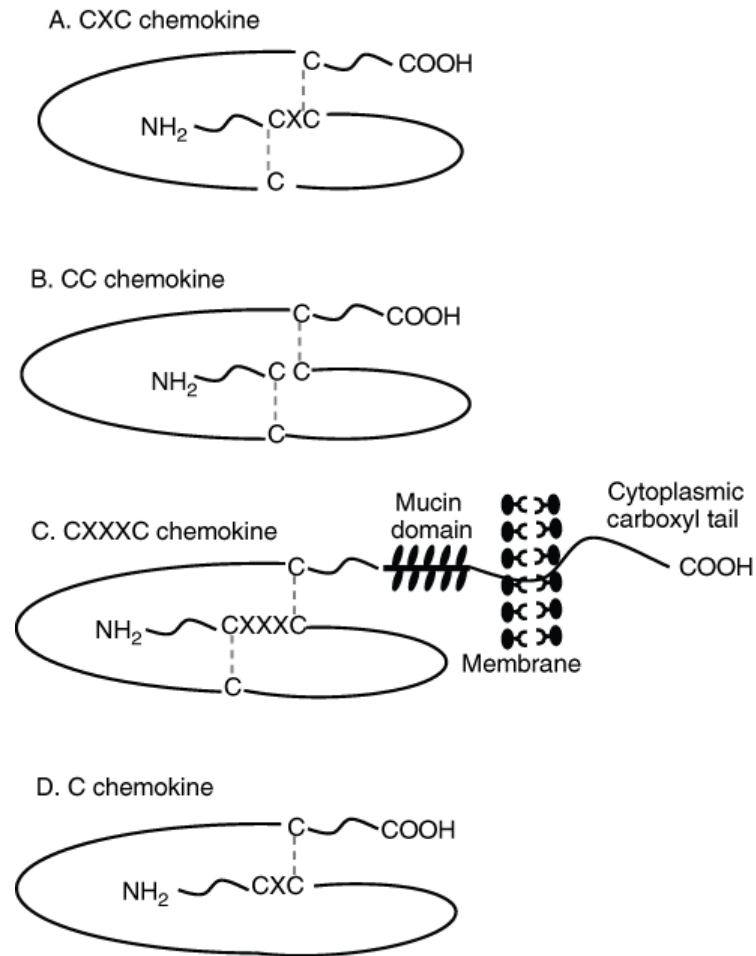


Figure 3 : Classification structurale des chimiokines.

A) CXC-chimiokine, B) CC-chimiokine, C) CX3-chimiokine, D) C-chimiokine

Les chimiokines sont divisées en sous familles sur la base du nombre et de l'emplacement de cystéines situées en N terminal. Ce motif peptidique est caractéristique des CKs. **D'après Jane C. Deng and Theodore J. Standiford *Compr Physiol* 2011 Copyright © 2011 American Physiological Society**

Les XC chimiokines, quant à elles, ne comprennent que deux cystéines et donc d'un seul pont disulfure. Il n'y a que deux membres au sein de ce groupe XCL1 et XCL2. Très proches, elles ne diffèrent que par deux Aas positionnés en 6 et 8 à leur extrémité N terminale, (Stievano et al., 2004). La seule CX3C- chimiokine recensée est le CX3CL1 (Bazan et al., 1997; Zlotnik and Yoshie, 2000). Cette chimiokine est caractérisée par sa grande taille (373 Aas) et sa capacité à être produite sous forme soluble ou membranaire conduisant à des fonctions distinctes comme nous le verrons plus loin. Elle est constituée d'un domaine chimiokine (76Aas), un long tronc mucine (241Aas), un segment transmembranaire (19Aas) ainsi qu'une courte queue intra cytoplasmique (37Aas) (Figure 4).

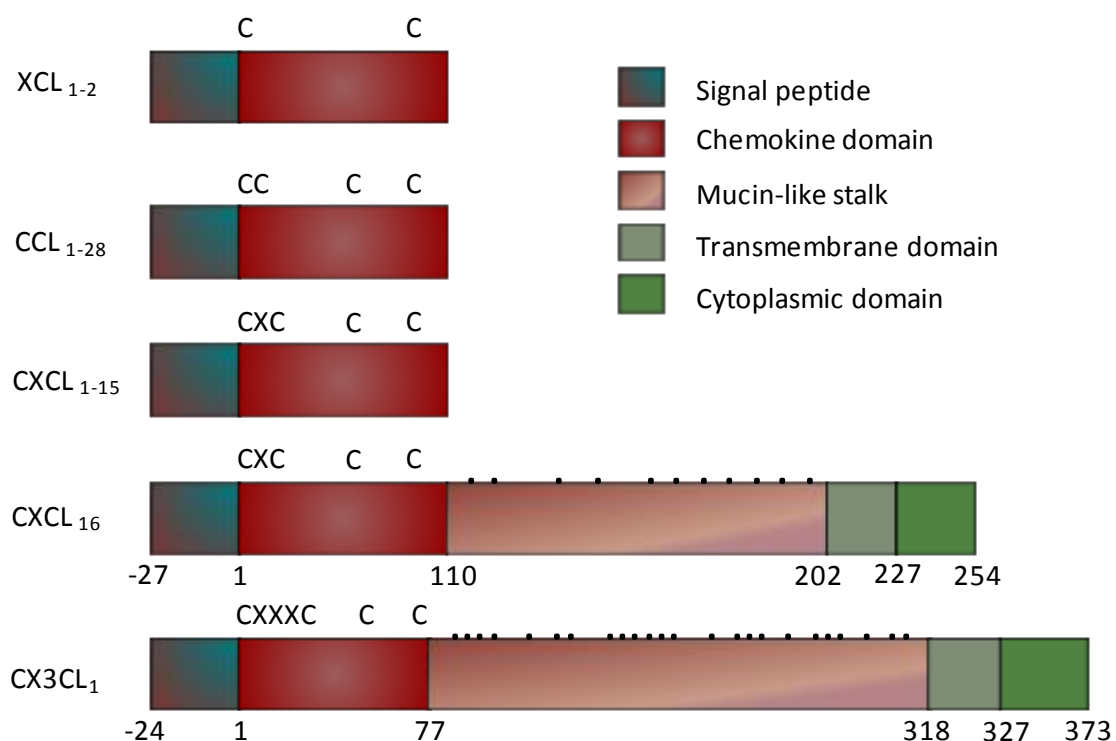


Figure 4 : Structure schématique des chimiokines et spécificité de CX3CL1.

CX3CL1 en bas peut être synthétisé sous forme soluble ou membranaire. Les deux formes ont en commun un domaine chimiokine (1-76), un tronc mucine (77-317) qui est un site potentiel de O glycosylation sur les résidus serine et thréonine (noir). La seconde forme inclut un domaine transmembranaire (318-336) et intracytoplasmique (337-373). D'après (Umehara et al., 2004).

Mon travail s'est orienté autour de l'axe CX3CL1/CX3CR1 et de son implication dans l'adhérence, la mobilité et le chimiotactisme des monocytes. J'insisterai donc particulièrement sur les diverses implications et fonctions de ce couple, notamment dans la physiopathologie du cancer tout au long de mon manuscrit.

Structure des chimiokines

Structure primaire

Les CKs possèdent une structure primaire commune sans pour autant posséder une grande homologie de séquence en Aas. Cependant, l'homologie de séquence est plus grande au sein des chimiokines d'un même groupe.

Structure secondaire et tertiaire

Les CC et CXC-chimiokines partagent de fortes similarités de leur structure secondaire (Figure 5). Le domaine N terminal précédant la première cystéine très flexible ne possède pas de structure organisée particulière. Le noyau de la chimiokine est formé par une longue région en boucle composée d'environ 10 résidus et stabilisée par les deux ponts disulfures. Elle est souvent suivie d'un brin formant l'hélice_{3₁₀}. Cette région appelée «N loop » joue un rôle fonctionnel important notamment dans la liaison avec le récepteur de chimiokine (Bondue et al., 2002). Suivent 3 (ou 4) feuillets- β reliés les uns et les autres par les boucles 30s, 40s et 50s. La numérotation se réfère à leur position sur la séquence de protéique. Les boucles 30s et 40s contiennent les deux dernières cystéines engagées dans les deux ponts disulfures. Après la dernière cystéine vient s'ancrer le domaine C terminal selon une hélice α . Les deux sites majeurs d'interaction avec les récepteurs des chimiokines sont la portion N terminale et la boucle rigide (N loop), la boucle 30s également est essentielle à l'activité de nombreuses chimiokines (Biswas et al., 2007; Horuk, 2003; Onuffer and Horuk, 2002).

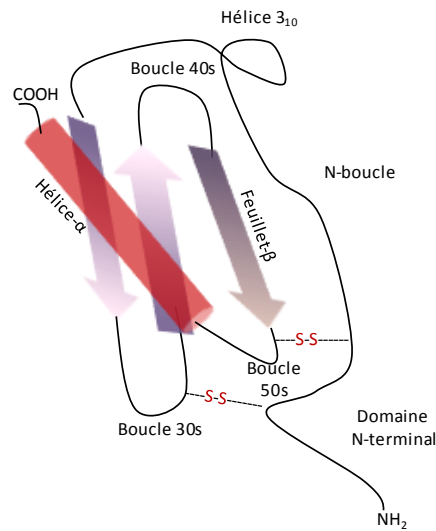


Figure 5: Structure secondaire des chimiokines.

Le domaine N terminal flexible se termine au niveau de la première cystéine et donne suite à la N-loop qui se termine au niveau de l'hélice 3₁₀. Suivent alors 3 feuillets-β anti parallèles reliés entre eux par les boucles 30s 40s 50s respectivement. Les deux dernières cystéines des boucles 30s et 50s forment deux ponts disulfures avec les deux cystéines N-terminales. Le domaine C-terminal s'organise suivant une hélice-α après la dernière cystéine.

La structure tridimensionnelle de nombreuses chimiokines a été mise en évidence par les méthodes de résonance électromagnétique nucléaire (RMN) et cristallographie au rayon X (Clare et al., 1990; Lodi et al., 1994; Mizoue et al., 1999; Skelton et al., 1995; Swaminathan et al., 2003). Les chimiokines adoptent une structure tertiaire extrêmement bien conservée et sont, à ce jour, toutes conformes au même modèle tridimensionnel (Baggiolini and Loetscher, 2000; Clark-Lewis et al., 1995; Clare and Gronenborn, 1995). Les 3 feuillets β suivant l'hélice 3₁₀ sont anti parallèles les uns aux autres et forment un feuillet plissé. Ils sont reliés par des boucles de trois à quatre Aas. La boucle 30s relie les deux premiers feuillets. Le dernier feuillet β est relié par la boucle 50s au domaine C terminal. Le dernier domaine organisé en hélice α s'oriente à 75° du plan formé par le feuillet β. La figure 6 montre une modélisation de la structure tridimensionnelle de CX3CL1.

La structure tertiaire est stabilisée par les deux ponts disulfures mais aussi par des liaisons hydrophobes entre les résidus du noyau et de la région N terminale. La N loop demeure la partie la plus flexible de la protéine, malgré l'engagement des deux cystéines qui la composent dans la formation de pont disulfure avec les cystéines de la boucle 30s et 50s (Fernandez and Lolis, 2002).

Structure quaternaire

Bien que la plupart des chimiokines soient actives sous forme monomérique, elles sont purifiées sous forme oligomérique en présence de glycosaminoglycanes comme l'héparine ou à forte concentration (Fernandez and Lolis, 2002). Il a été montré que certaines formes d'homo oligomère possèdent une activité *in vivo* (Proudfoot et al., 2003). La dimérisation des chimiokines montre des structures quaternaires distinctes entre les différentes familles de Cks, ce qui pourrait expliquer la non réactivité croisée entre les CKs d'un groupe donné et les récepteurs d'un autre groupe (Figure 7). Les CKs produites *in vivo* ne sont pas libres. En effet, elles se lient à des molécules présentatrices, les glycosaminoglycanes.

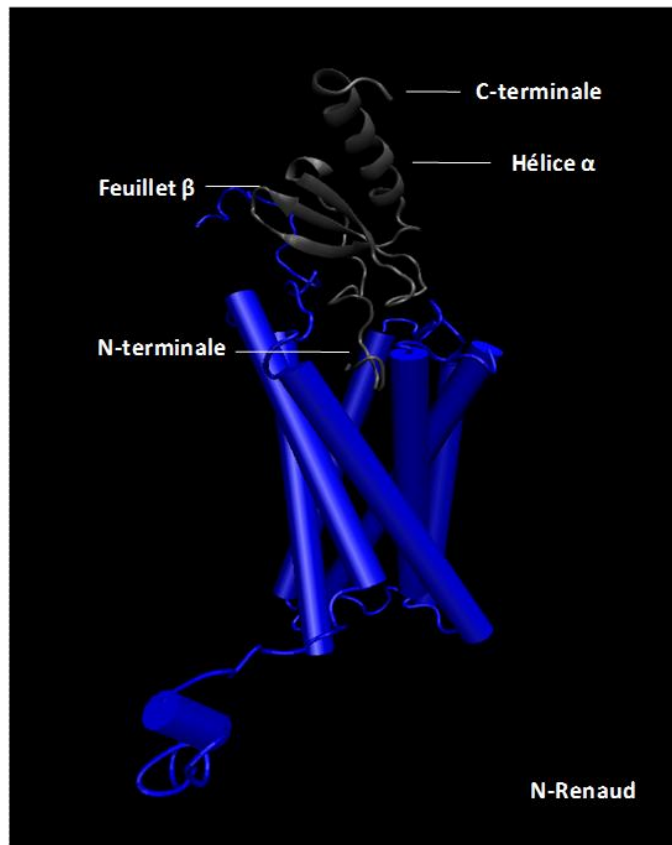


Figure 6 : Modélisation tridimensionnelle de CX3CL1 (gris) et de CX3CR1 (bleu)

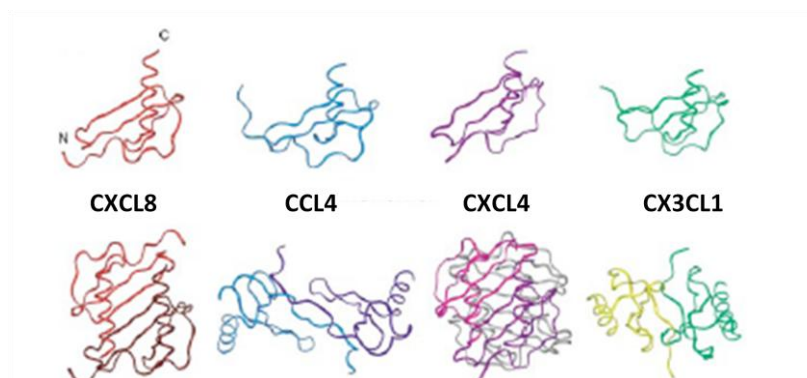


Figure 7: Structure tertiaire et quaternaire des Chimiokines.

Si les structures tertiaires des chimiokines sont relativement proches, elles sont caractérisées par une structure quaternaire différente. Les CXC-chimiokines forment des dimères par l'intermédiaire du premier feuillet β , les CC CKs utilisent le domaine N-terminal comme interface de liaison des monomères. La cristallisation de CXCL8, CCL4, et CX3CL1 révèle des dimères alors que CXCL4 forme un tétramère. D'après (Fernandez and Lolis, 2002).

Les Glycosaminoglycanes (GAG)

Les GAGs sont des polysaccharides constitués de disaccharides de compositions variées. Ils se présentent sous forme soluble (Héparine) ou liée à la membrane cellulaire (héparane sulfate). Ils sont capables d'interagir avec de nombreuses protéines, dont les CKs, et les protègent de la dégradation (Sadir et al., 2004).

La liaison des CKs avec les GAGs exprimés par les cellules endothéliales permet la présentation de CKs aux cellules du sang périphérique et sont susceptibles d'induire une adhésion leucocytaire au vaisseau (Weber et al., 1999). Les GAG pourraient être impliqués dans le maintien d'un gradient de concentration à partir d'un site inflammatoire. La combinaison du chimiotactisme et de l'adhésion endothéliale induite par les GAG pourrait permettre une meilleure trans-migration à travers l'endothélium vasculaire (Cinamon et al., 2001). Les GAG pourraient également jouer un rôle de « piège » ou de présentation des chimiokines selon leur forme. En effet, alors que l'héparine immobilisée (héparane sulfate) est indispensable à l'activité biologique des chimiokines, l'héparine soluble est capable d'inhiber l'activité des CKs in vitro et in vivo (Harvey et al., 2007). Les GAG pourraient également favoriser l'oligomérisation des chimiokines par modification de leur orientation in vivo (Hoogewerf et al., 1997) (Figure 8).

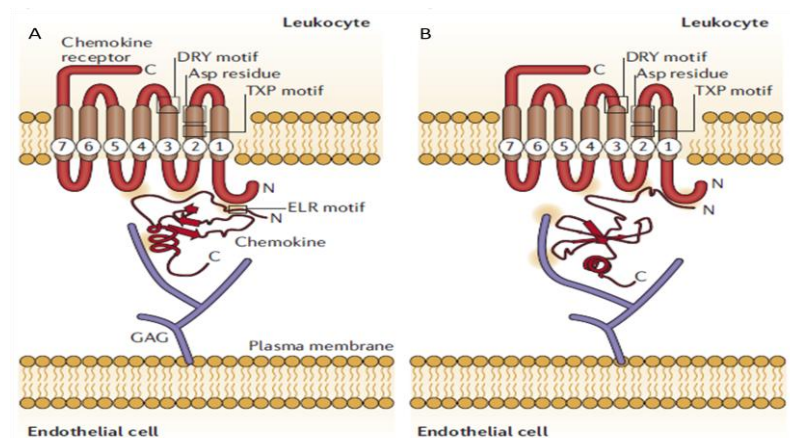
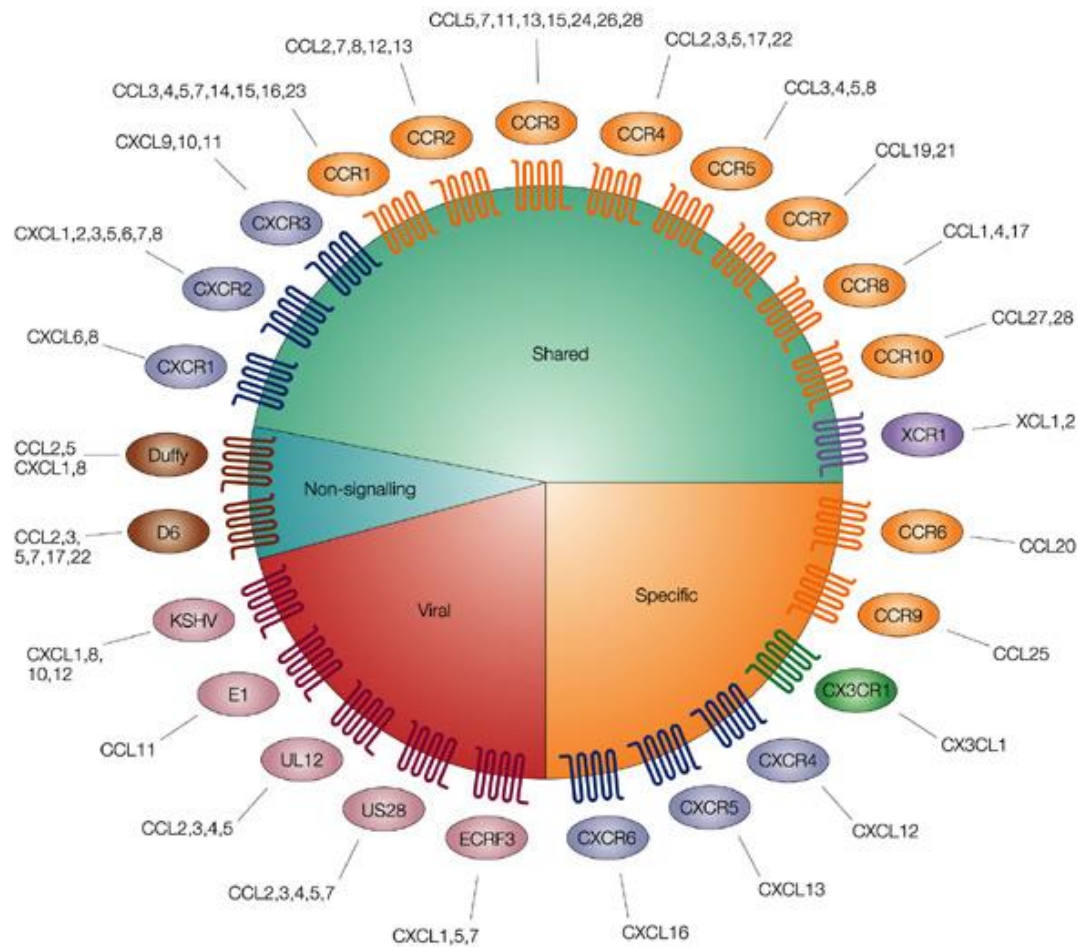


Figure 8 : Interaction Gag-Chimiokine-RCK

Les chimiokines solubles peuvent être présentées sur la membrane des cellules épithéliales via des GAGs. Certaines CKs comme CXCL8 (A) lient les GAGs au niveau de leur hélice α -C-terminal, d'autres comme CCL5 (B) interagissent avec les GAGs par l'intermédiaire des boucles 20s et 40s. L'interaction avec les récepteurs mobilise de nombreuses régions. Les motifs conservés nécessaires à la transduction du signal des RCKs sont : un résidu d'acide aspartique, un motif TXP thr-x-Pro, le motif DRY Asp-Arg-Tyr, ainsi que le motif ELR Glu-Leu-Arg pour certaines CXC-chimiokines. D'après (Mantovani et al., 2006).



Nature Reviews | Cancer

Figure 9: Les différents types de récepteurs chimiokines

Les récepteurs de chimiokines peuvent être classés en 4 catégories. 1) Les RCKs spécifiques capables de lier une seule chimiokine (Specific receptors). Ce sont les récepteurs CCR6, CCR9, XCR1, CXCR5, CXCL16, CX3CL1. 2) Les RCKs capables de lier de multiples chimiokines de classes identiques (Shared). C'est le cas des récepteurs CXCR1-CXCR3, CXCR7, CCR1, CCR2, CCR5, CCR7, CCR8, CCR10. Les récepteurs capables de lier plusieurs CKs de différentes sous classes. Ce sont les récepteurs atypiques capables de signalisation G indépendante. C'est le cas des récepteurs D6, DARC, CCX-CKR (non signaling). 4) récepteurs viraux capables de lier les CKs humaines. KSHV, E1, UL12, US28 (viral). CXCR7 et CCX-CKR ne sont pas représentés. D'après (Balkwill, 2004a).

Les récepteurs de Chimiockines (RCKs)

Les récepteurs de chimiockines RCKs sont classés en fonction de la famille d'appartenance de leur(s) ligand(s). On distingue donc 4 groupes de RCK correspondant aux 4 groupes de CKs : les CXCR (7 membres), les CCR (10), le CX3CR et le XCR (Figure 9). Il existe des récepteurs atypiques ou dits leurres qui ne sont pas couplés à des protéines G. Ces récepteurs (du fait de l'absence du motif DRY essentiel à l'ancrage des protéines G) ont longtemps été considérés silencieux. Cependant, il a été plus récemment montré qu'ils sont capables de signalisation G indépendante impliquant notamment les arrestines, l'ubiquitine et mdm2 (Moore et al., 2007). Parmi ces récepteurs, on distingue le récepteur D6, le CCRL1, le Duffy Antigen Receptor for Chemokine (DARC), le Chemokine Receptor on Activated Macrophage CRAM. Ces récepteurs peuvent lier de nombreuses CKs et sont associés à un rôle dans le drainage et la régulation du taux de chimiockines et de cytokines (Mantovani et al., 2001).

Structure des récepteurs

Les RCKs sont des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) à 7 domaines transmembranaires (Baggiolini and Moser, 1997). Ils sont constitués de 340-370 Aa. Les RCKs comportent entre 20 et 80% d'homologie dans leur séquence primaire en Aas (Murdoch and Finn, 2000). La structure tertiaire des RCKs comprend un domaine N-terminal court (environ 40 Aas), trois boucles extracellulaires hydrophiles, trois boucles intracellulaires et un domaine C-terminal. Les quatre domaines extracellulaires participent à la reconnaissance des ligands alors que les portions intracellulaires jouent un rôle important dans la transduction du signal et de la régulation de l'expression du récepteur. Les résidus sérines et thréonines du domaine C-terminal sont plus particulièrement impliqués dans les phénomènes de transduction du signal par phosphorylation (Montecclaro et al., 1997). On retrouve des ponts disulfures reliant la première et la seconde boucle extracellulaire ainsi qu'au niveau de la troisième boucle extracellulaire et du domaine N terminal. Le motif conservé DRY (Asp-Arg-Try) nécessaire à l'ancrage et la signalisation des protéines G (Mantovani et al., 2001), (Murphy et al., 2000) est situé dans la seconde boucle intracellulaire (Figure 10) (Mantovani et al., 2006).

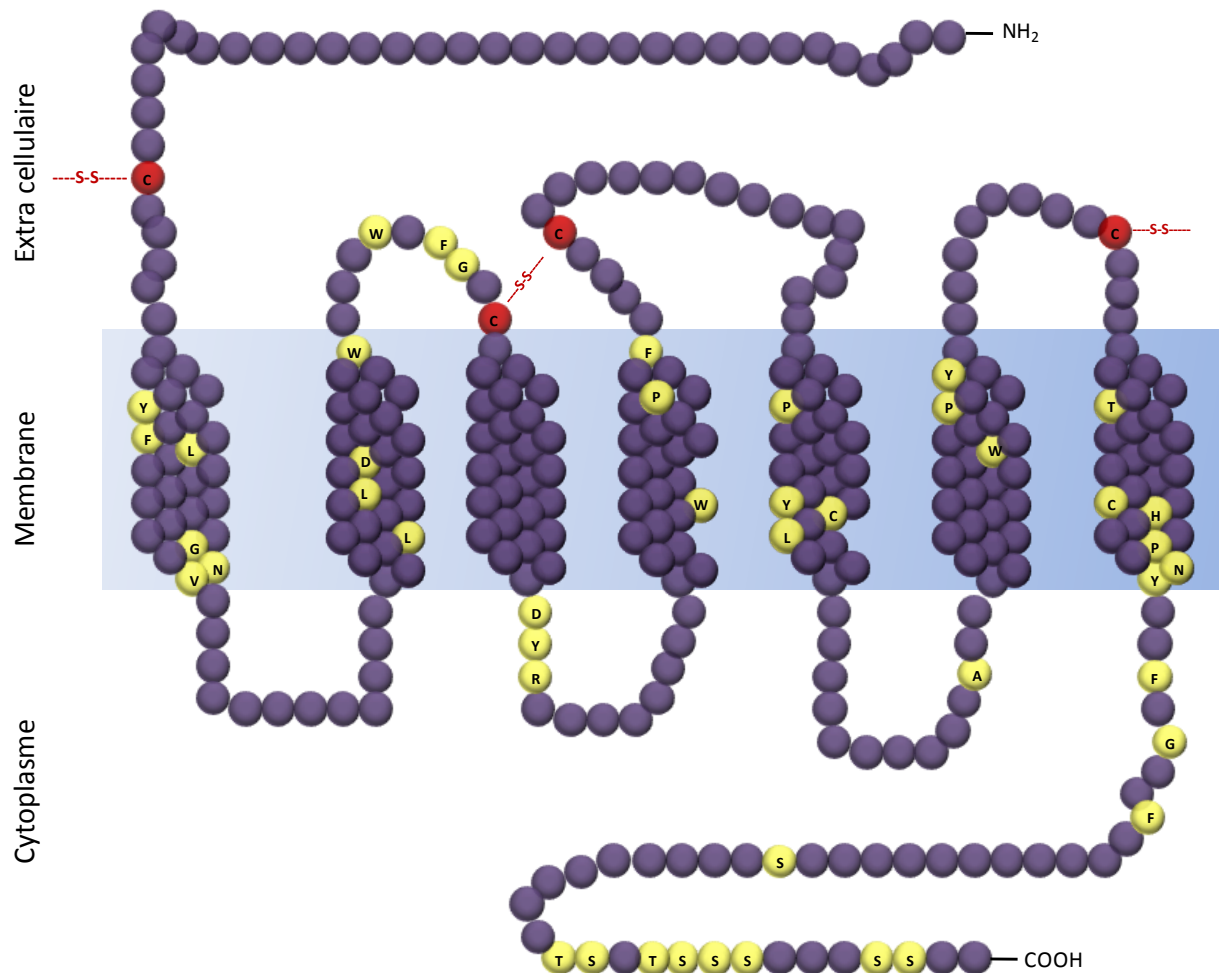


Figure 10: Structure schématique des RCKs

Structure typique de RCK en serpent composée de trois boucles extra cellulaires et trois boucles intra cellulaires, sept domaines transmembranaires. Les acides aminés hautement conservés ainsi que le motif DRY sont indiqués en jaune. Les cystéines extracellulaires et les ponts disulfures sont représentés en rouge. Les résidus sérines (S) et thréonines (T) en C terminal impliqués dans la phosphorylation déclenchée par la fixation du ligand sont indiqués.

Récemment, la structure du CXCR4 a été mise en évidence par cristallisation (Wu et al., 2010). La modélisation structurale des RCKs reposait jusqu'alors sur l'utilisation des structures connues de la rhodopsine et des récepteurs β adrénergiques (Lodowski and Palczewski, 2009). La mise en évidence de la structure du CXCR4 va donc permettre une meilleure prédiction de structure et de dynamique de conformation des différents RCKs in vivo.

Les interactions des chimiokines avec leurs récepteurs

Le système d'interaction CKs /RCKs est dit redondant car une chimiokine donnée peut se lier à plusieurs RCK(s) et un même RCK est susceptible de lier plusieurs CKs. Elles constituent un réseau complexe qui orchestre la circulation leucocytaire en situation homéostatique et inflammatoire (Yoshie et al., 2001; Zlotnik and Yoshie, 2000). Cette redondance permettrait d'optimiser la mobilisation cellulaire en cas d'inflammation et également de parer à une déficience éventuelle d'une des voies de signalisation. Il existe cependant des CKs spécifiques d'un seul RCK, c'est le cas pour les couples CCL20/CCR6, CCL1/CCR8, CXCL16/CXCR6 et CX3CL1/CX3CR1. Les CKs d'une famille sont spécifiques des récepteurs de la même famille. De façon intéressante, les récepteurs atypiques D6 et DARC lient les CC- et CXC-CKs avec la même affinité. Pour complexifier la compréhension du système, certaines CKs peuvent agir en tant qu'agoniste d'un récepteur donné et antagoniste d'un autre RCK. Par exemple, CCL11 active CCR5 et bloque CCR2 (Ogilvie et al., 2001).

Transduction du signal

Les CKs ont une affinité pour leur récepteur de l'ordre du nano molaire. Comme évoqué précédemment, la transduction du signal ligand récepteur déclenche divers effets biologiques en plus de la migration, comme la survie ou la croissance cellulaire. La transduction du signal peut être différente pour un même RCK en fonction de la CK liée et du type cellulaire. Un même RCK stimule en général plusieurs voies de transduction simultanément. Les interactions des CKs avec leur(s) récepteur(s) déclenchent l'activation de multiples voies de signalisation aboutissant à des fonctions biologiques diverses. (O'Hayre et al., 2008) (Figure 11).

La transduction du signal se traduit par l'induction des voies de signalisation des CKs qui peut être soit dépendantes soit indépendantes des protéines G. La voie majeure reste G dépendante, elle peut être bloquée avec la pertussis toxine (PTX). La voie G dépendante

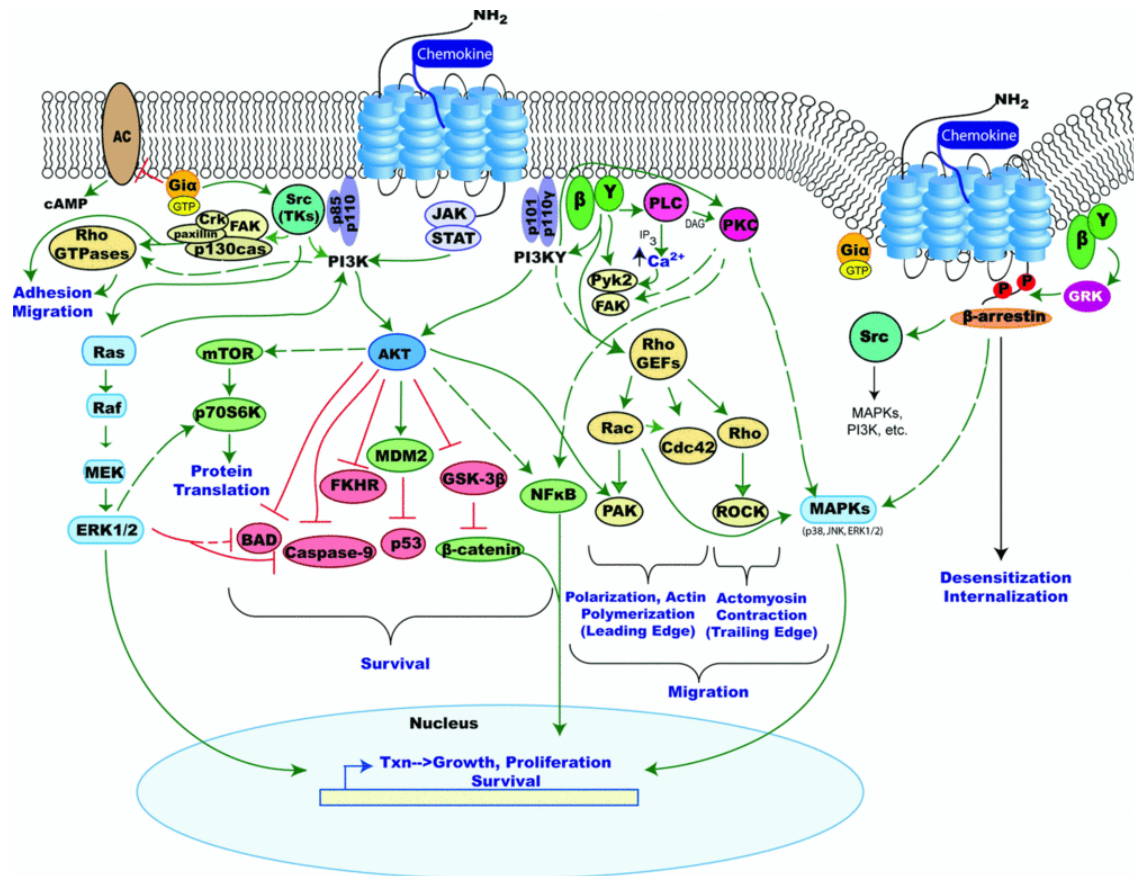


Figure 11 : Schéma simplifié de la transduction induite par la fixation d'une chimiokine sur son récepteur. D'après (O'Hayre et al., 2008).

aboutit à la désensibilisation du récepteur par son internalisation, étape cruciale à la détection de stimulation ultérieure et la migration cellulaire (Moore et al., 2007). A la suite de la liaison entre une CK et son récepteur, une dimérisation des RCKs pourrait également survenir, régulant le niveau de reconnaissance du ligand et complexifiant la spécificité de signalisation des CKs. L'implication fonctionnelle de la dimerisation des RCK est encore très controversée je n'entrerais donc pas dans la polémique (Chabre et al., 2009).

Les voies dépendantes des protéines G

Plusieurs types de protéine G sont associés à la signalisation des RCKs. Les protéines G sont des hétérotrimères associant trois sous unités (α , β , γ). La protéine $G\alpha$ est couplée à un site de liaison GDP/GTP et interagit directement avec le domaine C-terminal du RCKs. Il existe 16 sous unités $G\alpha$ classées en quatre groupes : $G\alpha_s$ (stimulant l'activité de l'adénylate cyclase), $G\alpha_i$ (inhibitrice de l'activité de l'adénylate cyclase), $G\alpha_q$ (activant la phospholipase C), et $G\alpha_{12/23}$ (régulant l'activité du cytosquelette). Les deux sous unités β et γ sont toujours associées. On dénombre 5 sous-unités $G\beta$ et 14 $G\gamma$ différentes.

Les protéines G initiatrices de la transduction activent ensuite d'autres effecteurs dont la Src tyrosine kinase, PI3K (phosphoinositide 3-Kinase), PLC (phospholipase C), susceptibles d'activer différentes voies de signalisation. Les MAPK (mitogen activated protein kinase) qui interviennent dans la croissance, la prolifération et la survie cellulaire, la voie AKT qui engendre des signaux aboutissant à la survie cellulaire, Rho GTPases qui polarisent l'actine et sont associées à la fonction de migration. La voie NF- κ B (nuclear factor-kappa B) peut être impliquée dans la signalisation, elle engendre des signaux de croissance, prolifération et de survie cellulaire (O'Hayre et al., 2008). De plus, la signalisation des protéines G via les CKs conduit à l'expression de molécules d'adhérence et également à la dégranulation de certaines cellules leucocytaires (Appay and Rowland-Jones, 2001).

Les voies indépendantes des protéines G

Les RCKs peuvent également transmettre un signal indépendamment des protéines G, notamment par l'intermédiaire des β arrestines. La signalisation par l'intermédiaire des β arrestines est associée aux fonctions d'internalisation et de désensibilisation des RCKs ainsi que de chimiotaxie (Fong et al., 2002b; Kraft et al., 2001 ; Rajagopal et al., 2010).

Désensibilisation et internalisation des RCKs

La fixation d'un ligand résulte en la signalisation rapide et la résiliation séquentielle de l'activité du récepteur par sa phosphorylation, sa désensibilisation et son internalisation (Thelen, 2001). Pendant ce laps de temps, la cellule devient insensible à toute stimulation supplémentaire. La transduction du signal est bloquée par la phosphorylation des tyrosines et serines au niveau du domaine intracellulaire C terminal de liaison du ligand (Ferguson, 2001). Ce processus est appelé désensibilisation homologue. La désensibilisation hétérologue est caractérisée par la phosphorylation d'un récepteur dénué de ligand qui prévient son couplage à une protéine G. La phosphorylation du domaine C terminal du RCK initie la liaison du récepteur avec les β arrestines. Il se forme alors un complexe β arrestine-RCK qui est internalisé le plus souvent par endocytose clathrine dépendante. Les RCK phosphorylés peuvent également être internalisés par l'intermédiaire de radeaux lipidiques (Neel et al., 2005). Les récepteurs internalisés peuvent avoir plusieurs destinées : Ils peuvent être déphosphorylés dans des endosomes puis recyclés à la surface cellulaire, ils peuvent transiter par les endosomes tardifs et être transportés vers la surface dans des vésicules de Golgi, ou encore être dégradés dans les lysosomes (Muller, 2002). L'internalisation rapide et le recyclage des RCKs permet leur redistribution continue à la surface cellulaire, ce processus est crucial pour la détection du gradient de CKs. Ainsi, la destinée du RCK après stimulation par son ligand détermine la vitesse de récupération de sensibilité et pourrait affecter la durée et l'intensité de la réponse intracellulaire transduite. (Figure 12).

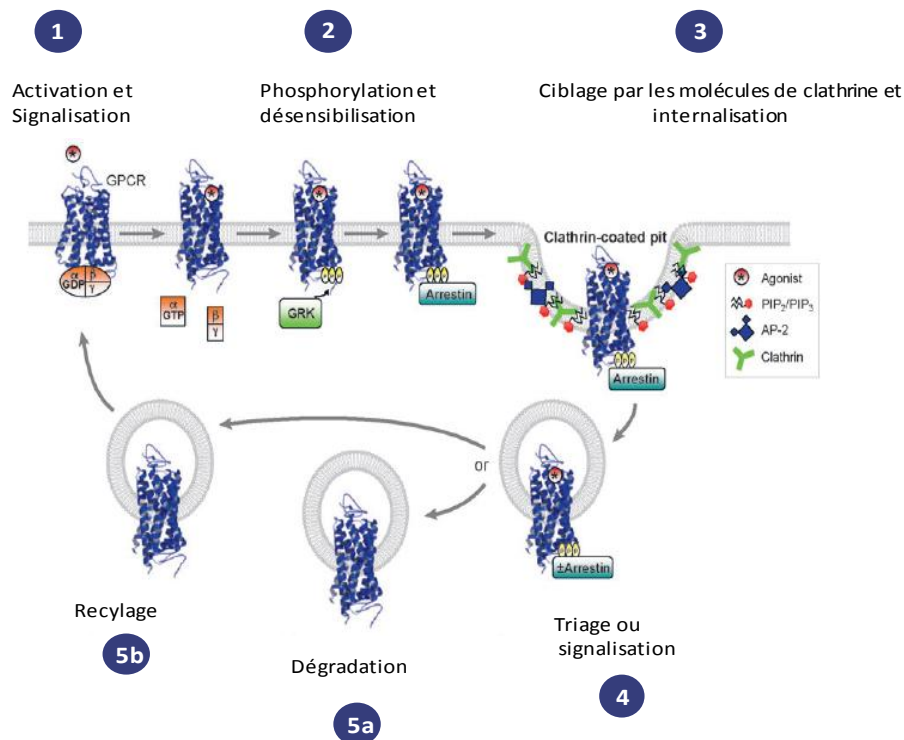


Figure 12: Schéma simplifié de la Régulation du trafic des RCPGs par les GRKs et les arrestines.

La liaison de l'agoniste au RCPGs conduit à l'activation du récepteur, le couplage des protéines G et la transduction du signal (*étape 1*). Les GRKs phosphorylent ensuite le RCPG activé au niveau de son domaine intra cellulaire C-terminal initialisant le recrutement des arrestines. La liaison des arrestines sur le RCPG inhibe le couplage des protéines G et finalise la signalisation, c'est la désensibilisation (*étape 2*). Le complexe RCP- arrestine est alors orienté vers des vésicules coâtés de clathrine dans lesquelles se forme un complexe arrestine-clathrine-protéine AP-2-phosphoinositide aboutissant à l'internalisation du récepteur (*étape 3*). Les RCPGs internalisés sont triés (Etape 4) soit vers des compartiments de dégradation (*étape 5a*) ou de recyclage (*étape 5b*). D'après (Moore et al., 2007)

C Chimiotactisme adhérence et transmigration endothéliale

L'étude de la motilité et du recrutement cellulaire a constitué un intérêt conséquent dans le cadre de mes recherches. Dans ce chapitre, nous expliquerons que le recrutement cellulaire au sein d'un organe est régi selon une dynamique précise dont la compréhension s'est améliorée ces dernières années.

Le processus de chimiotactisme est associé à l'adhésion cellulaire. Au cours d'un processus inflammatoire, les chimiokines sont sécrétées au niveau du stressé/lésé par divers types cellulaires comme les cellules endothéliales activées via la production de cytokines inflammatoires (IL-1, TNF α) (Luster, 1998) ainsi que par les leucocytes précocement recrutés. Les Cks sont retenues localement dans la matrice extracellulaire par les héparanes sulfates ainsi qu'à la surface des cellules épithéliales apicales, elles formeraient ainsi un gradient de concentration localisé au niveau du site inflammatoire. Le recrutement des leucocytes n'est cependant pas uniquement dépendant des CKs. En effet, les sélectines et les intégrines interviennent dans ce processus à plusieurs étapes distinctes. Le modèle d'adhésion et de recrutement des leucocytes a évolué ces dernières années (Ley et al., 2007; Luster, 1998 ; Schenkel et al., 2004). Ce modèle décrit six étapes principales : [1] la capture, [2] le « slow rolling » mouvement des leucocytes le long de la surface des cellules endothéliales, [3] la propagation, [4] le renforcement de l'adhésion, [5] le «Crawling-intravasculaire», [6] la migration trans-endothéliale (Figure 13 et 14).

Etape 1-2 : Capture et slow rolling

Avant de s'arrêter, les cellules roulent le long des parois endothéliales. Le « rolling » est dépendant de l'expression de sélectines par les leucocytes et l'endothélium vasculaire. Parmi elles, la PSGL-1 (P selectine glycoprotéine ligand) et le CD62L (qui est une L selectine) exprimés à la surface des LTs sont capables d'interagir avec différentes selectines de types L-selectines, P-selectines et E-selectines exprimées sur l'endothélium vasculaire (Ley et al., 2007).

Le « rolling » met également en jeu des intégrines telles que LPAM et VLA4 qui interagissent avec leurs ligands respectifs MADCAM (Mucosal vascular Addressin Cell-Adhesion Molecule1) et VCAM1. A noter que les monocytes et les cellules dérivées des monocytes roulent sur l'endothélium vasculaire via VLA-4 (Chan et al., 2001; Huo et al., 2000).

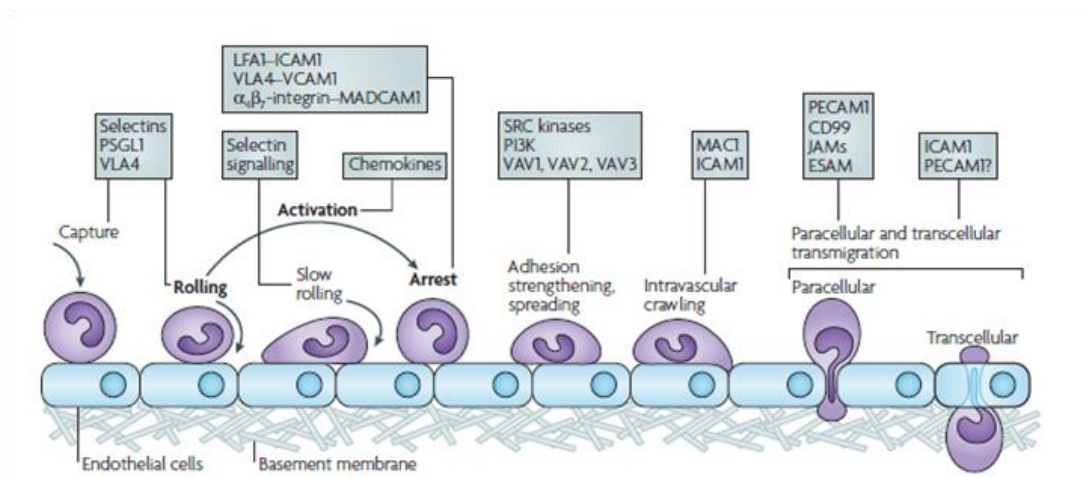


Figure 13 : Adhésion et transmigration leucocytaire.

A l'origine, trois étapes de cette fonction étaient décrites (« Rolling, activation, arrest »). Le rolling est orchestré par les sélectines, l'activation par les chimiokines et l'arrêt par les intégrines. Des étapes supplémentaires ont été plus récemment décrites : la capture, le slow rolling, la propagation de l'adhésion, le crawling intravasculaire ainsi que la migration paracellulaire ou transendothéliale. Les molécules impliquées à chaque étape sont indiquées sur le schéma. ICAM1 (Intercellular adhesion Molecule1), JAM (Junctional adhesion molecule), LFA-1 (Lymphocyte function associated antigen 1), MAC1 (macrophage antigen1), MADCAM1 (Mucosal vascular adressin cell-adhesion molecule), PSGL1 (P-selectin glycoprotein ligand1), PECAM1 (Platelet/endothelial cell-adhesion molecule 1), VCAM1 (Vascular cell-adhesion molecule), VLA-4 (Very late antigen 4). (Ley et al., 2007).

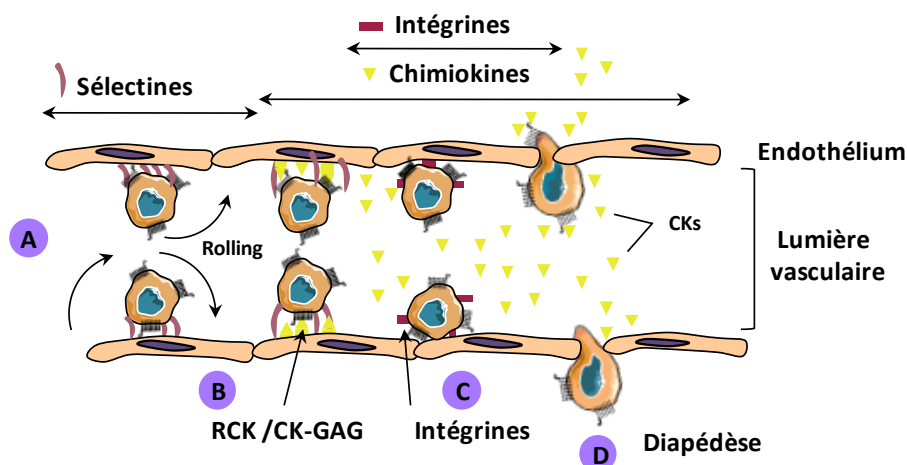


Figure 14: Rôle des chimiokines lors du recrutement des leucocytes au site inflammatoire.

A) Les sélectines induisent le « rolling » (roulement) des leucocytes sur l'endothélium. B) Les chimiokines sont relarguées par l'endothélium vasculaire activé au niveau du site inflammatoire et se lient à l'endothélium par interaction avec les GAGs. Les CKs interagissent alors avec leurs récepteurs présents sur les leucocytes et induisent l'augmentation de l'avidité des intégrines. C) L'adhérence cellulaire est induite entre autre par les liaisons entre les intégrines activées et leurs ligands exprimés par les leucocytes et permet leur arrêt. D) Migration trans-endothéliale en direction du gradient de chimiokines.

Etape 3-4 : Activation des intégrines et propagation de l'adhérence

Le rolling le long de l'endothélium vasculaire conduit à l'exposition des RCKs à leurs ligands présents à la surface des cellules endothéliales. Le ciblage d'une chimiokine à son récepteur déclenche une activation rapide des intégrines renforçant l'adhésion cellulaire et favorisant l'arrêt des leucocytes sur les cellules endothéliales. Les intégrines sont des glycoprotéines membranaires hétérodimériques (composées d'une chaîne α et d'une chaîne β). La fixation d'une CK sur son récepteur déclenche la formation d'un complexe hétérotrimérique RCPGs-intégrines, qui déclenche un réseau de signalisation provoquant l'arrêt rapide des leucocytes en quelques millisecondes. L'avidité de la liaison dépendante des intégrines est régulée par deux mécanismes, l'affinité de la liaison et la valence (Figure 15).

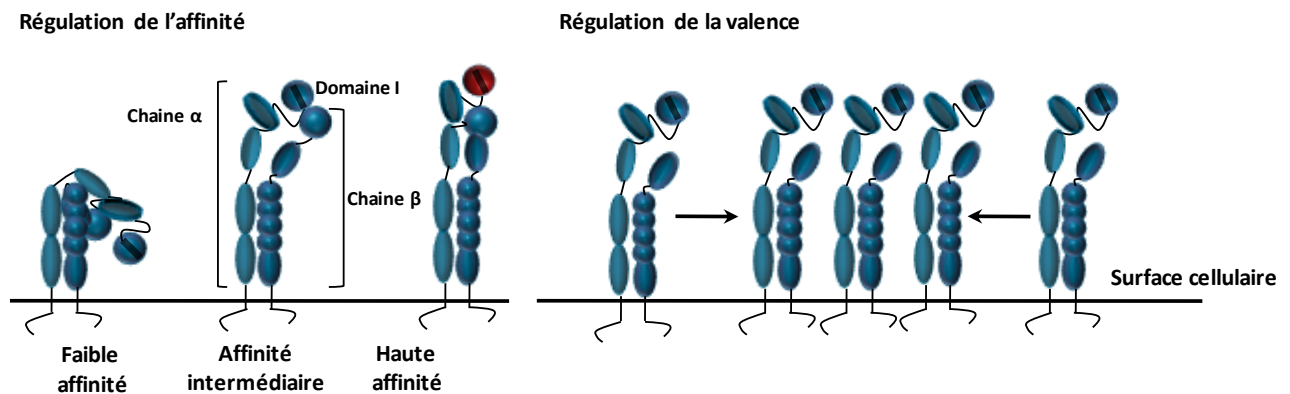


Figure 15: modèle de régulation de l'affinité et de la valence des intégrines

(Schéma de gauche) La conformation d'une intégrine est associée à son affinité : la conformation tête baissée, ainsi que deux conformations en forme allongée correspondent respectivement aux affinités faible, intermédiaire et haute de l'intégrine vis-à-vis de son ligand. La transition entre ces conformations est régulée par la transduction de signaux intracellulaires qui aboutissent à une augmentation de la capacité de liaison du ligand. Les chaînes α et β ainsi que le domaine I de liaison du ligand sont représentés. (Schéma de Droite) L'agglomération (=clustering) des intégrines à la surface cellulaire induit des interactions polyvalentes avec les ligands. Ce processus est connu sous le nom de régulation de la valence de l'avidité des intégrines.

La valence correspond à la densité des hétérodimères d'intégrines impliquée dans l'adhésion cellulaire à la surface de la membrane plasmique. La valence est dépendante de la mobilité latérale et du niveau d'expression des intégrines (Schenkel et al., 2004). Différentes intégrines sont impliquées en fonction du type cellulaire. Les monocytes adhèrent et se déplacent le long des cellules endothéliales par l'intermédiaire de CD11a-CD18 ($\alpha_L\beta_2$ ou **LFA-1**) avec ICAM-1 et ICAM-2 (endothelial InterCellular Adhesion Molecule 1 et 2), de CD11b-CD18 ($\alpha_M\beta_2$, ou **MAC-1**) avec ICAM-1 et ICAM-2 et de CD49d CD29 ($\alpha_4\beta_1$ ou **VLA-4**) VCAM-1

(Vascular Cell Adhesion Molecule-1). Les intégrines jouent un rôle important dans la mobilité des leucocytes le long des parois endothéliales, dans la phase d'arrêt et dans la locomotion.

Etape 5 : Crawling intravasculaire

La propagation de l'adhésion est dépendante de signalisations impliquant des intégrines. Celles-ci régulent diverses fonctions cellulaires comme la mobilité, la prolifération et l'apoptose (Giagulli et al., 2006; Shattil, 2005). A la suite de son arrêt, la cellule va ramper le long des parois lumenales. Ce comportement traduisant une mobilité cellulaire est couramment dénommé « crawling ». Les leucocytes « crawlent » par l'intermédiaire des intégrines MAC1, LFA1 et leurs récepteurs respectifs ICAM1 et ICAM2 (Auffray et al., 2007; Ley et al., 2007). Ce comportement cellulaire particulier s'initie durant le processus de locomotion cellulaire. La locomotion est le processus durant lequel à partir d'un site d'adhésion ferme, une cellule va se déplacer entre deux cellules endothéliales jusqu'à la jonction serrée la plus proche du site enflammé afin d'initier sa diapédèse. (Ley et al., 2007; Schenkel et al., 2004).

Etape 6 : Migration transendothéliale

La transmigration à travers les parois des capillaires est la dernière étape du processus de recrutement des leucocytes au sein d'un tissu enflammé. Au niveau d'une jonction intercellulaire, les leucocytes déstructurent provisoirement la jonction pour se glisser dans l'interstice en se déformant afin de rejoindre le tissu sous-jacent. C'est la transmigration paracellulaire. Ce processus met en jeu différentes molécules à la surface des leucocytes dont PECAM1, LFA1, MAC1 et le CD99 et nécessite l'expression de leur ligand respectif PECAM1, ICAM2, et CD99. La transmigration peut également être trans-cellulaire (passage à travers une cellule épithéliale). Ce processus rare de transmigration a été observé dans différents modèles d'étude du processus inflammatoire (Engelhardt and Wolburg, 2004; Feng et al., 1998).

Fonctions associées au chimiotactisme

Les CKs possèdent de multiples fonctions. Les CKs peuvent jouer un rôle essentiel lors du développement embryonnaire. En effet, les souris déficientes pour CXCR4 ne sont pas viables et sont caractérisées par des malformations multiples (Ma et al., 1998; Tachibana et al., 1998; Zou et al., 1998). Chez l'adulte, l'axe CXCR4/CXCL12 contrôle également la

réétention médullaire des progéniteurs hématopoïétiques et des neutrophiles (Aiuti et al., 1997; Eash et al., 2010; Lapid et al., 2008). Les RCKS et CKs ont également un rôle au sein des organes lymphoïdes, CCR7 joue un rôle dans la compartimentalisation cellulaire des lymphocytes T CD8 permettant l'optimisation de leur priming par les DCs (Hickman et al.). L'axe CX3CL1/CX3CR1, est quant à lui, intéressant dans la mesure où, en plus de son implication dans le chimiotactisme, il est responsable d'une d'adhérence cellulaire indépendante des intégrines. Cette CK et son récepteur ont suscité un intérêt conséquent dans le cadre de mon travail de thèse. Je détaillerais donc ici les fonctions connues de ce couple.

Fonctions du couple CX3CL1/ CX3CR1

Le CX3CL1 est majoritairement exprimé par divers types cellulaires comme les cellules endothéliales activées (Bazan et al., 1997), les neurones (Harrison et al., 1998) les cellules épithéliales (Lucas et al., 2001; Muehlhoefer et al., 2000), Les muscles lisses (Ludwig et al., 2002), les DCs (Papadopoulos et al., 1999), et les macrophages (Greaves et al., 2001). L'expression de CX3CL1 membranaire sur les cellules épithéliales est induite par des cytokines inflammatoires (IL-1, TNF α et INF γ). La forme membranaire est responsable d'une adhésion indépendante de signalisation dite intrinsèque. Cette capacité a été observée in vitro sous flux (Fong et al., 1998; Goda et al., 2000; Imai et al., 1997) mais également in vivo (Jamieson-Gladney et al., 2011). Le domaine membranaire de la CX3CL1 peut être clivé sous l'action d'enzyme protéolytique comme la « TNF α converting enzyme » (=ADAM 17) et ADAM 10 (Garton et al., 2001; Tsou et al., 2001). Le CX3CL1 soluble ainsi libéré présente une activité de chimiotactisme efficace sur les leucocytes (Bazan et al., 1997). La forme soluble de CX3CL1 peut également améliorer la capacité d'adhérence cellulaire en se liant à son récepteur. Elle déclenche, par l'intermédiaire de protéines G, un signal qui améliore l'avidité des intégrines pour leur ligands (Imai et al., 1997). La co-expression du CX3CL1 membranaire et des ligands des intégrines (ICAM-1 et VCAM-1) conduit à une adhésion fortement augmentée comparée à l'adhérence intrinsèque ou à l'adhérence induite par activation des intégrines (Umehara et al., 2004) seules. Le CX3CR1, quant à lui, est exprimé par un grand nombre de cellules en particulier les cellules d'origine hématopoïétique telles que les monocytes, les cellules NK, les cellules microgliales, ainsi que sur les macrophages et les DCs

(Auffray et al., 2009b; Combadiere et al., 1998; Harrison et al., 1998; Imai et al., 1997; Jung et al., 2000; Nishiyori et al., 1998).

Les CKs jouent un rôle dans les processus de survie, de prolifération ainsi que de migration des monocytes. Nous détaillerons, par la suite, les fonctions et les implications des CKs dans la physiopathologie du cancer. Nous insisterons également sur le rôle et les fonctions de l'axe CX3CL1/CX3CR1 en situation tumorale.

D Chimiockines et cancer

L'inflammation et le risque de cancérisation sont intimement liés (Colotta et al., 2009). Ainsi, le microenvironnement tumoral est classiquement associé à une inflammation chronique caractérisée par la présence systématique de cytokines spécifiques telles que le TNF- α , l'IL-1 β et l'INF- γ . En plus de leur rôle dans le recrutement cellulaire, les CKs sont impliqués dans les processus de prolifération, de survie des cellules tumorales (Hideshima et al., 2002) et de néo-vascularisation. Les cellules tumorales participent donc à la création d'un environnement favorable à leur développement en interagissant avec les cellules stromales et en favorisant le recrutement de cellules par le biais de production de CKs (Lazennec and Richmond, 2010). Les similitudes dans la dissémination des cellules cancéreuses et le trafic des leucocytes ont conduit à l'identification des CKs comme acteurs majeurs dans la dissémination et le trafic des cellules tumorales. L'axe CXCR4-CXCL12 a notamment été associé à la dissémination métastatique médullaire (Muller et al., 2001; Sipkins et al., 2005). Néanmoins, certaines CKs peuvent posséder des fonctions anti tumorales. Ainsi, CXCL9 et CXCL10 peuvent favoriser la réponse Th1 et inhiber la réponse Th2 (Romagnani et al., 2005). CXCL9 peut être associée à une réponse immune anti-tumorale, à un effet angiostatique et à l'amélioration de la survie des patients (Johrer et al., 2008; Kunz et al., 1999; Mullins et al., 2004).

Chimiokines, transformation cellulaire et croissance tumorale

Chimiokines et transformation cellulaire

Le rôle des CKs dans le processus de transformation cellulaire n'a pas été mis en évidence et semble donc avoir un impact mineur. Néanmoins, le virus HHV-8 aussi connu sous le nom de KSHV (Kaposi's Sarcoma Herpes Virus) est un oncovirus dont le génome code notamment pour une protéine similaire à CXCR2 (KSHV-RCPG) capable de déclencher une signalisation dépendante des protéines G. La liaison de CKs (CXCL8 et CXCL1) au KSHV-RCPG induit une activation constitutive de la signalisation responsable de la transformation cellulaire (Bais et al., 1998; Yang et al., 2000). Si les CKs ne semblent pas jouer un rôle majeur dans la transformation cellulaire, il a été cependant décrit que le développement de lésions malignes peut être induit par une stimulation soutenue de CXCR2 (Burger et al., 1999). Dans ce contexte, il a été démontré que la surexpression de CXCL1, CXCL2, CXCL3 déclenche via CXCR2 une activation de la voie Ras potentiellement responsable de la transformation et la tumorigénicité de mélanocytes murins. (Balentien et al., 1991; Owen et al., 1997; Wang et al., 2000). Il est intéressant de rappeler, dans ce contexte, que selon la nomenclature initiale des CKs, CXCL1, CXCL2 et CXCL3 ont été initialement décrites pour leur potentialité de facteurs de croissances tumorales et étaient nommées GRO α,β,γ pour Growth related oncogene GRO α,β,γ (Richmond and Thomas, 1986; Richmond and Thomas, 1988; Vandercappellen et al., 2008).

- Chimiockines comme facteurs de croissance

La croissance tumorale est facilitée par de multiples facteurs de croissance et de survie, incluant les CKs. Ces molécules peuvent agir sur les cellules tumorales de façon autocrine ou paracrine. CXCL1 a été initialement décrit comme facteur de croissance autocrine dans les mélanomes (Bordoni et al., 1990; Richmond and Thomas, 1986). Un rôle similaire a été attribué à CXCL8 dans certains types de cancers : du pancréas, les cancers pulmonaires à grandes cellules et les cancers des voies aériennes digestives supérieures (VADS), (Zhu and Woll, 2005). Le couple CXCL12-CXCR4 permet la prolifération de tumeurs prostatiques, de glioblastomes et de myélomes, (Bian et al., 2007; Hideshima et al., 2002; Sun et al., 2003). La signalisation déclenchée par transduction de CXCR4 essentiellement par l'intermédiaire de la voie dépendante de Akt a également été associée à la régulation de la survie d'autres types

de cancer (Barbero et al., 2003; Kijima et al., 2002; Zhou et al., 2002). De façon intéressante, CXCL9 et CXCL10 souvent classées comme CKs anti-tumorales de par leur propriété angiostatique (Johrer et al., 2008) ont également été identifiées comme acteurs dans la boucle de prolifération autocrine et la dissémination de cellules cancéreuses dans des modèles de mélanomes et cancers colorectaux (Robledo et al., 2001; Zipin-Roitman et al., 2007).

- Chimiokines comme facteurs angiogéniques

Les chimiokines sont impliquées dans la progression tumorale par leur aptitude à moduler l'angiogénèse et favoriser la néo-vascularisation à partir de veinules post capillaires. L'extension de la vascularisation tumorale est un élément essentiel de développement, elle est responsable de l'apport d'oxygène et d'éléments nutritifs (Norrby, 1997) et semble survenir majoritairement par angiogénèse souvent indépendante de l'apport de précurseurs de cellules endothéliales issues de la moelle osseuse. La vascularisation de la tumeur s'initie suite à un changement d'équilibre au sein du microenvironnement tumoral en faveur de l'expression de gènes pro-angiogéniques. L'expression de ces gènes est notamment induite par des facteurs physiologiques comme l'hypoxie générée par l'augmentation de la masse tumorale mais également par l'activation d'oncogène ou par la mutation d'un gène suppresseur de tumeur (Bergers and Benjamin, 2003).

Les principales chimiokines angiogéniques font partie des CXC-CKs ELR+ (Belperio et al., 2000; Strieter et al., 1995a). Parmi elles, CXCL8 a été associée à la promotion de la vascularisation de la cornée en agissant directement sur la chimiotaxie et la prolifération de cellules endothéliales dans un modèle de rat (Koch et al., 1992; Strieter et al., 1995b). Le rôle de la signalisation induite par CXCL8 via CXCR2 a été associé à l'angiogénèse dans des modèles murins de cancer du poumon et du rein (Keane et al., 2004; Mestas et al., 2005). Chez l'homme, des quantités plus élevées de CXCL8 ont été mesurées dans des tumeurs pulmonaires comparées à celles des tissus pulmonaires sains. La neutralisation de CXCL8 diminue fortement le programme pro-angiogénique de la masse tumorale (Smith et al., 1994). Des niveaux élevés de CXCL8 ont été détectés dans les sérums de patients atteints de cancers prostatiques, mammaires et corrélerent avec le stade d'évolution de la tumeur (Aalinkeel et al., 2004; Benoy et al., 2004; Veltri et al., 1999). Dans des modèles murins de

xénogreffe de cancer ovarien, l'expression de CXCL8 est associée à la vascularisation des tumeurs et à une réduction de la survie (Yoneda et al., 1998). D'autres CKs ELR+ ont été identifiés comme pro angiogénique comme CXCL5 dans les cancers pulmonaires à grosses cellules ou CXCL1 et CXCL3 dans des cancers du rein (Arenberg et al., 1998; Mestas et al., 2005).

Les chimiokines ELR- sont, quant à elles, connues pour inhiber la néo vascularisation (Belperio et al., 2000; Strieter et al., 1995a). Dans de nombreux cas, l'apport (par injection ou transfert de gène) de CXCL9 et CXCL10 au sein d'une tumeur inhibe l'angiogénèse. (Arenberg et al., 1996; Sgadari et al., 1996a; Sgadari et al., 1997). L'activité angiostatique de ces CKs est directement liée à l'activation de CXCR3 exprimée par les cellules endothéliales (Romagnani et al., 2001). D'autres études ont mis l'accent sur l'effet anti-tumoral indirect de CXCL9 et CXCL10 par le recrutement de cellules effectrices CXCR3+ comme les LTs et les cellules NK capables d'altérer les vaisseaux tumoraux (Charo and Taubman, 2004; Sgadari et al., 1996b). A l'inverse, une autre CK ELR- CXCL12 est connue pour posséder un rôle pro-angiogénique par sa capacité à induire le recrutement, la prolifération des cellules endothéliales ainsi que de stimuler leur sécrétion de VEGF et leur formation de tube (Salcedo et al., 1999). Cependant, l'effet pro-angiogénique de CXCR4 n'est pas généralisable dans la mesure où son inhibition dans le modèle de cancer pulmonaire à grandes cellules ne réduit pas la vascularisation tumorale (Singh et al., 2007).

Chimiokines et formation de métastases

Les métastases correspondent à des implantations secondaires dans un organe distant d'une tumeur maligne. L'implication des CKs et RCKs dans la dissémination des cellules cancéreuses n'est pas surprenante dans ce processus. La distribution particulière des métastases a initialement été décrite par Paget en 1889 et dénommée « seed and soil hypothesis ». Cette hypothèse propose que la formation de métastases dépende d'un dialogue entre des cellules cancéreuses sélectionnées [the « seeds » (les semences)] et le microenvironnement spécifique d'un organe [the « soil » (le sol)]. Cependant, c'est Muller et ses collaborateurs qui ont démontré que le réseau des CKs et de leurs récepteurs influent sur la localisation métastatique des cancers mammaires (Muller et al., 2001). Cette étude corrèle l'expression de CXCR4 et CCR7 à la formation métastatique dans les ganglions lymphatiques, les poumons, le foie et la moelle osseuse, tous ces organes produisant une

Epithélium mammaire

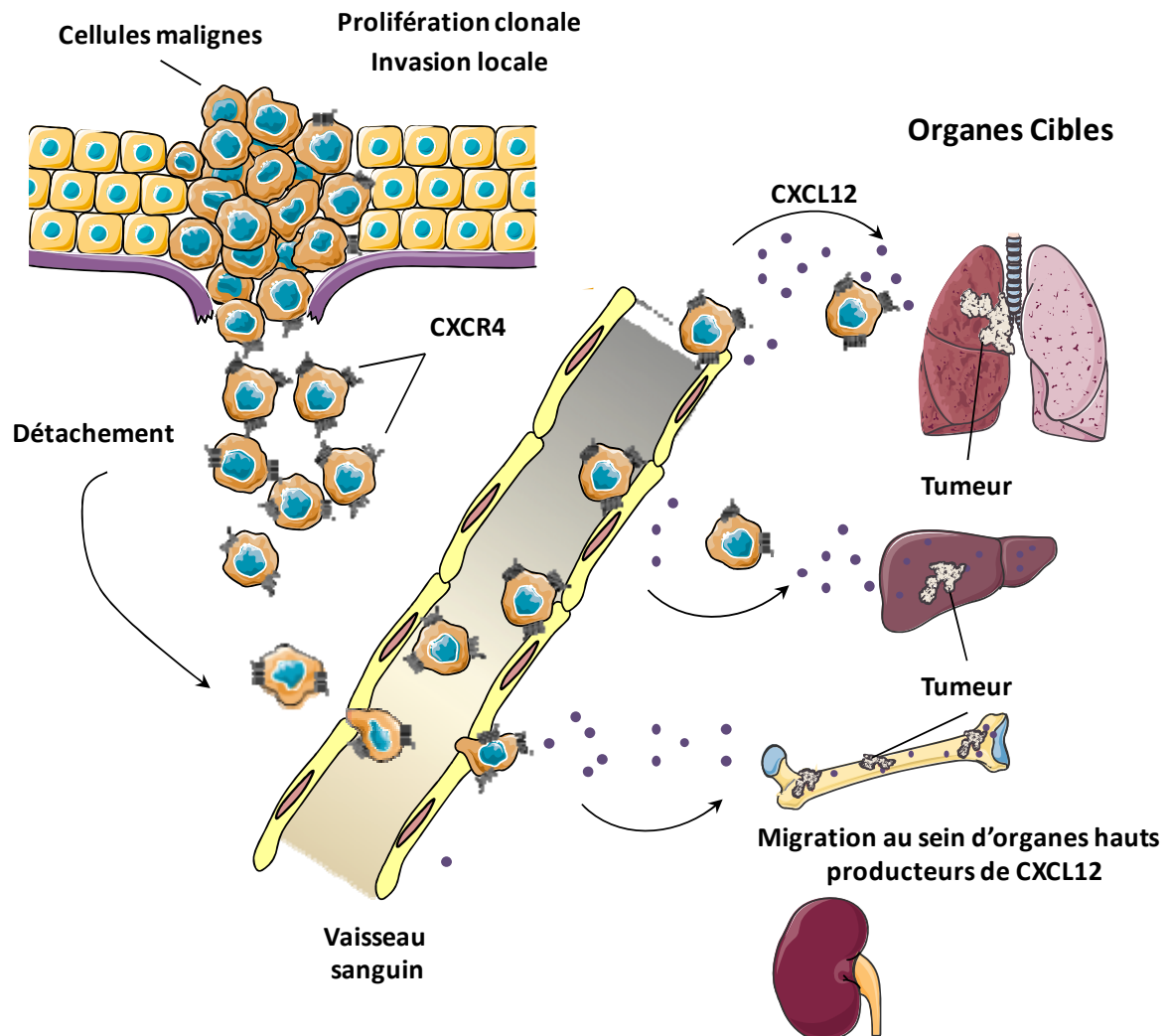


Figure 16: Rôle des chimiokines dans la formation de métastases issues d'un cancer mammaire.

Certaines cellules cancéreuses se détachent de la tumeur primaire et rejoignent la circulation sanguine ou lymphatique. Les cellules CXCR4+ sont recrutées et s'arrêtent au niveau des organes produisant d'importantes quantités de CXCL12, comme le poumon, le foie et la moelle osseuse. Les cellules cancéreuses recrutées dans des tissus sains prolifèrent et forment des tumeurs métastatiques. La plupart du temps les cancers mammaires ne forment pas de métastases dans les organes faibles producteurs de CXCL12 comme le rein. (Muller et al., 2001; Murphy, 2001).

grande quantité des ligands respectifs CXCL12 et CCL21 (Figure 16). Lors du développement tumoral, de nombreux RCKs peuvent être anormalement exprimés par les cellules tumorales, ce qui leur confère un potentiel métastatique (Kakinuma and Hwang, 2006; Murphy, 2001).

De façon intéressante, l'hypoxie est un facteur d'induction de l'expression de CXCR4 mais aussi de CCR2, CCR5 et CCR7 (Bosco et al., 2004; Schioppa et al., 2003; Wilson et al., 2006). CXCR4 a été décrit dans plus d'une vingtaine de tumeurs malignes différentes et semble être un RCK d'expression majeur sur les cellules cancéreuses (Balkwill, 2004b). L'expression de CXCR4 est associée à un mauvais pronostic clinique dans les cancers de l'œsophage et les mélanomes. Dans les cancers du sein, l'expression simultanée de CXCR4 et CCR7 est un marqueur prédictif de l'invasion métastatique des ganglions lymphatiques. CXCR4 est aussi associée à l'invasion métastatique dans le cancer colorectal, de la prostate, pancréatique et ovarien.

D'autres RCKs sont impliqués dans la formation des métastases. CCR4 est suspecté de promouvoir la métastase de cellules cancéreuses de poumon vers la moelle osseuse dans des zones riches en CCL22. L'expression de CCR2 est associée à la dissémination des myélomes et à la progression du cancer de la prostate, CCR6 est associée à la métastase des cancers colorectaux. CCR4 et CCR10 sont associées à l'invasion de cellules tumorales dans la peau (O'Hayre et al., 2008; Singh et al., 2007).

Le rôle des CKs dans la dissémination métastatique ne se limite pas au contrôle dirigé de la migration cellulaire. Le détachement des cellules cancéreuses au niveau de la tumeur primaire, l'invasion à travers la matrice extracellulaire, la destruction de la membrane basale et l'entrée dans la circulation sont des étapes essentielles au processus de dissémination (Figure 17). Ces fonctions cellulaires dépendent de l'activité d'enzymes protéolytiques comme les métalloprotéases (MMPs) (Vicari and Caux, 2002), l'expression desquelles pouvant être régulée par des CKs. En effet, l'expression de CXCL8 est responsable de l'initiation de la transcription du gène codant la MMP-2 ainsi que du renforcement de son activité collagénase, ce qui potentialise la dissémination des cellules de mélanome humain (Luca et al., 1997). Dans le cancer de la prostate, CXCL8 favorise l'envahissement et le potentiel métastatique par induction d'expression de MMP-9 (Inoue et al., 2000).

Implication du couple CX3CL1/CX3CR1

CX3CR1 est exprimé à la surface de tumeurs prostatiques (Shulby et al., 2004), du cancer du sein (Jamieson-Gladney et al., 2011) de tumeur pancréatique, de tumeurs du système nerveux (gliome et neuroblastome) (Marchesi et al., 2010) et dans les leucémies lymphoïdes chroniques (Ferretti et al., 2011). De par ses propriétés structurales et fonctionnelles uniques, CX3CL1 est une CK capable de participer à l'extravasation, à la migration dirigée, à l'adhésion et à la survie des cellules tumorales qui expriment CX3CR1. L'axe CX3CL1/CX3CR1 est également impliqué dans la dissémination et la formation métastatique. En effet, son expression a été associée à la formation de métastase dans le cerveau (Andre et al., 2006). Il facilite la transmigration de cellules de neuroblastomes à travers les cellules endothéliales médullaires et participe à la formation de métastases médullaires (Nevo et al., 2009).

Plus récemment, il a été démontré que CX3CR1 est directement impliqué dans l'arrêt des cellules métastatiques issues d'un cancer du sein dans les tissus osseux, par l'intermédiaire de ses fonctions de chimiotactisme et d'adhérence (Jamieson-Gladney et al., 2011). La surexpression de CX3CR1 augmente l'aptitude de cellules mammaires cancéreuses à se loger dans les tissus osseux (Fong et al., 2002a). L'arrêt des cellules circulantes sur les cellules osseuses est fortement dépendant de leurs interactions spécifiques d'adhésion avec les cellules endothéliales bordantes des sinusoides médullaires (Glinskii et al., 2005; Lehr and Pienta, 1998; Scott et al., 2001).

L'axe CX3CL1/CX3CR1 joue aussi un rôle dans la cicatrisation et l'angiogénèse (Ishida et al., 2008). En effet, la déficience en CX3CR1 provoque un défaut de cicatrisation et de la formation de néo vaisseaux. Ce défaut est caractérisé par une diminution des macrophages infiltrant la lésion ainsi que par la diminution de leur production de TGFB1 et de VEGF. Le CX3CL1 est également impliqué dans l'angiogénèse tumorale (Ren et al., 2007). L'inhibition de son expression par un ARN anti sens dans un modèle de mélanome murin (B16) conduit à une inhibition de la croissance tumorale ainsi qu'à une diminution de la densité des micro vaisseaux au sein de la tumeur. Dans un modèle de cancer du sein, l'inhibition de CX3CR1 à l'aide d'un anticorps bloquant conduit à une diminution du recrutement des macrophages corrélée à une diminution de l'angiogénèse de la tumeur (Reed et al., 2012).

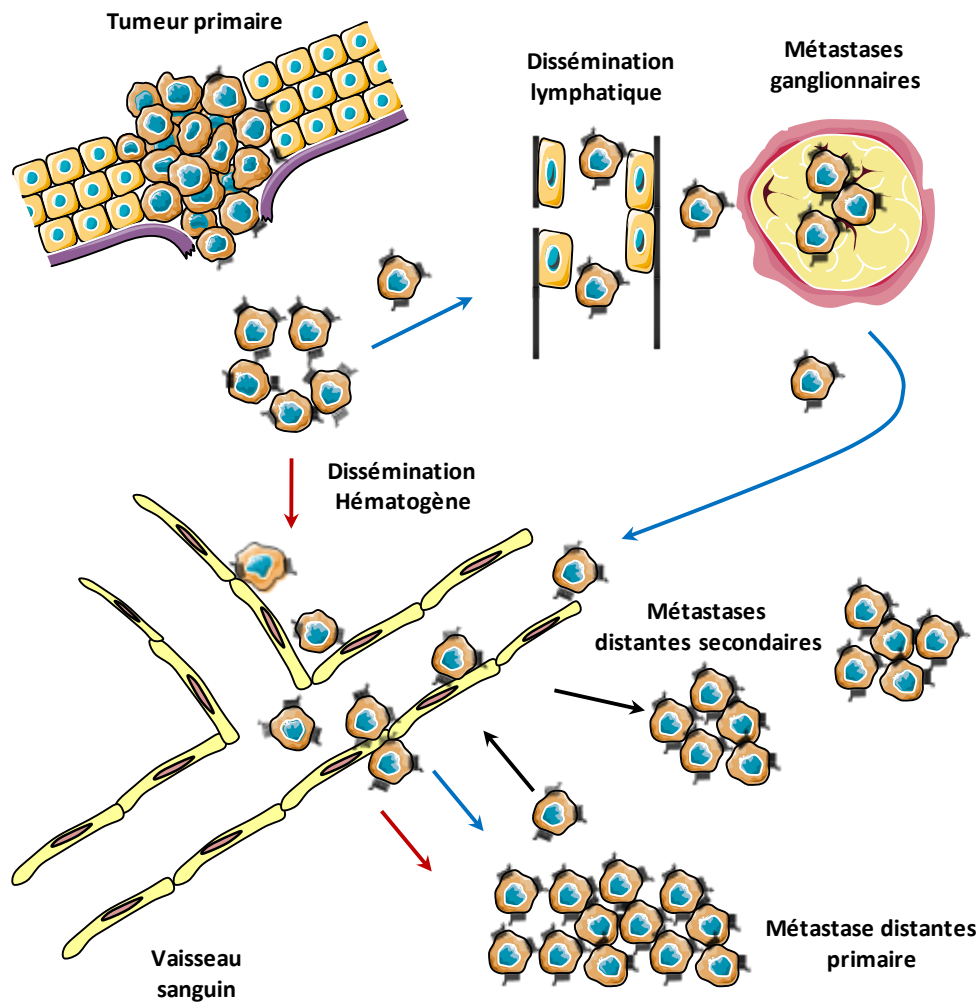


Figure 17 : Différentes voies métastatiques

Les cellules tumorales peuvent se disséminer par l'intermédiaire de deux voies : la voie lymphatique (flèches bleues) ou la voie sanguine (flèches rouges). Dans le premier cas, les cellules tumorales peuvent proliférer dans les ganglions en y formant une tumeur solide. Ces cellules peuvent ensuite rejoindre la circulation sanguine et coloniser un autre organe (métastase secondaire). Dans le second cas, les cellules utilisent la circulation sanguine pour se disséminer et forment des métastases au niveau d'organes distants. La dissémination à partir d'une métastase primaire vers d'autres organes forme des métastases secondaires (flèches noires). D'après (Pantel and Brakenhoff, 2004).

Ainsi, les chimiokines et leurs récepteurs sont impliqués dans le cancer selon plusieurs aspects (Figure 18). Le développement d'outils ciblant ses acteurs constitue donc un intérêt conséquent. Au regard des nombreuses pathologies associées au CKs et leurs récepteurs, l'industrie pharmaceutique s'est investie dans le développement d'outils thérapeutiques aux propriétés agonistes ou antagonistes des récepteurs, visant à moduler leurs effets (Wells et al., 2006).

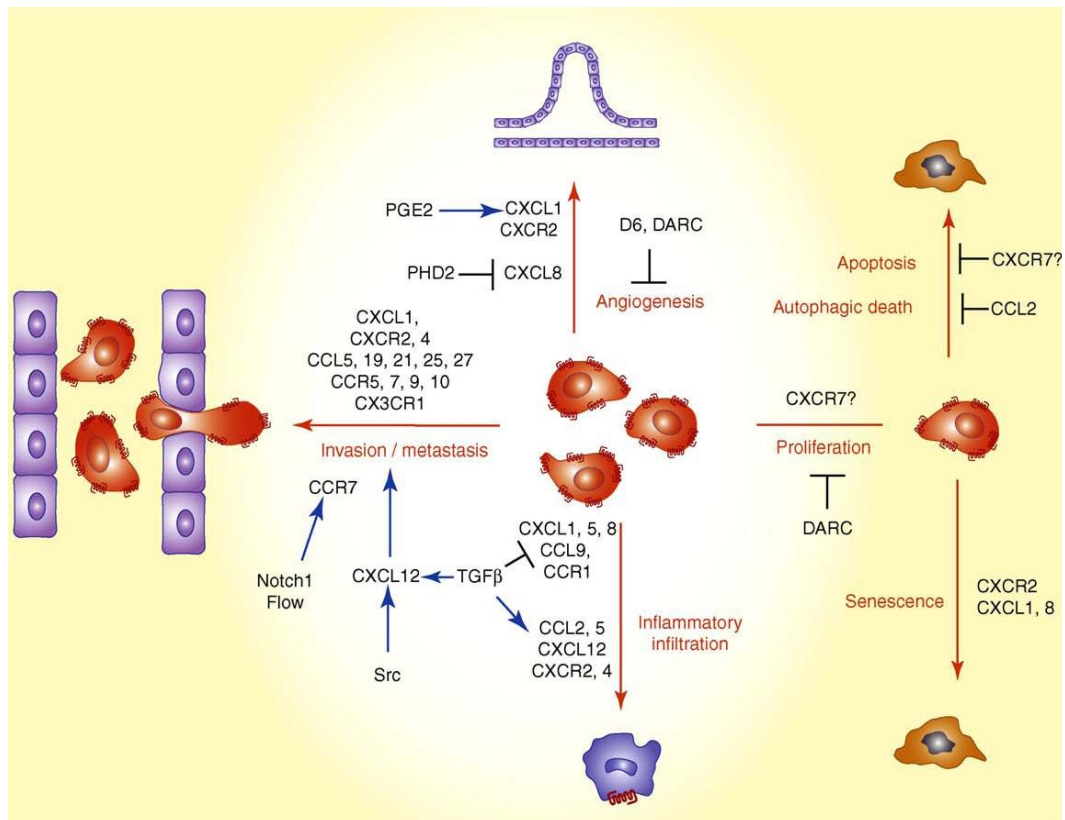


Figure 18: Fonctions pléiotropiques des chimiokines dans le processus cancéreux.

Les chimiokines peuvent moduler l'angiogénèse, la prolifération, l'invasion, l'apoptose et la sénescence des cellules tumorales (cellules rouges) mais participent également à l'infiltration leucocytaire au sein de la tumeur. Des travaux récents suggèrent que CXCR7 pourrait être impliqué dans le contrôle de la prolifération tumorale et l'inhibition de l'apoptose. CCL2 inhibe la mort autophagique. Le contrôle de la sénescence des cellules tumorales est finement régulé par CXCR2 et ses ligands CXCL1 et CXCL8. Les récepteurs DARC et D6 pourraient être des régulateurs négatifs de l'angiogénèse. A l'inverse CXCL1 et CXCL8 via CXCR2 sont pro-angiogéniques. L'expression de CXCL1 est induite par la prostaglandine E2 (PGE2) alors que la prolylhydroxylase 3 (PHD2) régule négativement l'expression de CXCL8. La migration des cellules cancéreuses vers des sites métastatiques spécifiques est étroitement contrôlée par les CKs CXCL1, CXCL8, CXCL12, CCL5, CCL19, CCL21, CCL25, CCL27 et CX3CL1 et aux RCKs CCR5 CCR7 CCR9 CCR10 et CX3CR1. L'expression de CXCL12 est induite par Src et module la dissémination métastatique. CCR7 dont l'expression est contrôlée par notch1 est également impliqué dans la dissémination métastatique. Plusieurs études ont mis en évidence le rôle central du TGFβ dans le contrôle de l'expression de CXCL12 CCL2, CCL5, CXCR2 et CXCR4 qui vont promouvoir le recrutement de cellules inflammatoires. Néanmoins, le TGFβ inhibe l'expression de CXCL1, CXCL5, CXCL8, CCL9 et CCR1, ce qui module également le recrutement leucocytaire. D'après (Lazennec and Richmond, 2010).

E Agonistes /Antagonistes des chimiokines et de leurs récepteurs

Comme nous l'avons vu, les CKs jouent un rôle conséquent dans le développement tumoral. Ainsi, le ciblage de ces molécules ou de leur(s) récepteur(s) peut constituer un axe de recherche thérapeutique prometteur. Différents types de molécules ont été mis au point.

Les molécules chimiques

L'approche pour le développement d'antagonistes de CK la plus répandue consiste à concevoir des molécules chimiques spécifiques de faible poids moléculaire ciblant les récepteurs de CKs. La plupart des antagonistes chimiques des RCKs se sont montrés prometteurs dans les tests fonctionnels précliniques, néanmoins, peu d'entre elles se sont révélées efficaces au cours des essais cliniques. Ainsi, parmi les 19 RCKs, 10 ont été ciblés par diverses entreprises pharmaceutiques et seulement 4 inhibiteurs ciblant respectivement CCR9, CCR5, CXCR1-CXCR2 et CXCR4 ont donné des résultats probants. L'inhibiteur de CCR9 (CCX282 ou Traficet-EN™) est actuellement testé en essais cliniques de phase III dans le traitement des formes modérées et sévères de la maladie de Crohn. L'inhibiteur ciblant CXCR2 et CXCR1 (SCH-527123 ou PS-291822) est actuellement testé en essais cliniques de phase II dans le traitement de pathologies telles que la Broncho pneumopathie chronique obstructive et en phase I dans le traitement de patients exposés à l'ozone (Jakob Busch-Petersen, 2008; Pease and Horuk, 2009a; Pease and Horuk, 2009b). A ce jour, deux antagonistes de CKs ont été approuvés par la FDA (Food and Drug Administration). Le premier, en 2007, est un antagoniste de CCR5 Celzentry® (ou maraviroc) qui est intégré dans la nouvelle classe de médicament inhibiteur d'entrée du HIV. Celui-ci est utilisé en combinaison avec les anti-rétroviraux chez les patients infectés par les souches HIV CCR5-tropiques. Le second, le Mozobil (=AMD3100) antagoniste de CXCR4, est utilisé en clinique dans les protocoles d'induction de mobilisation des HSCs aussi bien seul (Devine et al., 2008) qu'en combinaison avec le G-CSf (Liles et al., 2005). Son utilisation en combinaison avec le G-CSf a été approuvée par la FDA en 2008.

Les molécules peptidiques

Initialement des ligands de CKs ou des dérivés (mutants tronqués en N-terminal) ont été testés en tant qu'antagonistes, en particulier comme inhibiteur d'entrée du HIV. En ce qui concerne le HIV, de nombreux composés bloquent l'interaction entre le RCK et la protéine

virale GP120 et favorisent l'internalisation du RCK. Différentes formes modifiées de CCL5 (RANTES) telles que AOP-RANTES se sont révélées être des agents anti HIV puissants capables d'empêcher le recyclage du RCK ciblé à la surface cellulaire (Cocchi et al., 1995; Mack et al., 1998).

Les anticorps spécifiques des CKs et des RCKs

Le développement d'anticorps (Ac) capables de neutraliser les CKs ou les RCKs fait également l'objet de nombreuses recherches. De nombreuses molécules ont ainsi été développées et leur efficacité dans des modèles pathologiques évaluée. Parmi les anticorps ciblant les CKs, un Ac monoclonal (11K2) capable de se lier à CCL2, CCL7 et CCL8 s'est montré efficace dans des modèles murins de traitement de l'athérosclérose (Lutgens et al., 2005). Certaines pathologies impliquent plusieurs chimiokines. Il pourrait donc être bénéfique de cibler plusieurs RCKs simultanément. La relation entre l'homologie de structure et l'activité commune de certaines CKs a conduit au développement de stratégies visant à mettre au point des Ac capables de se lier avec une grande affinité à plusieurs CKs (Fagete et al., 2009). Dans cette étude, les chercheurs ont mis au point, à l'aide d'une technique de phage display, un anticorps capable de lier CXCL9 et CXCL10. Plus récemment, des chercheurs ont mis au point un Ac potentiellement efficace dans les maladies inflammatoires chroniques capable de neutraliser CCL3, CCL4, CCL5 (Scalley-Kim et al., 2012). Des Ac ciblant les RCKs ont également été développés. Le RCK qui a suscité le plus d'intérêt est CCR5 de par son importance dans le cadre des recherches sur le HIV. Ainsi de nombreux Ac spécifiques de ce RCKs ont été mis au point et ont montré une activité antivirale in vitro (Olson et al., 1999; Wu et al., 1997). De plus, des études cliniques ont montré que les Ac anti-CCR5 sont des agents anti rétroviraux potentiels et possèdent une activité prolongée suite à leur administration en une seule dose (Révisé dans (Olson and Jacobson, 2009)).

Un autre type d'inhibiteur de RCK a plus récemment été utilisé. Un ARN anti-sens couplé à des nanoparticules ciblant la transcription de CCR2 a été mis au point par le groupe de Nahrendorf. Il s'est montré prometteur dans divers modèles murins d'athérosclérose, de réparation des lésions suite à un infarctus du myocarde et de croissance tumorale (Leuschner et al., 2011).

CX3CR1, quant à lui, est une cible d'intérêt car il ne comporte qu'un ligand connu à ce jour, le CX3CL1. Il a été développé au sein du laboratoire par la méthode du « phage display » un antagoniste de CX3CR1 qui est un variant chimiokinique du ligand naturel de CX3CR1 modifié en N-terminale. Cet analogue chimiokinique supprime *in vitro* les réponses calciques d'adhésion et de chimiotactisme au CX3CL1 natif. *In vivo*, il inhibe fortement le recrutement des macrophages dans un modèle murin de péritonite (Dorgham et al., 2009). Comme nous le verrons, l'utilisation de cet antagoniste m'a permis d'étudier l'implication de l'axe CX3CL1/CX3CR1 dans le comportement et la mobilisation des monocytes médullaires.

En plus de leur rôle thérapeutique potentiel, ces molécules sont des outils utiles dans l'exploration et la compréhension du rôle des RCKs. Ainsi, ils pourraient permettre l'émergence de nouvelles stratégies de traitement des maladies inflammatoires. Les avancées récentes dans le domaine de la cristallisation des RCPGs humains qui ont permis la mise en évidence de la structure du CXCR4 (Wu et al., 2010) vont contribuer à améliorer la compréhension des fonctions de ces molécules. En synergie avec les technologies émergentes telles que le criblage *in silico* des liaisons ligand-récepteur, de nombreuses molécules antagonistes de RCKs devraient être identifiées et mises sur le marché dans les dix prochaines années (Schlyer and Horuk, 2006; Vaidehi et al., 2006).

Les antagonistes ou agonistes peuvent cibler les CKs ou les RCKs de façon spécifique. L'expression des RCKs caractérise des sous-populations cellulaires et jouent un rôle majeur dans leurs fonctions. Il devient donc envisageable de cibler plus spécifiquement des populations cellulaires. Les antagonistes de CKs ou RCKs ont donc un potentiel d'inhibition de fonction pro tumoral ou d'optimisation de la réponse anti tumorale.

Nous avons, dans cette première partie, décrit les processus qui permettent aux tumeurs de se développer et se disséminer au sein d'un organisme. Les tumeurs ne se développent cependant pas au sein d'un hôte sans aucune contrainte. En effet, les cellules immunitaires chargées du maintien de l'intégrité de l'organisme vont mettre en place divers mécanismes de défense visant à contrôler la croissance tumorale et paradoxalement contribuer aux mécanismes d'échappement par subversion de leur fonction première provoquée par le microenvironnement tumoral. Nous discuterons, dans la suite du manuscrit des mécanismes d'interaction entre le système immunitaire et les tumeurs.

II Interactions entre le système immunitaire et les tumeurs

Au cours de cette deuxième partie, nous discuterons du contrôle du développement tumoral par l'organisme et du concept d'immunoédition. Nous verrons également que les tumeurs sont capables d'inhiber et/ou d'exploiter les cellules du système immunitaire en leur faveur par le biais de cellules suppressives ou régulatrices. Enfin, nous verrons que certains composés chimiothérapeutiques sont capables de réactiver transitoirement la réponse immune anti-tumorale et constituent des alliés précieux dans le domaine de la recherche en immunothérapie.

A La réponse immune antitumorale

L'hypothèse selon laquelle la croissance tumorale pourrait être contrôlée par le système immunitaire a émergé au début du XXe siècle, grâce notamment au Dr Paul Ehrlich, en supportant l'idée que l'organisme humain serait capable de faire régresser la majorité des carcinomes. Cette idée ne fut cependant pas l'objet d'un grand champ d'investigation avant le milieu du XXe siècle. Le terme d'immunosurveillance des tumeurs fut introduit plus tard en 1957 par le Dr Macfarlane Burnet (Burnet, 1957). A cette époque, le concept est également soutenu par le Dr Lewis Thomas qui assume que les lymphocytes jouent un rôle permanent de sentinelles qui combattent l'émergence de cellules transformées anormales (Burnet, 1970). La capacité d'immunisation d'animaux contre des tumeurs syngéniques puis la démonstration de l'existence d'antigènes tumoraux (Old and Boyse, 1964) ont apporté des éléments en faveur de cette hypothèse. Cependant, le concept d'immunosurveillance a longuement été remis en question car l'incidence des cancers (à l'exception des cancers viro induits) n'est pas apparue augmentée chez les souris Nude (dépourvues de thymus) (Stutman, 1974; Stutman, 1979) suggérant l'absence de fonction du système immunitaire dans le contrôle de l'émergence tumorale. Il a plus tard été démontré que la souris Nude possède un répertoire de lymphocyte T certes restreint mais néanmoins pourvu d'un récepteur spécifique de l'antigène (TCR) $\alpha\beta$ ainsi que des $LT\gamma\delta$ et des cellules NK, remettant les résultats du Dr Stutmann en question.

Dans les années 1990, le développement de souris immunodéficientes par invalidation des gènes essentiels à la réponse immune ainsi que l'apparition des anticorps monoclonaux déplétifs des lymphocytes [révisé par (Dunn et al., 2006)] ont mis en évidence le rôle des

lymphocytes dans l'apparition des tumeurs et ainsi de relancer la théorie de l'immunosurveillance. Dans un premier temps, le groupe du Dr Schreiber a montré que l'interféron γ (INF γ) contrôle la croissance tumorale et le développement de tumoral dans un modèle de fibrosarcome (Meth A). Pour ce faire ils ont inhibé l'INF γ à l'aide d'anticorps neutralisant ou induit l'expression d'un dominant négatif de son récepteur (INF γ R1) (Dighe et al., 1994). Dans ces conditions, les tumeurs croissent plus efficacement et sont moins immunogéniques. Par la suite des souris insensibles à l'INF γ (INF γ Récepteur^{-/-} ou Stat1^{-/-}) ont été créées. Des travaux ont permis de mettre en évidence une sensibilité accrue à l'induction de tumeur par injection de méthylcholanthrène (MCA) au sein de ces souris par rapport aux souris sauvages (Kaplan et al., 1998). L'activité cytotoxique anti-tumorale des cellules immunitaires a été mise en évidence grâce à l'utilisation de souris invalidées pour le gène de la perforine (Pfp^{-/-}) (molécule impliquée dans l'effet cytotoxique des LTs, NKs et NKTs). Les auteurs ont montré l'importance de cette molécule dans le développement de tumeurs transplantées, induites par le MCA, viro induite (Street et al., 2001; van den Broek et al., 1996), et aussi dans des modèles de tumeurs spontanées (Street et al., 2002). Le groupe du Dr schreiber proposera de remplacer le terme immunosurveillance par immunoédition pour mieux refléter l'interaction dynamique entre la tumeur et le système immunitaire. La théorie de l'immunoédition propose que la pression de sélection engendrée par le système immunitaire sur la tumeur aboutit à une sélection de variant clonaux et donc à l'émergence de mutants capables d'échapper à son contrôle (Dunn et al., 2002).

Plus récemment, l'apparition des souris déficientes en LT, LB, et NKT obtenues par mutation des gènes Rag1 ou Rag2 a permis des avancées dans l'étude du développement tumorale. En effet, les travaux du groupe de Schreiber ont permis de démontrer que les tumeurs qui se développent au sein de souris Rag2^{-/-} sont plus immunogènes après transplantation secondaire dans des souris immuno-compétentes que celles qui se développent initialement dans des souris contrôles (immuno-compétentes). De plus, ces tumeurs sont rejetées lorsqu'elles sont injectées dans des souris sauvages (Dunn et al., 2005). Ces résultats sont en accord avec l'existence d'un phénomène de sélection des tumeurs résistantes au système immunitaire. Cette année, le groupe de Jacks Tyler a apporté une démonstration nouvelle de l'immunoédition dans un modèle de tumeurs spontanées en utilisant un modèle de souris transgéniques exprimant de façon conditionnelle l'oncogène K-ras^{G12D} et la délétion du gène

suppresseur de tumeur P53 (DuPage et al., 2012). Ils ont généré ces souris sur fond sauvage et $\text{rag2}^{-/-}$. Ils peuvent, à l'aide de ce modèle, moduler l'immunogénicité des tumeurs par expression conditionnelle d'antigènes. Les auteurs montrent: [1] une augmentation de l'incidence des tumeurs sur fond $\text{Rag2}^{-/-}$, [2] la présence de LTs spécifiques des antigènes tumoraux au sein des ganglions drainant la tumeur et la rate des souris. [3] une implication des LTs CD4 et CD8 dans le contrôle de la croissance tumorale à l'aide d'anticorps spécifiques inhibiteurs de ces Lymphocytes. [4] Enfin, Ils démontrent que les tumeurs issues des souris $\text{Rag2}^{-/-}$ ne sont pas immunoéditées à la différence des tumeurs issues de souris sauvages. L'immunoédition, au cours de cette étude est caractérisée par la perte d'expression des molécules de classe I par les cellules tumorales.

Néanmoins, il a depuis été montré par le groupe du Dr Jack D. Bui que les tumeurs sont également immuno-éditées dans des souris $\text{Rag2}^{-/-}$ et en l'absence de système immunitaire adaptatif (O'Sullivan et al., 2012). Dans cette étude, des tumeurs sont induites par le MCA dans des souris de fond sauvage, $\text{Rag2}^{-/-}$ et $\text{Rag2}^{-/-} \times \gamma\text{c}^{-/-}$ (souris dépourvues de lymphocytes NK, NKT, $\text{LT}\gamma\delta$, $\text{LT}\alpha\beta$ et lymphocytes B). Les auteurs montrent que les tumeurs issues de souris $\text{Rag2}^{-/-} \times \gamma\text{c}^{-/-}$ sont façonnées, et qu'elles subissent une édition lorsqu'elles sont transplantées au sein de souris $\text{Rag2}^{-/-}$. Les auteurs démontrent que l'édition de ces tumeurs au sein des souris $\text{Rag2}^{-/-}$ est dépendante des cellules NK et de la production d' $\text{INF}\gamma$ in vivo. Ils montrent enfin que la polarisation des macrophages vers un profil M1 (par l'administration d'un agoniste du CD40) déclenche une édition des tumeurs au sein des souris $\text{Rag2}^{-/-} \times \gamma\text{c}^{-/-}$ suggérant que les macrophages peuvent être activés et éditer efficacement les tumeurs in vivo.

Ainsi, la réponse immune anti tumorale implique différentes populations de leucocytes parmi ces cellules, les NK et les LT jouent un rôle important dans le processus d'immunoédition des tumeurs. Je vais ici discuter des propriétés et fonctions de ces deux populations dans la réponse anti tumorale.

Les cellules NK

Les cellules « natural killer » ont été ainsi dénommées de par leur capacité à lyser les cellules tumorales sans reconnaissance d'antigène ni de sensibilisation préalable. Au site inflammatoire, elles sont rapidement activées par des cytokines telles que l'IL-2, l'IL-12, l'IL-

15 et les INFs ou par des protéines de choc thermique (HSP). Leur activation peut engendrer leur prolifération, l'expression de Fas (Fas-ligand) et sécréter des molécules à activité cytotoxique (INF γ , TNF α , perforine et granzyme). Les cellules NK sont également capables d'activité cytotoxique dépendantes des anticorps (ADCC=Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity) par l'intermédiaire de l'interaction entre anticorps et le récepteur CD16 (FCGR11A) qu'elles expriment (Yokoyama and Plougastel, 2003). La réactivité des cellules NK est dépendante de l'expression de récepteurs inhibiteurs ou activateurs (Moretta et al., 2001; Moretta et al., 2000; Vivier and Anfossi, 2004).

Les récepteurs inhibiteurs des cellules NK sont caractérisés par la présence d'un motif ITIM (Immunoreceptor Tyrosine Based Inhibition Motif) au niveau de leur queue cytoplasmique. Ils ont pour ligand des molécules du Complexe majeur d'Histocompatibilité de classe I (CMH I) classique et non classique (HLA-E ou G). Le signal déclenché par l'activation de ces récepteurs induit une phosphorylation des tyrosines du motif ITIM qui recrutent alors des phosphatases telles que SHP-1 (Src homology 1 domain containing phosphatase) et SHP2 responsable de l'inhibition des fonctions effectrices NK (Moretta et al., 2001). Parmi les ITIM, on retrouve les récepteurs de la famille des Immunoglobulines KIR (Killer cell Immunoglobulin-like Inhibitory Receptor), LIR (Leucocyte Immunoglobulin like Récepteur), Lectine (KLR killer cell Lectin-like Receptor). L'activité cytotoxique d'une cellule NK ne sera inhibée qu'en présence du ligand correspondant au récepteur inhibiteur exprimé par la cellule cible. Ceci explique la capacité des cellules NK à lyser les cellules tumorales qui n'expriment pas les molécules de classe I (Whiteside and Herberman, 1995). Une cellule NK peut être activée par l'engagement de récepteur activateur. Plusieurs homologues de récepteurs inhibiteurs de type KIR, LIR à fonction activatrice ont été décrits. Ceux-ci présentent un domaine extracellulaire similaire à leurs homologues mais s'en différencie par un domaine intracellulaire tronqué ne possédant pas de séquence ITIM mais capable de s'associer à des séquences activatrices de type ITAM (Immunoreceptor Tyrosine Based Activation Motif). Parmi les protéines activatrices recensées, on distingue des membres de la super famille des immunoglobulines (NKp30, NKp44, NKp46), des lectines de type C (NKG2A) (Moretta et al., 2001). Certains ligands humains activateurs MIC (MHC Class I Related) MICA ET MICB et murin RAE (Retinoic acid early inducible et H60 (Minor Histocompatibility Antigen) sont peu ou pas exprimés par les tissus sains mais constitutivement exprimés par de nombreux

carcinomes et mélanomes (Groh et al., 1999; Vetter et al., 2002). La balance des signaux activateurs et inhibiteurs détermine l'activité anti tumorale des cellules NK. Les Nks sont des effecteurs majeurs de la réponse anti-tumorale. Ils expriment CX3CR1 qui par CX3CL1 joue un rôle important dans leur recrutement au sein de la tumeur. L'expression du CX3CR1 et du CX3CL1 par les cellules NK est stimulé par l'IL-2. En revanche l'IL-15 inhibe spécifiquement l'expression du CX3CR1 (Barlic et al., 2003; Sechler et al., 2004). La fonction anti tumorale des cellules NK a été associée au CX3CR1 dans une étude réalisée par Lavergne et al. Ces travaux ont démontré que l'induction d'expression de CX3CL1 dans un modèle de lymphome murin induit une diminution de la taille et de l'incidence de la tumeur par augmentation du recrutement de cellules NK cytotoxiques activée (Lavergne et al., 2003). Néanmoins, la plupart du temps les cellules NK sont défectueuses chez les patients atteints d'un cancer (Whiteside and Herberman, 1994).

Les Lymphocytes T

La plupart des tumeurs malignes sont infiltrées par des lymphocytes T ou TILs pour Tumor infiltrated lymphocytes comprenant des Lymphocytes T (LT) CD4 et CD8. La reconnaissance d'un antigène (présenté par l'intermédiaire d'une molécule de CMH) peut déclencher la lyse d'une cellule tumorale par un LT. Les LT peuvent induire la lyse d'une cellule tumorale par lyse directe, par sécrétion de cytokines cytotoxiques (INF γ et TNF α) ou par inhibition de sa vascularisation. Les LT CD8 font intervenir les perforines et les granzymes ainsi que la voie Fas/FasL (Apoptosis Stimulating fragment) pour éliminer leur cible. Les LTCD4 Induisent l'apoptose via la voie Fas/FasL. Les TILs sont également recrutés via la production de CKs dont CCL4 et CCL5. CCL5 peut également être sécrété par les cellules cancéreuses comme les carcinomes et les mélanomes (Luboshits et al., 1999; Mrowietz et al., 1999). La présence de CK peut être un marqueur de présence de TILs, c'est le cas pour CXCL9 et CCL22, de même la concentration de CCL5 reflète le taux de recrutement de lymphocytes T CD8 tumoraux. Pivarcsi et al ont démontré que la diminution de sécrétion de CCL27 induit une diminution du nombre de TIL qui conduit à une promotion de la croissance tumorale dans un modèle de tumeurs cutanées suggérant un rôle des LTs dans le contrôle de la croissance tumorale et un mécanisme d'échappement tumoral potentiel (Pivarcsi et al., 2007). Les TILs sont souvent associés à un bon pronostic de survie pour les patients (Clark et al., 1989; Zhang et al., 2003), ils sont parfois associés à un mauvais pronostic (Bromwich et al., 2003; Nakano et al.,

2001). Les TILs montrent souvent un défaut de fonction de cytotoxicité et une polarité Th2 inefficace dans la lutte anti-tumorale.

Aujourd'hui, le concept d'immunoédition semble démontré dans les modèles murins. Il décrit le développement tumoral en trois phases : [1] l'élimination, [2] l'équilibre, [3] l'échappement (Dunn et al., 2002) (Figure19). La phase d'élimination correspond au développement de réponses immunes anti tumorales. Certaines cellules tumorales, du fait de leur instabilité génétique et de la pression de sélection du système immunitaire, vont muter et échapper à l'immunosurveillance. Commence alors la phase d'équilibre durant laquelle certaines cellules tumorales sont détruites et de nouveaux mutants sont générés. Cette phase conduit irrémédiablement au développement de cellules tumorales ayant acquis des mécanismes de résistance efficaces. La phase d'échappement qui s'en suit est caractérisée par la perte du contrôle de la croissance tumorale par le système immunitaire et conduit au développement de tumeurs cliniquement décelables.

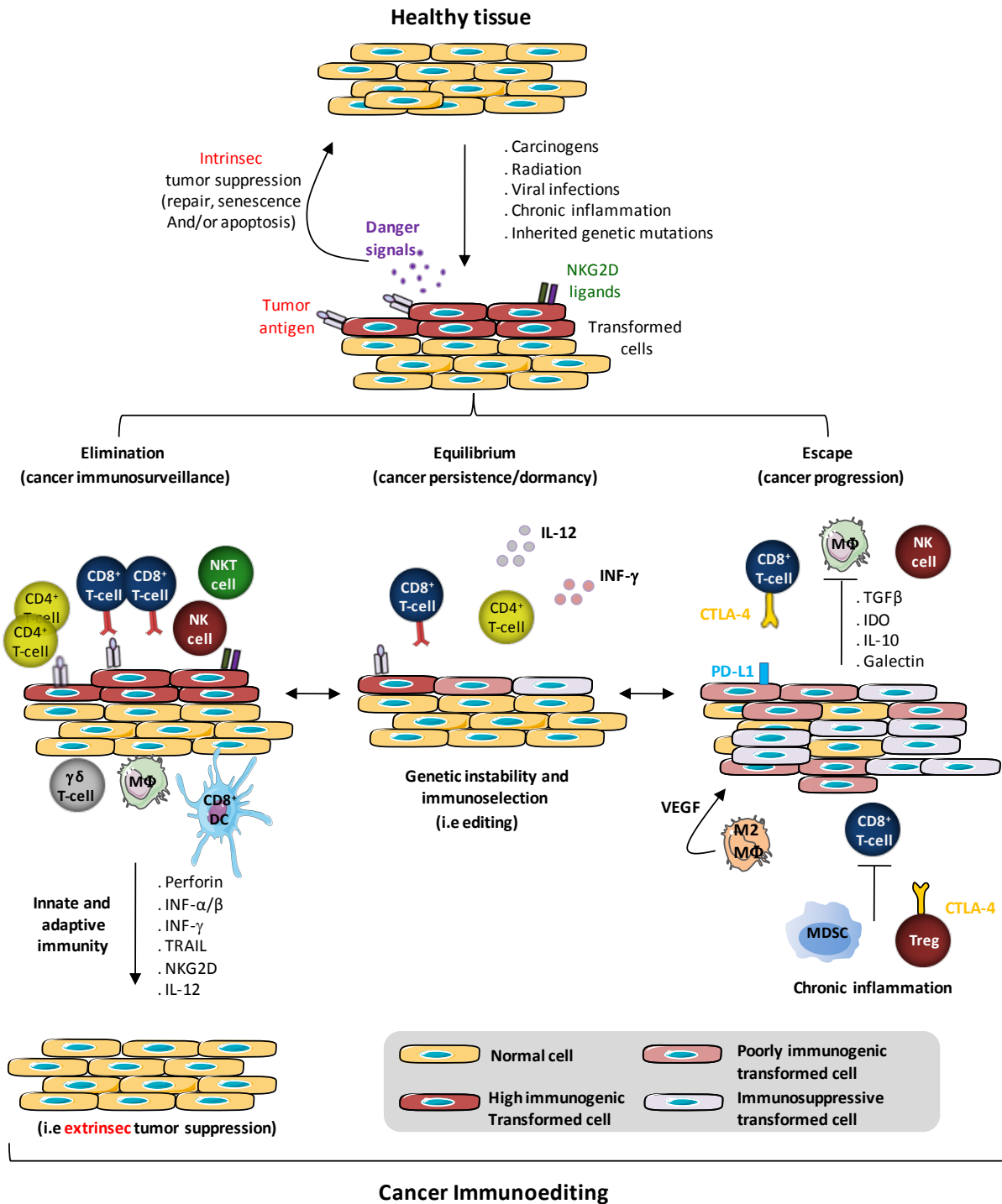


Figure 19 : Les trois phases de l'immunoédition

Les cellules peuvent se transformer sous l'influence de facteurs intrinsèques ou extrinsèques. L'immunoédition est un processus en trois étapes, elle s'initie par l'élimination des cellules tumorales par les leucocytes qui exercent une pression de sélection sur la tumeur et font émerger des cellules tumorales résistantes et conduit à l'échappement qui se traduit par l'apparition d'une tumeur cliniquement décelable. D'après (Vesely et al., 2011).

B Rôle pro tumoral du système immunitaire

Comme nous l'avons vu précédemment, le système immunitaire lutte activement contre l'émergence de cellules tumorales. Néanmoins, les cellules tumorales créent un micro environnement qui favorise leur croissance, leur développement ainsi que leur dissémination. Ainsi, elles modulent l'activité des cellules qui les entourent. Les tumeurs sont constituées de populations leucocytaires issues de la moelle osseuse aux fonctions le plus souvent altérées. Au cours du processus d'immuno-édition les cellules immunitaires interagissent avec les cellules tumorales. L'immuno-subversion est un mécanisme d'échappement des cellules tumorales. Les leucocytes deviennent capables d'inhiber la réponse immunitaire anti tumorale adaptative et acquièrent des propriétés pro-tumorales. Nous discuterons plus particulièrement dans cette partie du rôle de trois populations leucocytaires qui possèdent des fonctions pro-tumorales : [1] Les lymphocytes T régulateurs, [2] les macrophages, [3] les cellules myélosuppressives.

Les lymphocytes T régulateurs

L'inhibition de la réponse immunitaire ou la tolérance des lymphocytes à l'égard de la tumeur induite par les LTs régulateurs (LTreg) sont les composantes immunosuppressives les plus étudiées. Ces lymphocytes particuliers sont caractérisés par l'expression de marqueurs membranaires : $CD4^+$, $CD25^+$, $CD127^{low}$, ainsi que par l'expression du facteur de transcription FoxP3 (Forkhead box P3). Deux sous types principaux sont décrits, les LTreg naturels issus du processus de maturation thymique classique et les LTreg adaptatifs générés à partir de LT matures en conditions particulières de co stimulation et/ou d'exposition antigénique sous-optimale (Bluestone and Abbas, 2003). Les Tregs sont capables d'inhiber la réponse immune selon différents mécanismes (Figure 20) : [1] par la production de cytokines inhibitrices telles que le $TGF\beta$ et l'IL-10 (Nakamura et al., 2001). [2] Par la lyse de LT cytotoxiques et DCs via le granzyme B, (Boissonnas et al., 2010; Cao et al., 2007; Gondek et al., 2005). [3] par l'induction d'apoptose des LT effecteurs par la déplétion locale de cytokines comme l'IL-2 et l'IL-7 (Pandiyar et al., 2007). [4] Par l'altération de la maturation et des fonctions des DCs via l'interaction entre la molécule CTLA-4 et les molécules de costimulation exprimées par les DCs (le CD80 et le CD86) (Read et al., 2000) (Fallarino et al., 2003). Cette interaction induit l'activation d'une enzyme l'indoleamine 2,3dioxygénase (IDO). L'IDO par consommation du

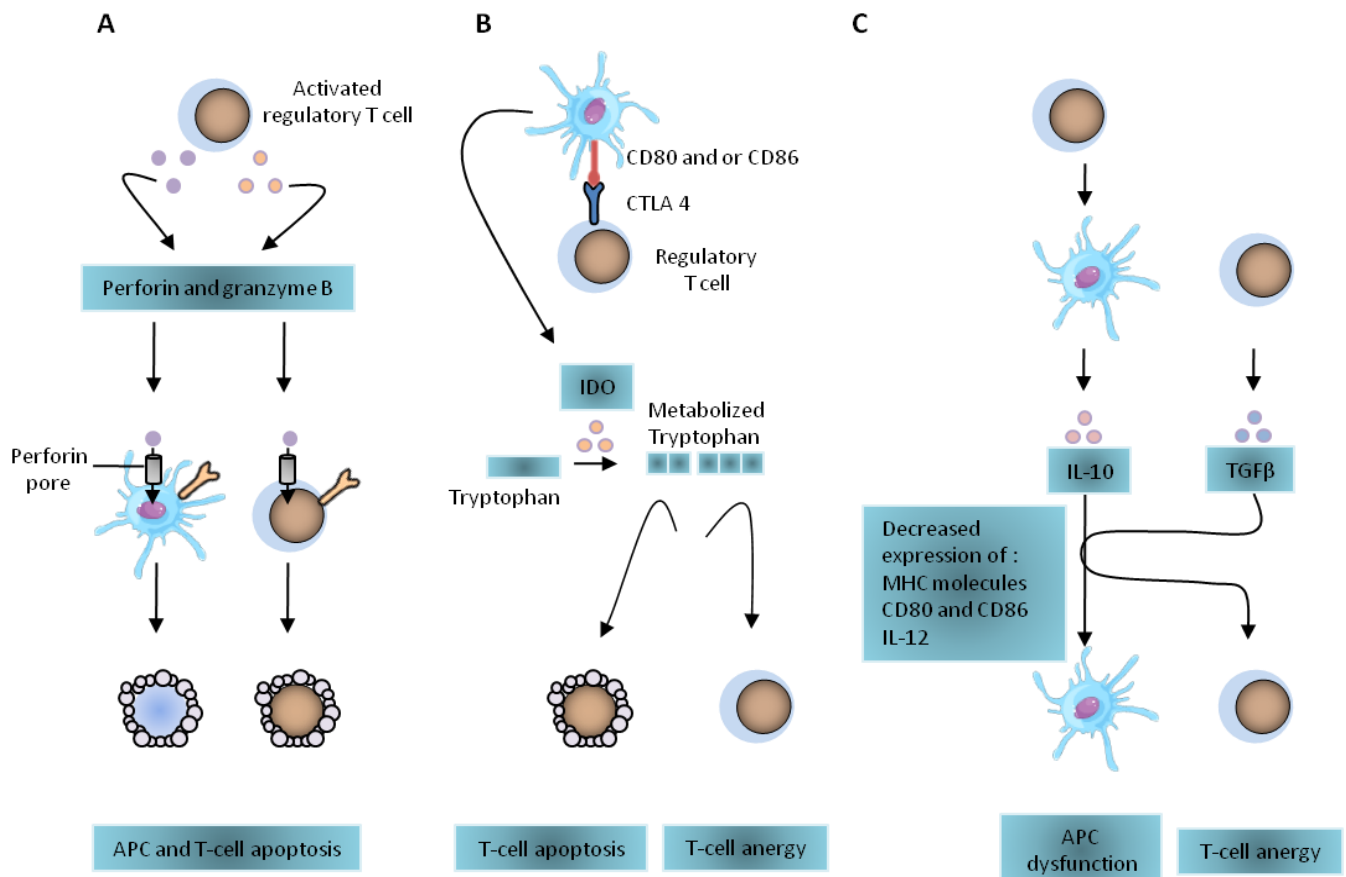


Figure 20 : Mécanismes immunosuppresseurs des LT régulateurs

Les LTreg peuvent inhiber les cellules du système immunitaire selon différentes voies. A) Par la sécrétion de perforine et de granzyme B qui déclenchent la lyse des DCs et des LTs. B) A la suite d'un contact cellulaire direct (via l'interaction CTLA4/CD80 et ou CD86,) ils provoquent la production d'IDO par la DC. L'activation de cette enzyme diminue la concentration locale en tryptophane, ce qui déclenche l'apoptose ou l'anergie des LT effecteurs. C) Par la production de cytokines immunosuppressives (IL-10 et TGFβ), qui entraînent une diminution de l'expression des molécules du CMH et de costimulation ainsi que la production de cytokines activatrices des LTs par les APCs. Ces cytokines ont également la capacité de rendre les LTs anergiques. D'après (Zou, 2006).

tryptophane conduit à une déplétion locale de ce substrat essentiel au fonctionnement des lymphocytes ainsi qu'à la production de métabolites immunosuppresseurs.

La mise en évidence de l'implication des LTreg dans la croissance tumorale dans les modèles murins a été réalisée par déplétion de ces cellules à l'aide d'anticorps anti-CD25 (Jones et al., 2002; Onizuka et al., 1999; Shimizu et al., 1999). Ces études ont montré que l'administration de l'anticorps anti-CD25 entraîne la régression de la croissance tumorale dans plusieurs modèles (leucémies, mélanomes...). De plus, elles ont montré que la réduction du nombre de LTreg est positivement corrélée à la réduction du volume des tumeurs. D'autres études ont montré que la déplétion des LTCD4 totaux conduit à une amélioration de la réponse immune anti-tumorale et peut entraîner dans certains cas un rejet efficace des tumeurs en stade avancé (Sutmoller et al., 2001; Yu et al., 2005). Néanmoins, il a été également montré que l'administration d'un anticorps anti-CD25 conduit à une régression tumorale dans des modèles de leucémies, de myélomes et de sarcomes seulement si le traitement est effectué au plus tard deux jours après l'administration de la tumeur (Onizuka et al., 1999). Ces résultats montrent donc une efficacité restreinte du traitement par le biais d'un anticorps anti-CD25. Les LTreg peuvent être recrutés au sein d'une tumeur via CCR4, CCR2, CCR5, CCR6, CCR8 (Dell'Agnola and Biragyn, 2007). La production de CCL17 et CCL22 par les Treg est associée à un mauvais pronostic dans les cancers de l'ovaire (Curiel et al., 2004). De plus, Godert et al ont démontré que les Treg recrutés via l'axe CCL22/CCR4 peuvent être sélectivement activés dans les infiltrats lymphoïdes environnant de la tumeur primaire et sont associés à un pronostic de survie défavorable dans les tumeurs mammaires (Gobert et al., 2009). Les LTreg sont donc des acteurs pro tumoraux jouant un rôle conséquent dans l'inhibition de la réponse immune antitumorale.

Les macrophages associés aux tumeurs (TAMs)

La caractérisation phénotypique des cellules phagocytaires est complexe de par l'hétérogénéité des sous populations. Chez la souris, les macrophages associés aux tumeurs (TAMs) sont constitués d'une fraction importante de cellules myéloïdes CD11b⁺ très hétérogènes contenant de nombreuses sous populations qui peuvent exprimer de façon différentielle de plusieurs marqueurs tels que le F4/80, le Ly6-C, Les molécules de classe 2, le CX3CR1, le CCR2, le cd11c, le CD62L, et le Tie2 (Movahedi et al., 2010; Quatromoni and Eruslanov, 2012). Les TAMs, les cellules myelosuppressives (MDSCs) et cellules dendritiques

(DCs) partagent de nombreux marqueurs de myéloïdes communs. Ainsi, les DCs associées aux tumeurs de par leur similitude phénotypique avec les macrophages associés aux tumeurs, telle que la capacité de co-expression du CD11c, du CD11b et du F4/80, peuvent être qualifiées de TAMs (Engelhardt et al., 2012). Les TAMs sont les leucocytes prédominants au sein des tumeurs solides (Lewis and Pollard, 2006; Pollard, 2004). Si la haute fréquence des lymphocytes infiltrant la tumeur est associée à un pronostic favorable de survie (Clark et al., 1989; Zhang et al., 2003), la présence de cellules myéloïdes au sein d'une tumeur est, quant à elle, le plus souvent associée à un mauvais pronostic de survie (Pollard, 2004). Les TAMs sont généralement caractérisés comme étant soit des macrophages polarisés de type M1 ou alternativement activés de type M2 (Gordon, 2003). Ils ont une origine monocyttaire et sont recrutés par le biais de CCL2 (Lin et al., 2001; Sawanobori et al., 2008), CCL5, CCL7, CXCL8 et CXCL12 mais également par l'intermédiaire de cytokines telles que le VEGF, PDGF et le Csf1R (Solinas et al., 2009). Les TAMs sont responsables de diverses fonctions de promotion de la croissance tumorale telles que l'angiogénèse, l'immunosuppression et l'invasion métastatique (Pollard, 2004; Zou, 2005) (Figure 21).

TAMs et contrôle de la croissance tumorale

Une étude réalisée par Lin et al dans un modèle de cancer mammaire spontané a montré que l'annulation de l'expression du gène codant le Csf-1{colony stimulating factor-1} (facteur de croissance essentiel au développement des monocytes et des macrophages) induit une réduction du nombre de TAMs et diminue la progression tumorale ainsi que le nombre de métastases (Lin et al., 2001). Priceman et al ont montré que le recrutement de ces cellules au sein des tumeurs pulmonaires, de la peau et de la prostate est régulé par l'activation du Csf1R. De plus, l'inhibition du Csf1R par un antagoniste spécifique combiné à un anticorps anti-VEGF a un effet synergique sur la suppression de la croissance tumorale et diminue fortement l'angiogénèse (Priceman et al., 2010). Les TAMs favorisent l'angiogénèse et le remodelage tissulaire par le biais de la production de VEGF et de metalloprotéinase 9 (MMP9) (Huang et al., 2002; Lewis et al., 2000). Ils peuvent également inhiber la réponse lymphocytaire T anti tumorale par production de TGF β , d'iNOS (Inducible Nitric Oxide Synthase), et de ROS (Reactive Oxygen Species) (Brys et al., 2005; Chong et al., 1999; Kusmartsev and Gabrilovich, 2005).

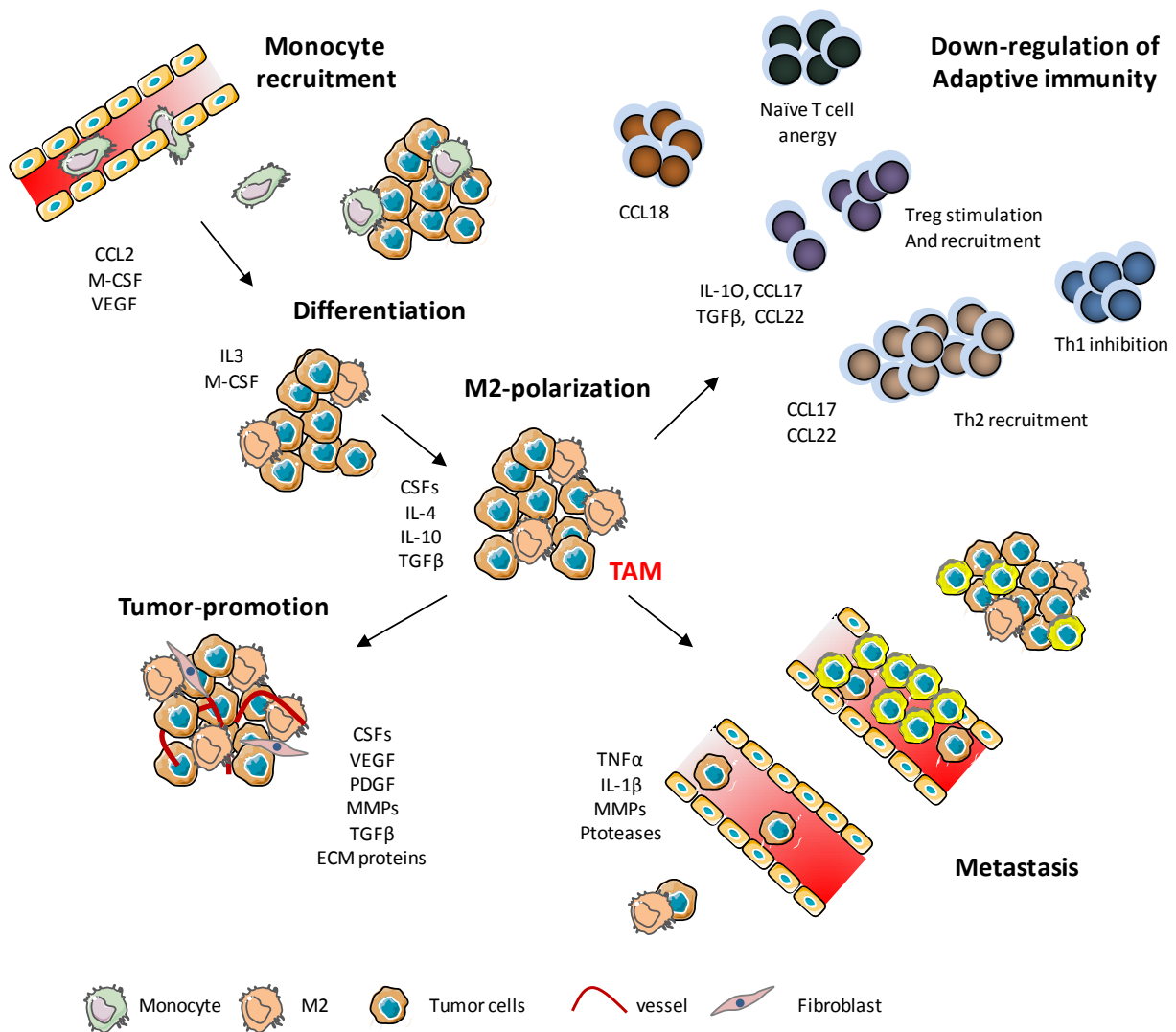


Figure 21: Rôle des macrophages infiltrant une tumeur.

Les monocytes sont principalement recrutés via CCL2, le M-CSf et le VEGF. Une fois au sein de la tumeur, les monocytes rentrent en contact avec différents cytokines telles que l'IL-3 et le M-Csf qui induisent leur maturation en macrophages (TAMs) et qui conditionnent ces cellules en induisant leur sécrétion de facteurs tels que les Csfs, l'IL-4, l'IL-10 et le TGFβ. Ces facteurs ont pour effet de promouvoir la croissance tumorale. Les macrophages associés à la tumeur ressemblent à des cellules de type M2 et jouent un rôle important dans la croissance et la progression tumorale. Ils produisent de nombreuses molécules qui soutiennent la survie des cellules malignes. Ils modifient les propriétés néoplasiques de la matrice extracellulaire en modifiant sa composition. Ils favorisent la formation de néo vaisseaux et assistent les cellules tumorales dans leur dissémination. De plus les TAMs affectent la réponse immune anti tumorale de plusieurs façons : [1] par recrutement et stimulation de LTregs. [2] Par le recrutement de Lymphocytes Th2 qui, à leur tour, inhibent les cellules Th1. [3] par induction de l'anergie des lymphocytes T naïfs, cette perversion cellulaire étant dépendante du TGFβ, de l'IL-10 ainsi que de CKs (CCL17, CCL18, et CCL22). D'après (Solinas et al., 2009).

Implication de CCR2 sur la mobilisation des TAMs

L'expression de CCL2 est associée à un pronostic défavorable et à la présence de métastases dans le cancer du sein chez l'homme (Rhodes et al., 2004; Saji et al., 2001; Ueno et al., 2000; Valkovic et al., 1998). Au niveau des sites métastatiques, une population spécifique de TAMs favorise l'extravasation, la nutrition et la persistance de la croissance tumorale (Qian et al., 2009). Ces macrophages sont issus de la différenciation de monocytes Ly6-C^{high} recrutés via CCL2 (Qian et al., 2011). Dans un modèle de cancer mammaire spontané (souris PYMT), les monocytes Ly6-C^{high} sont recrutés préférentiellement au niveau de métastases pulmonaires plutôt qu'au site primaire de la tumeur. Le recrutement de ces monocytes Ly6-C^{high} ainsi que la fonction des TAMs sont dépendants de la production de CCL2 par le stroma et les cellules tumorales. Le blocage de la signalisation CCL2-CCR2 inhibe le recrutement des monocytes ainsi que les métastases in vivo et augmente la survie dans ce modèle murin. De même, la déplétion du CCL2 produit par la tumeur diminue également la vascularisation des métastases, les monocytes Ly6-C^{high} favorisant l'extravasation des cellules tumorales via leur production de VEGF.

Les cellules Myéloïdes suppressives

La croissance tumorale est souvent associée à une myélopoïèse anormale, incluant notamment l'accumulation (ex : dans le sang et la rate) de cellules myéloïdes à capacité suppressive (MDSCs). Les MDSCs sont des cellules hétérogènes constituées de progéniteurs myéloïdes et de cellules myéloïdes immatures. Les progéniteurs myéloïdes se différencient normalement en granulocytes, monocytes, macrophages et cellules dendritiques dans la moelle. En situation pathologique telle que le cancer, un blocage partiel de la différenciation des cellules myéloïdes aboutit à une expansion et une activation des MDSCs. La tumeur peut être responsable de l'expansion de ces cellules par production de facteurs solubles (Gabrilovich and Nagaraj, 2009).

L'expansion des MDSCs est induite par la production de facteurs de croissance tels que la cyclooxygénase 2, les prostaglandines, le Stem Cell Factor (SCF), le M-CSF, le GM-CSF, et l'IL-6 impliquées dans les voies de survie, de prolifération et d'apoptose (Bromberg, 2002). Ils ont pour effet de stimuler la myélopoïèse et d'inhiber la différenciation des cellules myéloïdes matures ce qui aboutit à une accumulation de MDSCs.

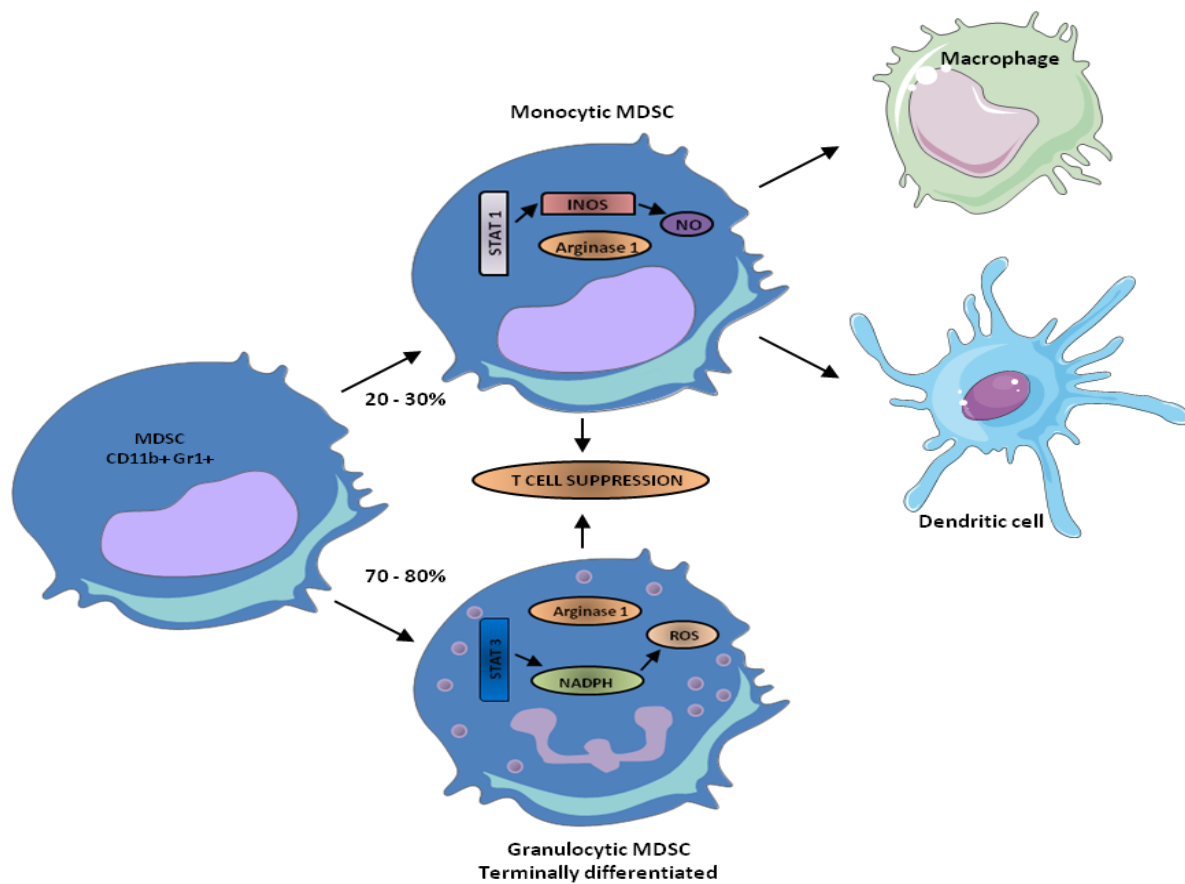


Figure 22: Différentes populations de MDSCs

Il existe deux sous populations de cellules myélosuppressives. Dans la plupart des modèles tumoraux le sous type granulocytique est majoritaire (70-80% des MDSCs). Elles sont caractérisées par la production des ROS et expriment l'arginase. Le sous type monocyttaire, quant à lui, produit principalement du NO et exprime également l'arginase. Celles-ci sont capables de se différencier en macrophage et DCs. D'après (Gabrilovich and Nagaraj, 2009).

L'activation fonctionnelle des MDSCs est induite par les cellules tumorales et les LTs. Différents facteurs ont été identifiés tels que l'INF γ , les ligands de TLRs, l'IL-4, l'IL-10, l'IL-13 et le TGF β . L'activité suppressive des MDSCs met en jeu différentes molécules, notamment la production de L-arginine 1 (substrat de deux enzymes l'arginase 1 et l'INOS), de ROS et de peroxy-nitrites (NO). Ces molécules jouant un rôle important dans l'inhibition fonctionnelle des LTs et la formation de métastases (Bronte and Zanovello, 2005; Kusmartsev et al., 2004; Nakamura et al., 2006; Rodriguez and Ochoa, 2008).

Les MDSCs infiltrantes ont été classées en fonction de leur profil d'expression d'antigènes membranaires en deux sous types distincts (Figure 22) : les MDSCs monocytaires (CD11b⁺, Ly6-C^{high}, Ly6-G⁻) et Les MDSCs granulocytaires (CD11b⁺, Ly6-C^{low}, Ly6-G⁺). [1] Les MDSCs monocytaires sont caractérisés par une surexpression de STAT1, d'INOS et de NO ainsi que par une faible production de ROS. Le NO inhibe l'activité suppressive des LTs par le biais de différents mécanismes conduisant à l'inhibition de JAK3 et STAT5, par diminution de l'expression des molécules CMH de classe II, et par induction de l'apoptose des LTs. In vitro, seul ce sous type de MDSCs peut se différencier en macrophages et DCs. Les MDSCs granulocytaires (CD11b⁺, Ly6-C^{low}, Ly6-G⁺) sont les cellules myélosuppressives majoritaires dans la plupart des modèles tumoraux (70-80%). Les MDSCs granulocytaires ont une activité de STAT3 et NADPH augmentée qui résultent en la production d'une grande quantité de ROS et une faible production de NO. La production de ROS et de NO induit une modification post traductionnelle du TCR et pourrait causer la perte de fonction des LTs. Les deux sous types de MDSCs surexpriment l'arginase 1 qui, par déplétion locale de L-arginine, inhibe l'activité des LTs (Gabrilovich and Nagaraj, 2009). Les différents mécanismes de suppression des MDSCs sont illustrés Figure 23.

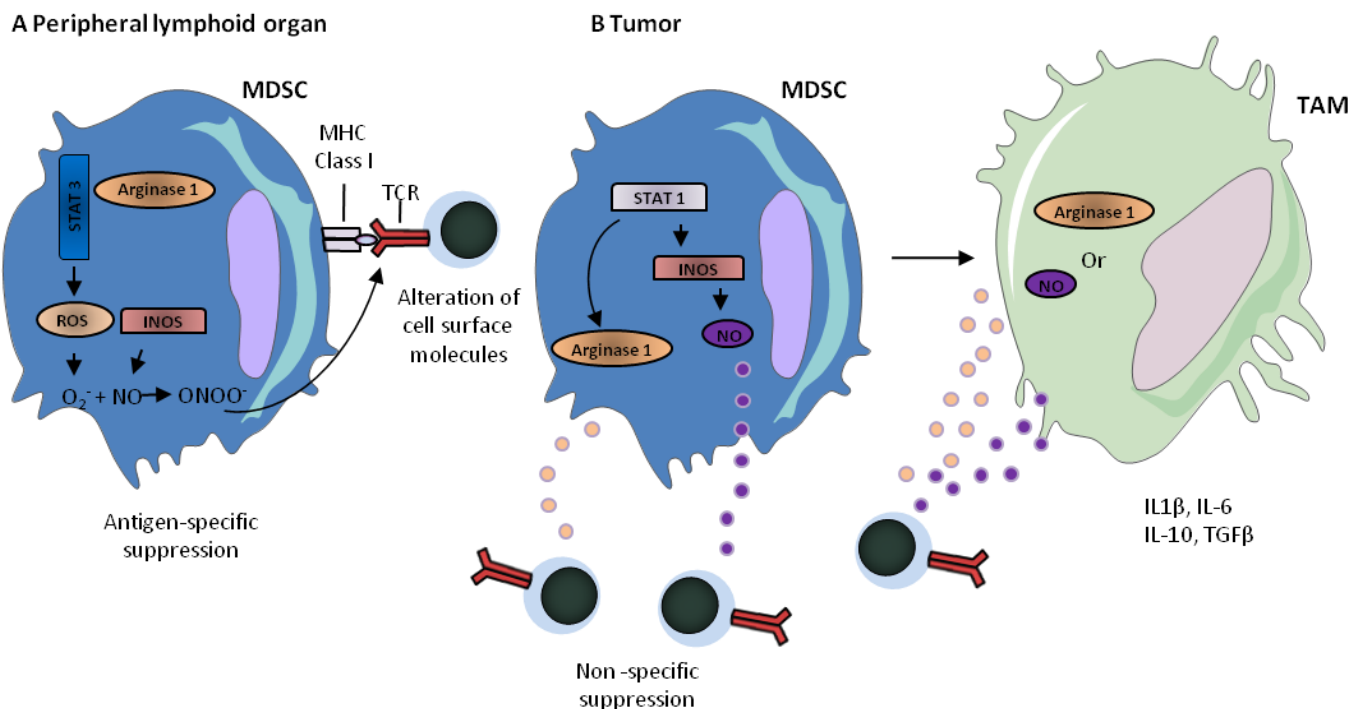


Figure 23: Mécanismes de suppression des MDSCs

Les mécanismes de suppression des MDSCs diffèrent selon le lieu d'interaction cellulaire à savoir dans les organes lymphoïdes ou au sein de la tumeur. **A)** Au niveau des organes lymphoïdes les MDSCs produisent une grande quantité des ROS et des peroxy-nitrites ($ONOO^-$) et augmente la transcription de STAT3. Ce phénomène est associé à une légère augmentation de la production d'arginase 1 et de NO. Les MDSC présentent l'antigène au LT par l'intermédiaire des molécules CMH de classe I. Le peroxy-nitrite produit par les MDSCs induit une nitrosylation des acides aminés du TCR ce qui le rend insensible à la stimulation antigénique. **B)** Au sein de la tumeur les MDSCs augmentent l'activation de STAT1, produisent une grande quantité de facteurs solubles (NO et d'arginase 1) responsables d'une inhibition non spécifique de l'antigène sans nécessiter de contact cellulaire. Les MDSCs tumorales peuvent également se différencier en TAMs et sont alors capables de produire du NO ou de l'arginase 1 mais aussi des cytokines immunosuppressives. D'après (Gabrilovich and Nagaraj, 2009)

L'immunosuppression est un facteur important dans le développement tumoral. Il est donc essentiel de pouvoir éviter ou limiter la perversion des cellules immunitaires dans le but de développer des stratégies immunothérapeutiques anti tumorales efficaces. Certains principes chimiothérapeutiques ont la capacité de moduler l'activité des cellules du système immunitaire. En effet, en plus de leur effet cytotoxique, ces agents thérapeutiques peuvent réactiver la réponse immune anti-tumorale, c'est le cas en ce qui concerne le cyclophosphamide (CP), la doxorubicine et l'oxaliplatine (Vacchelli et al., 2012). Dans le cadre de mon travail de thèse, j'ai plus particulièrement cherché à comprendre les mécanismes impliqués dans la modulation des populations myéloïdes suite à l'administration de CP et l'impact sur la réponse anti tumorale par stimulation du système immunitaire. Nous détaillerons donc dans la suite de ce chapitre les fonctions déclenchées par l'action du CP sur les cellules de l'immunité innée et adaptative en situation tumorale.

C Chimiothérapie et immuno modulation

Certains composés chimio thérapeutiques sont caractérisés par leur aptitude à moduler la réponse immunitaire. En effet, leur effet cytotoxique déclenche une mort cellulaire à propriété immunogénique (immunogenic cell death). Ce processus est dépendant de l'émission combinée de signaux de mort cellulaire spécifiques : [1] la coexposition sur le feuillet externe du réticulum endoplasmique des protéines chaperones CRT et ERp57 nécessaires à l'activation des caspase (Obeid et al., 2007; Panaretakis et al., 2008), [2] la sécrétion d'ATP nécessaire à l'activation de l'autophagie (Martins et al.), [3] la libération de la protéine HMGB1 {High mobility box group 1 chromatin binding protein} (Apetoh et al., 2007), [4] de l'exposition des protéines de stress (HSP70 et HSP90) (Heat-shock proteins) à la surface des cellules apoptotiques (Melcher et al., 1998; Srivastava, 2002).

Le cyclophosphamide (CP) est un agent alkylant dérivé du gaz moutarde ayant un effet létal sur les cellules en prolifération et génère les signaux de mort décrits ci-dessus (Vacchelli et al., 2012). Ses propriétés ont conduit à son utilisation dans le traitement de cancer tels que les leucémies, les lymphomes et les tumeurs solides (Dudley et al., 2002; Mitchell, 2003). Le CP est également utilisé dans le traitement de certaines maladies auto-immunes comme le lupus érythémateux disséminé et l'arthrite rhumatoïde {Weiner, 2002 #668} ou en combinaison avec d'autres principes actifs dans le conditionnement des receveurs avant transplantation et post allo-greffe dans la prévention de la GVHD (Luznik et al., 2010). A

forte dose (400-500mg/kg) le CP provoque une immunosuppression sévère et peut être utilisé dans le traitement de maladie autoimmune comme la sclérose en plaque (Weiner and Cohen, 2002). A l'opposé, l'administration de faibles doses (10-125mg/kg) stimule fortement le système immunitaire (Antonarakis and Carducci, 2010; Matar et al., 2002; Medina-Echeverz et al., 2011). Ainsi, de nombreuses études ont montré que le CP peut stimuler l'immunité innée et adaptative anti tumorale: [1] Le groupe de Enrico Proietti a montré que l'effet immuno-stimulant peut être déclenché par la production d'INFs de type I et l'augmentation du nombre de LTs mémoire (Schiavoni et al., 2000). [2] Salem et al ont décrit un effet anti-tumoral du CP par sa capacité à augmenter la réponse immunitaire spécifique et son effet synergique lors de sa combinaison avec le transfert adoptif de LTs CD8 spécifique d'une tumeur (Salem et al., 2007). [3] Le groupe de Blankeinstein a démontré que l'administration de CP induit un changement phénotypique des TAMS M2 (producteurs d'IL-10) en TAMS M1 (producteurs d'INF γ) (Ibe et al., 2001). [4] Bien que les mécanismes d'actions précis ne soient pas connus, les effets du CP ont aussi été associés à ses propriétés lymphoablatives (Dudley et al., 2002; Greenberg et al., 1985). Certains ont décrit le CP comme ciblant spécifiquement les populations immuno suppressives comme les LT régulateurs (Ghiringhelli et al., 2007; Lutsiak et al., 2005; North, 1982) et les MDSC (Berraondo et al., 2007). [5] Plus récemment, il a été montré que le CP favorise la différenciation de LT helper CD4 producteur d'IL-17 soutenant la réponse TH1 (Viaud et al., 2011). [6] D'autres groupes ont montré que le CP améliore l'activité anti-tumorale par induction de l'expansion de DCs à capacité de présentation croisée améliorée et/ou activité suppressive diminuée (Nakahara et al., 2010; Salem et al., 2009; Schiavoni et al., 2011). [7] L'administration de CP induit une déplétion transitoire des cellules myéloïdes suivie d'une reconstitution massive et d'une mobilisation des monocytes et des cellules granulocytaires de la moelle osseuse vers la périphérie (Levesque et al., 2002; Salem et al., 2010). A l'aide de souris déficientes en interféron de type 1 et pour le CD11b, le groupe du Dr Cole a montré que l'effet anti tumoral induit par le CP était entre autre dépendant des cellules myéloïdes reconstituées et des INFs (Salem et al., 2007). De plus, ces expériences ont permis d'associer l'effet anti-tumoral à la production d'INF α , d'IL-6 et de CCL2. La figure 24 récapitule les mécanismes immuno-modulateurs du CP. Ainsi, Le CP fait intervenir différents acteurs dont les cytokines, les CKs, les lymphocytes et les monocytes impliqués dans le développement tumoral.

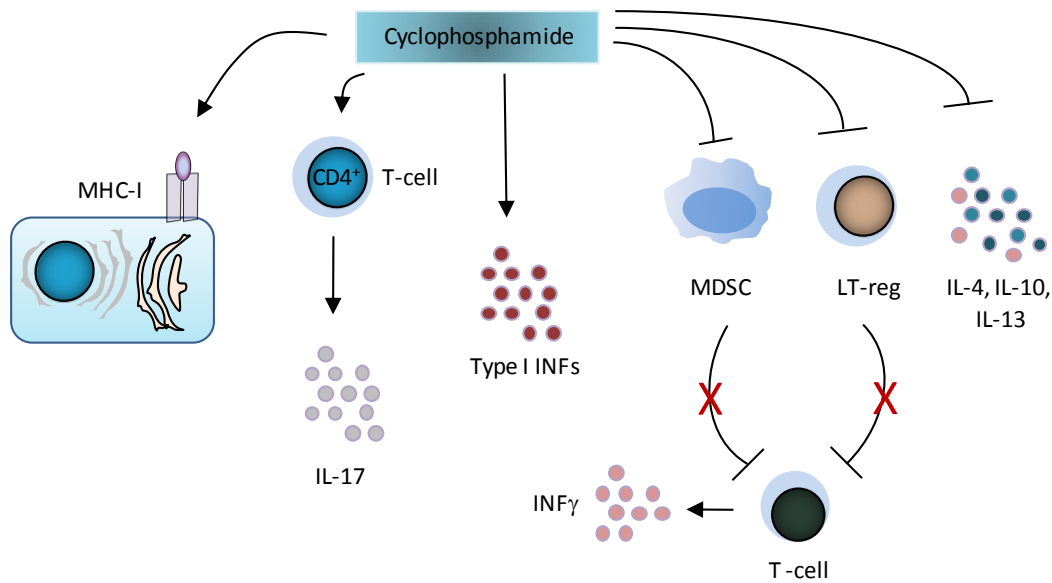


Figure 24 : Mécanismes immunomodulateurs du cyclophosphamide

Le CP peut stimuler le système immunitaire anti tumoral par différents mécanismes (de gauche à droite) : [1] par l'augmentation de l'expression des molécules de classe I sur les cellules tumorales. [2] par l'activation de LTs CD4⁺ producteur d'IL-17 soutenant la réponse Th1. Il déclenche la production d'INFs de type I favorisant la réactivation des DCs. [3] par la déplétion de cellules immunosuppressives MDSCs et LTreg. [4] par l'inhibition de cytokines immunosuppressives ou pro th2. D'après (Galluzzi et al., 2012).

Dans le cadre de mon travail de thèse, je me suis plus particulièrement intéressé aux mécanismes de mobilisation des monocytes médullaires après chimiothérapie par le CP.

En effet, nous avons mis en évidence dans un modèle tumoral une association entre la reconstitution monocyttaire et l'amélioration transitoire de la réponse immune anti-tumorale après traitement par le CP. Connaissant l'impact des populations myéloïdes sur la progression tumorale, la compréhension des mécanismes qui gouvernent la reconstitution monocyttaire au cours de la chimiothérapie a une importance capitale dans l'optimisation des protocoles thérapeutiques dans le cadre du cancer mais aussi au delà dans le cadre d'autres applications cliniques. Je décrirai donc maintenant les éléments permettant de mieux appréhender l'origine et le développement des monocytes ainsi que les mécanismes impliqués dans leur mobilisation et leur différenciation en cellules phagocytiques (macrophages et DC) dans les tissus.

III Développement et fonctions du système monocyttaire

Au cours de cette troisième partie d'introduction, nous nous intéresserons à l'origine et aux fonctions des monocytes ainsi qu'aux mécanismes régulant leur mobilisation. La moelle osseuse est l'organe producteur majeur des cellules myéloïdes. Nous commencerons par une description de l'organisation fonctionnelle et structurelle de cet organe distribué dans l'organisme. Afin d'étudier la moelle, nous avons développé un modèle explorant la moelle osseuse crânienne murine par microscopie intravitale qui permet de suivre la mobilité des cellules hématopoïétiques dans leur environnement. Nous détaillerons ensuite l'ontogénie, les propriétés fonctionnelles des monocytes ainsi que le rôle de deux RCKs (CCR2 et CX3CR1) dans ces processus.

A La Moelle osseuse

La moelle osseuse est le siège de l'hématopoïèse adulte. En situation homéostatique, elle produit quotidiennement 200 milliards d'hématies, 50 milliards de neutrophiles, 100 milliards de plaquettes. Dans des conditions particulières, elle peut augmenter considérablement cette production. C'est le cas lors du processus de régénération initié à la suite d'un traitement chimiothérapeutique myélosuppressif (ex : cyclophosphamide (Salem et al., 2010)). La moelle est constituée de deux compartiments. On distingue la moelle rouge

qui est responsable de l'hématopoïèse comprenant les cellules myéloïdes et les vaisseaux sanguins. Le deuxième compartiment, la moelle jaune, essentiellement constituée d'adipocytes. Chez l'enfant, la plupart des cavités médullaires sont occupées par la moelle rouge. Au cours de la croissance d'un organisme, les cavités graisseuses remplacent progressivement la moelle rouge. Ce phénomène est nommé involution graisseuse. Elle s'initie généralement au niveau de la partie médiane (diaphyse) des os longs (figure 26a) et de certains os plats. A l'âge adulte, seul 50% du volume médullaire est constitué de moelle rouge. Elle est retrouvée au niveau des os du crâne, des clavicules, des vertèbres, des côtes, du sternum, du bassin, des extrémités proximales du fémur et de l'humérus.

Structure et fonction de la moelle osseuse

La coupe d'un os révèle en son centre l'os spongieux, c'est sur celui-ci que repose la moelle (Figure 25a-b). L'analyse histologique de l'os spongieux permet d'identifier 4 structures distinctes, [1] le cadre osseux et les cellules fonctionnelles, [2] le compartiment vasculaire, [3] le microenvironnement, [4] le parenchyme hématopoïétique

Le cadre osseux et les cellules fonctionnelles

Le cadre osseux est la trame de soutien de la moelle hématopoïétique. Il s'organise en réseau de lamelle osseuse et est constitué de différentes populations cellulaires fonctionnelles : [1] Les ostéoblastes, d'origine mésenchymateuse, qui ont pour fonction la synthèse osseuse notamment par sécrétion de tropocollagènes, de glycoprotéines et de mucopolysaccharides. Les ostéoblastes sécrètent également des facteurs de croissance (GM-CSF, IL-1, TGF β). [2] les ostéocytes sont des ostéoblastes séquestrés dans des cavités (ostéoplastes) le long de la matrice extracellulaire osseuse. [3] Les ostéoclastes sont issus des cellules souches hématopoïétiques dérivées de la lignée monocyttaire. Ils expriment le CSF1R (Colony Stimulating Factor 1 Receptor), le RANK (Receptor of nuclear factor kappa B (NF- κ B) ligand) (Ishii et al., 2009; Teitelbaum, 2000). Ils assurent la résorption osseuse par sécrétion d'acide organique et d'enzyme protéolytique.

Le compartiment vasculaire

L'artère nourricière de la moelle osseuse traverse l'os spongieux où elle se ramifie en artérioles ascendantes et descendantes qui se dirigent vers la périphérie de l'os et se résorbent en capillaires sinusoides. Les capillaires sinusoides artériels vont se connecter aux capillaires sinusoides veineux qui à leur tour, rejoignent des veines collectrices aboutissant au sinus veineux central. (Figure 25b-c).

Les capillaires sinusoides sont constitués d'une seule épaisseur de cellules endothéliales, sans membrane basale. Ces cellules constituent la barrière médullo sanguine et régulent la libération et la rétention des cellules souches hématopoïétiques (HSCs) et des cellules myéloïdes matures. Elles sont caractérisées par l'expression du CD31, du CD34, des molécules ICAM-1, VCAM-I, et la E selectine. De plus, elles sécrètent de nombreux facteurs de croissance comme le SCF, le G-Csf, le GM-Csf, le M-Csf, l'IL-1, l'IL-6 qui participent à l'hématopoïèse.

Le microenvironnement médullaire myéloïde

Le microenvironnement myéloïde est un ensemble de cellules et de facteurs extracellulaires qui assurent aux HSCs le maintien de leur propriété d'auto-renouvellement et de différenciation. On peut définir le microenvironnement comme un tissu composé de cellules d'origine hématopoïétiques et mésenchymateuses sécrétant des molécules de structure (matrice extracellulaire) et des cytokines permettant l'établissement de niches hématopoïétiques fonctionnelles. Ainsi, les molécules de structures interviennent dans l'adhérence des précurseurs hématopoïétiques au stroma et dans la fixation de cytokines (GM-Csf, l'IL-3 et le TGF β). Les cellules mésenchymateuses du microenvironnement, quant à elles, contrôlent la sécrétion de cytokines, participent à la rétention, la prolifération, la maturation et la libération des cellules hématopoïétiques (Lazennec and Richmond, 2010; Shi et al., 2011). Le microenvironnement myéloïde est également constitué de cellules d'origine hématopoïétique. Parmi elles les macrophages sont connus pour posséder des fonctions essentielles au maintien de l'homéostasie médullaire. En effet, ils sont nécessaires à la maturation des cellules hématopoïétiques, en particulier des érythroblastes où ils occupent le centre des îlots érythroblastiques permettant notamment l'énucléation du noyau (Hanspal and Hanspal, 1994; Soni et al., 2006). De plus, ils sont impliqués dans la rétention des HSCs (Chow et al., 2011).

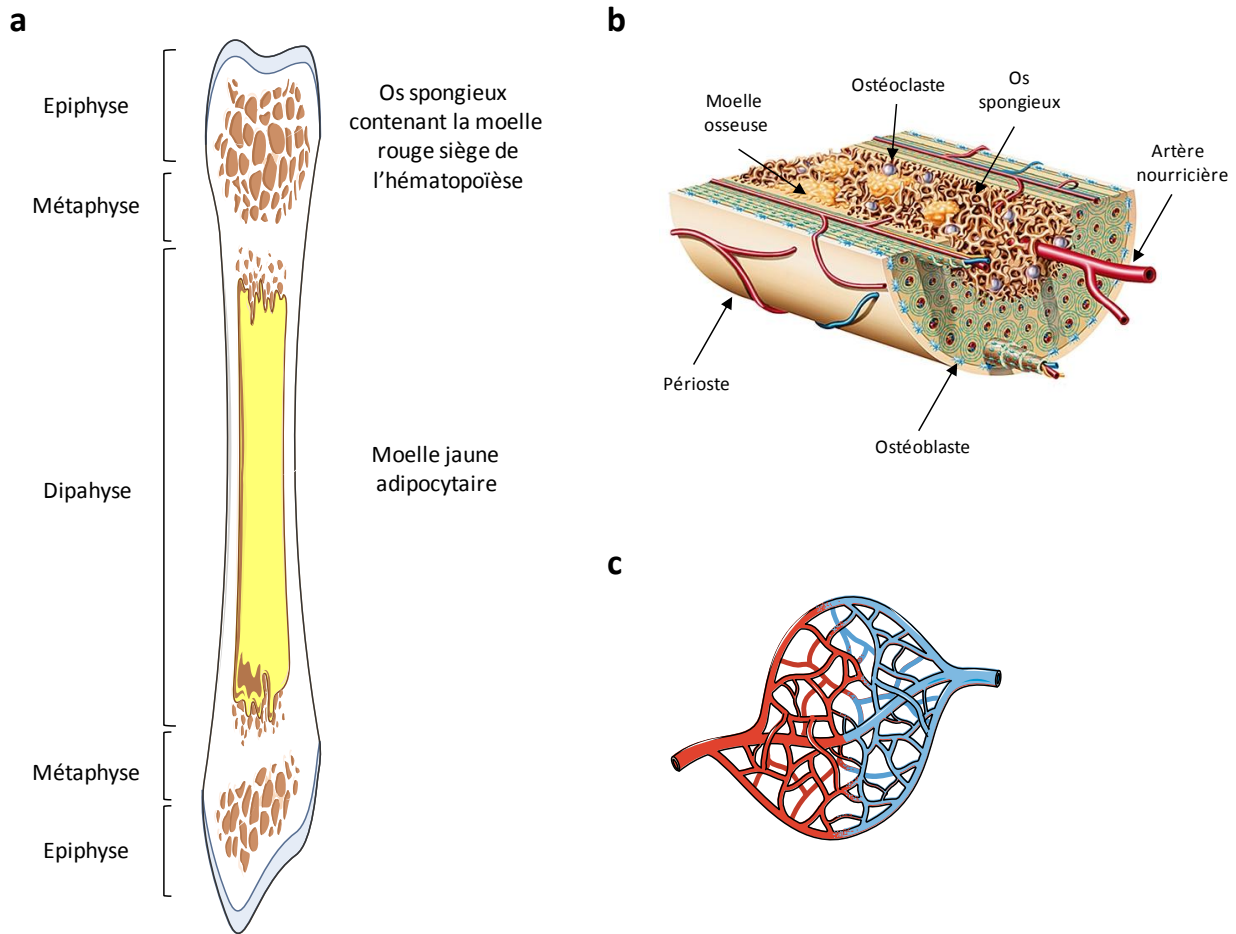


Figure 25: Composition et organisation de la moelle osseuse

a) Schéma d'un os long contenant dans sa partie médiane (diaphyse) de la moelle jaune et au niveau de ses extrémités (épiphyses) au sein d'os spongieux de la moelle rouge fonctionnelle. b) Schéma modifié d'une coupe d'un os représentatif de l'anatomie de l'environnement médullo-osseux. (Schéma modifié issu de: <http://www.larousse.fr/encyclopedie/medical/os/15009>). c) Schéma descriptif des anastomoses entre le réseau de sinusoides artériels et veineux.

Le parenchyme hématopoïétique

Le parenchyme est la structure contenant les éléments fondamentaux de la moelle rouge. Il repose sur les cellules stromales et contient les précurseurs et les cellules matures des lignées myéloïdes et lymphoïdes (Figure 26).

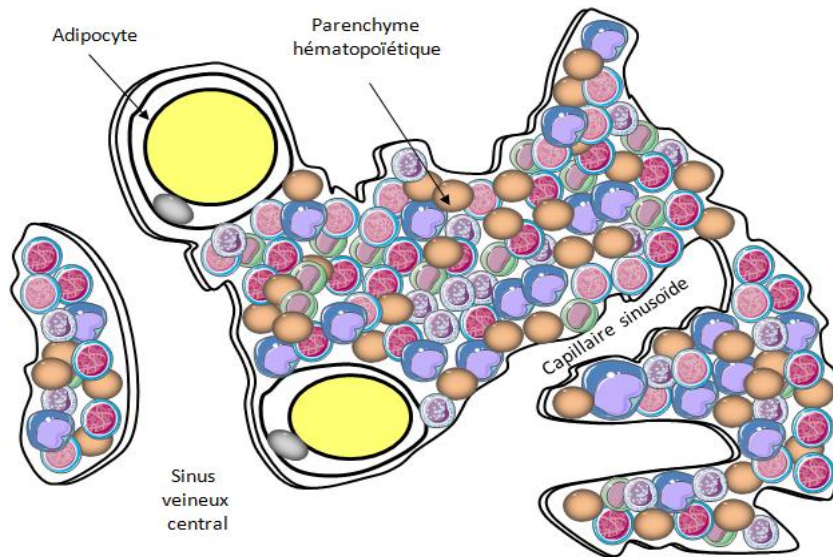


Figure 26: Parenchyme hématopoïétique médullaire

Schéma de coupe histologique du parenchyme qui illustre la localisation des cellules hématopoïétiques, des adipocytes ainsi que la proximité avec le réseau vasculaire.

Etude morphologique et fonctionnelle de la moelle osseuse par imagerie dynamique

La cavité médullaire, de par son rôle central dans l'hématopoïèse et dans la distribution des cellules en périphérie, a suscité de nombreuses études dans des domaines comme l'hématologie et l'immunologie. L'immuno-histologie a été utilisée pour définir et analyser les différentes structures et zones de la moelle osseuse. Cependant, cette approche fournit une vision statique de l'organe et ne permet pas l'étude de la mobilité des interactions cellulaires au sein du tissu ainsi que des échanges entre les différents compartiments qui pourtant sont au cœur de l'activité fonctionnelle de la moelle osseuse. La vidéo microscopie, en revanche, permet d'étudier la mobilité, l'adhésion cellulaire ainsi que l'interaction entre deux cellules. Jusqu'à récemment, ce genre d'information était issu de système in vitro. Le développement des techniques d'imagerie intravitale, notamment par l'utilisation de microscope biphotonique, permet, d'une part, de visualiser la structure tridimensionnelle d'un organe et, d'autre part, d'imager les cellules d'intérêt dans leur environnement naturel (Figure 27).

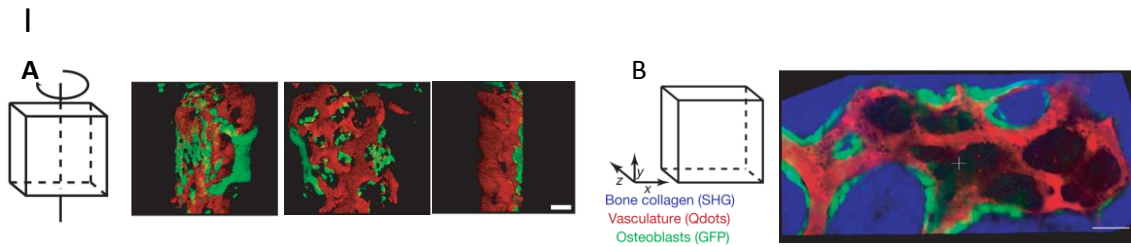


Figure 27 : I Imagerie et modélisation du système médullaire calvarien

(A) Modèle de rotation tridimensionnelle des ostéoblastes et du système vasculaire médullaire. Osteoblaste (vert) réseau vasculaire (rouge). (B) Superposition (x,y) des images de la matrice osseuse (bleu), des ostéoblastes (vert) et du réseau vasculaire acquis simultanément en microscopie biphotonique. Echelle 50µm. D'après (Ishii et al., 2010).

II

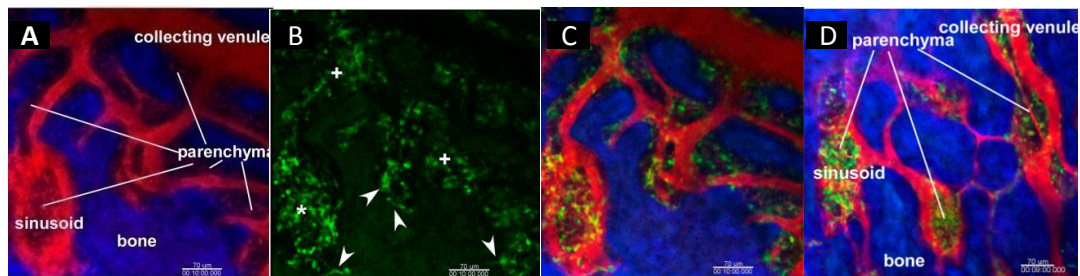


Figure 27 : II imagerie intravitale biphotonique de la moelle calvarienne (souris CX3CR1^{Kin/GFP})

(A) Structure de la cavité médullaire. La matrice osseuse est révélée par la seconde harmonique et apparaît en bleu, la microvasculature (rouge) visualisée par administration i.v de dextran conjugué au tex-red. Autour des sinusoides le dextran pénètre le parenchyme par fuite du colorant au niveau de la barrière endothéliale. (B) Les cellules CX3CR1-EGFP⁺ apparaissent en vert. Les flèches, les motifs + et astérisques indiquent les cellules à la surface osseuse, dans le parenchyme et veinules collecteurs respectivement. (C,D) Champs similaires d'expositions de la cavité osseuse (bleu), du réseau vasculaire (rouge) et des cellules CX3CR1-EGFP⁺ (vert). Les cellules résident dans les différents compartiments médullaires, à savoir les cellules de la cavité osseuse, les cellules du parenchyme autour des veinules collecteurs, et les cellules du parenchyme autour des sinusoides. Echelle 70µm. D'après (Lo Celso et al., 2009).

Anatomie du réseau médullaire de l'os crânien

L'imagerie intravitale de la moelle de l'os crânien comporte deux avantages majeurs comparés à l'os fémoral : [1] elle peut être réalisée facilement par son accessibilité aisée avec une chirurgie légère et donc une inflammation systémique réduite. [2] La faible épaisseur de l'os crânien permet une pénétration du tissu sans abrasion préalable et donc entraînant de moindres perturbations physiologiques et architecturales du tissu étudié. L'exploration de la moelle osseuse crânienne par imagerie intra vitale a été réalisée, pour la première fois, par le groupe de von Adrian (Mazo et al., 1998). Cette étude a permis une description précise du réseau médullaire. La moelle osseuse a été imagée au sein de l'os plat au niveau de la région parasagittale (figure 28A). Il est possible d'imager dans cette zone le parenchyme médullaire mais plus difficilement les sinusoides. Le réseau vasculaire est en effet plus facilement observable au niveau fronto-pariétale de par une structure osseuse moins dense.

L'imagerie du réseau médullaire a permis la caractérisation de sa structure vasculaire (Figure 28A-B). On distingue : [1] le sinus central longitudinal (SCL) qui est localisé au niveau de la suture sagittale supérieure (Figure 28A), [2] un réseau de vaisseaux larges, les sinus de collectes (SCs) qui alimentent le sinus sagittal (situé le long de la suture sagittale), [3] les sinusoides qui alimentent les SCs par l'intermédiaire de veinules post sinusoidales (VPSs), [4] les veinules intermédiaires (VIs) constituées de nombreuses ramifications et [5] les veinules allongées (VAs) composées de quelques ramifications sans contact apparent avec la cavité médullaire. Les VIs et les Vas sont issus de l'os pariétal et alimentent également les SCs. Il est important de noter que le flux sanguin dans les sinusoides, les VIs et les VAs, est très variable. Le réseau capillaire parasagittal situé entre le haut de l'os pariétal et l'os frontal (Figure 28A) est caractérisé par un flux sanguin faible et très variable. Cette zone, le plus souvent obscurcie, semble contenir un parenchyme enrichi en érythrocytes (Figure 28B) (Mazo et al., 1998).

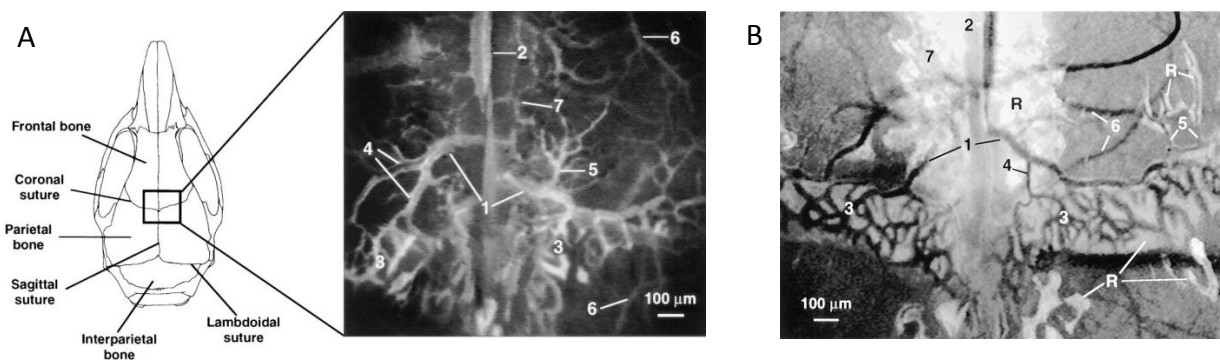


Figure 28 : Histologie et anatomie de l'os crânien murin.

(A) Gauche. Les sutures et l'os sont représentés schématiquement, le rectangle au niveau de la région fronto pariétale indique la zone typique qui contient la micro-vascularisation révélée par injection de rhodamine dextran-FITC (150 KDa). A (milieu). (1) sinus de collectes situé au niveau de l'os pariétal parallèle à la suture coronale. (2) Sinus sagittal. (3) Réseau de sinus pariétal constitué de veinules intermédiaires et de veinules allongées. (4) veinules post sinusoidales. (7) réseau dense de capillaires parasagittales. (B) Droite. La photo montre le réseau vasculaire. (R) accumulation de rodhamine dans la région parasagittale de l'os frontal et pariétal et au niveau des sinusoides et de quelques veinules. Echelle 100μm. D'après (Mazo et al., 1998)

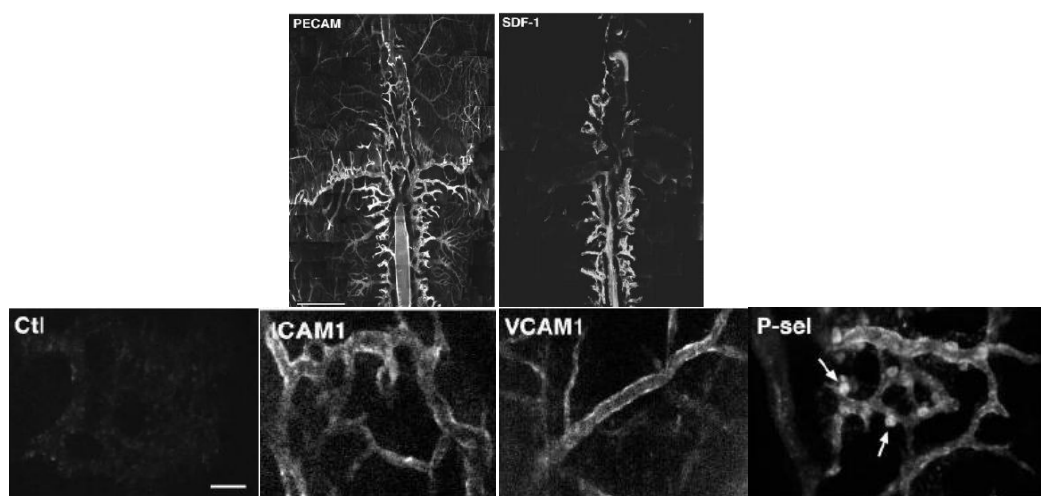


Figure 29 : Marquage intra vasculaire des molécules d'adhésion

Marquage immuno-fluorescent *in vivo* révélateur des molécules d'adhésion (PECAM, ICAM-1, VCAM1 et P selectine) et de CXCL12 (=SDF1) au sein des sinus médullaires de l'os crânien. Ce montage d'image révèle l'expression restreinte de CXCL12 à la région parasagittale comparé à l'expression diffuse des molécules d'adhésion. D'après (Sipkins et al., 2005).

Chimiokines et molécules d'adhésion dans la moelle osseuse

Les chimiokines et les molécules d'adhésion jouent un rôle important dans le maintien de la cohésion fonctionnelle de la moelle osseuse. Des études descriptives de la moelle du crâne à l'aide de techniques d'imagerie in vivo et de marquages immuns in situ ont permis la mise en évidence de zone de production de chimiokines et de molécules d'adhésion (Sipkins et al., 2005). CXCL12 est exprimé au niveau du réseau vasculaire parasagittal (le long de l'os frontal et de l'os pariétal). De plus, les auteurs de cette étude ont montré que les HSCs localisent dans ces micro-domaines d'expression de CXCL12. ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1 et la P-selectine tapissent le système vasculaire médullaire alors que la E-selectine est exprimée selon le même profil que CXCL12 (Figure 29).

B Les monocytes

Les monocytes appartiennent aux cellules du système phagocytaire, ils peuvent également être d'origine médullaire ou splénique (Gordon and Taylor, 2005; Leuschner et al., 2012; Robbins et al., 2012; Shi and Pamer, 2011; Swirski et al., 2009). Ils participent aux fonctions de surveillance en situation homéostatique et à la résolution de la réponse inflammatoire (Geissmann et al., 2010). Ils permettent le déploiement de défenses immunitaires dans la lutte contre les agents pathogènes comme les bactéries et les virus (Cros et al., 2010; Shi and Pamer, 2011), mais sont aussi impliqués dans de nombreuses pathologies inflammatoires telles que les maladies auto-immunes, l'athérosclérose et comme nous l'avons vu précédemment le cancer (Biswas and Mantovani, 2010; Combadiere et al., 2008; Fife et al., 2000). Les monocytes portent des caractéristiques morphologiques communes chez l'homme et la souris. La coloration MGG décrit des cellules de formes irrégulières possédant un noyau ovale, des vésicules cytoplasmiques et un ratio cytoplasme /noyau élevé.

Ces dernières années, la caractérisation des monocytes a fait l'objet de nombreuses investigations, notamment grâce au développement de souris transgéniques exprimant des protéines de fluorescence sous le contrôle de promoteurs importants dans la différenciation des populations monocytaires (Jung et al., 2000; Ovchinnikov et al., 2008).

Origine et différenciation des monocytes

Ontogénie des monocytes

Les monocytes proviennent de la différenciation des HSCs médullaires. Les HSCs murines sont caractérisées en cytométrie de flux par l'absence d'expression des marqueurs de lignée leucocytaire (CD45), lymphoïdes (CD3, CD19, CD45, NK1.1, DX5), érythrocytaires (TER119) et myélocytaire (CD11b, Gr1) et par l'expression du CD34⁺, CD117⁺, flt3^{+/-}, SCA1⁺, (Chow et al., 2011). La différenciation des HSCs va engendrer un progéniteur myéloïde commun (CMP) essentiellement différenciable des HSCs par la perte d'expression du marqueur SCA1 (lin⁻, CD34⁺, C117⁺, flt3^{+/-}, SCA1⁻).

Le CMP se différencie en myéloblaste (GMP) capable d'engendrer les neutrophiles et les monocytes. Le GMP est caractérisé par l'expression des antigènes de surface CD34⁺, CD16/32⁺. Le GMP se différencie en précurseur myéloïde (MDP/CDP) commun aux

monocytes, macrophages, précurseurs de cellules dendritiques (CDC) et cellules dendritiques plasmacytoides (PDCs). Il est caractérisé par l'expression des marqueurs CX3CR1⁺, CD117^{low}, Csf1R⁺ (M-CsfR), FLT3⁺. Il ne possède plus la capacité de différenciation en neutrophiles. (Auffray et al., 2009a) (Figure 30).

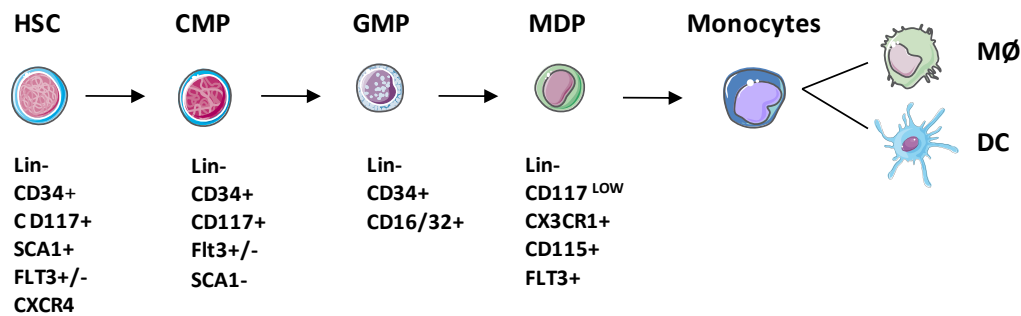


Figure 30 : Origine et différenciation des monocytes

Les monocytes sont issus de la différenciation de cellules souches hématopoïétiques. La figure schématise les différents stades de différenciation phénotypiques de ces précurseurs. HSC= cellules souche hématopoïétique, CMP= précurseur myéloïde commun, GMP= précurseur granulomonocytaire, MDP= précurseur myéloïde commun aux monocytes, macrophages (MØ) et cellules dendritiques (DC).

Cytokine et développement monocytaire

La différenciation des HSCs en monocytes est essentiellement dépendante du facteur de croissance M-Csf. En effet, les souris déficientes pour le gène du M-Csf ou son récepteur Csf1R présentent un nombre de monocytes sanguins considérablement réduit (Cecchini et al., 1994; Dai et al., 2002; Wiktor-Jedrzejczak and Gordon, 1996). L'expression transgénique du M-Csf au sein de ces souris déficientes rétablit la différenciation monocytaire (Ryan et al., 2001).

Le Csf1R est un récepteur de facteur de croissance exprimé sur les monocytes, les macrophages, les DCs et leurs précurseurs (MacDonald et al., 2005; Sasmono et al., 2003). Deux ligands du Csf1R sont connus, le M-Csf (Kawasaki et al., 1985) et l'interleukine 34 (Lin et al., 2008), tous deux associés au développement de la lignée monocytaire. Comme nous l'avons vu l'axe Csf1R représente une cible thérapeutique dans le contexte tumoral (Lin et al., 2001; Priceman et al., 2010).

D'autres cytokines comme le GM-Csf, Flt3L, la lymphotoxine $\alpha 1\beta 2$ contrôlent le développement et l'homéostasie du réseau des macrophages et des cellules dendritiques

mais ne semblent pas indispensables au développement des monocytes (Kabashima et al., 2005; McKenna et al., 2000; Waskow et al., 2008).

Deux sous-populations de monocytes matures se différencient à partir des MDP. Ils se caractérisent sur la base de l'expression différentielle des marqueurs antigéniques murins Ly6-C et des RCKs CCR2 et CX3CR1 (Figure 31) (Auffray et al., 2007; Gordon and Taylor, 2005) et ont des propriétés fonctionnelles propres.

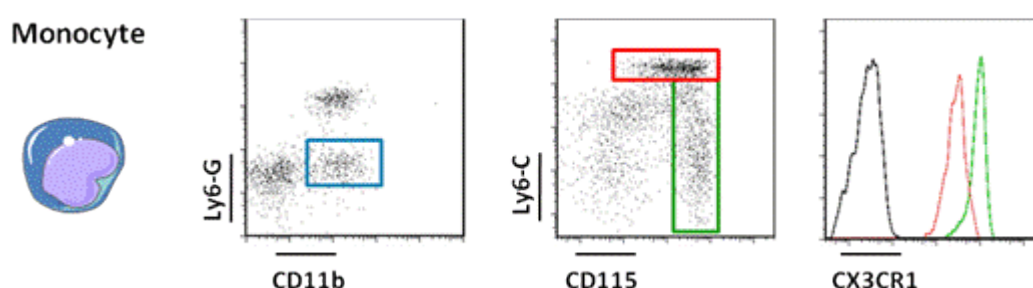


Figure 31 : Phénotype des deux sous populations de monocytes sanguins.

Les monocytes sanguins peuvent être identifiés en cytométrie de flux par leur expression d'antigènes de surface. Ils sont caractérisés par l'expression du CD11b, du CD115 (Csf1R) et se distinguent des neutrophiles qui eux expriment en plus le marqueur Ly6-G. Les deux sous types diffèrent par leur expression différentielle des antigènes Ly6-C et de CX3CR1. Ainsi, on distingue les monocytes Ly6-C^{high}, CX3CR1^{low} (rouge) et les monocytes Ly6-C^{low/neg}, CX3CR1^{high} (vert).

Caractérisation et propriétés fonctionnelles des monocytes

Monocytes Ly6-C^{high} « monocytes classiques ou inflammatoires »

Ils sont caractérisés par le phénotype suivant: CD11b⁺, Csf1R⁺, Ly6-C^{high}, F4/80, Ly6-G⁻, CD62L⁺, CCR2⁺, CX3CR1^{low}.

Les monocytes Ly6-C^{high}, CX3CR1^{low} sont des cellules larges (10-14µm). Ils représentent la sous population de monocyte majoritaire lors de la phase précoce du processus inflammatoire, suite à infarctus du myocarde (Nahrendorf et al., 2007) ou lors d'une infection (virus, bactérie, champignon) (Shi and Pamer, 2011). Les monocytes Ly6-C^{high} possèdent une activité phagocytaire, protéolytique et une activité inflammatoire notamment par le biais de la production de TNFα et d'IL-1. Cette fonction leur a valu leur appellation de « monocytes inflammatoires ». Après transfert adoptif, cette population se

localise préférentiellement au niveau des tissus enflammés avec une courte durée de vie (Geissmann et al., 2003).

Propriétés fonctionnelles de monocytes Ly6-C^{high} et rôle de CCR2

L'axe CCR2/CCCL2 joue un rôle crucial dans le recrutement et le trafic des monocytes Ly6-C^{high} au cours d'une infection ou dans le recrutement au niveau d'une lésion inflammatoire (Serbina and Pamer, 2006; Tsou et al., 2007). Les souris CCR2^{-/-} sont caractérisées par une accumulation médullaire des monocytes Ly6-C^{high}. A l'opposé, elles présentent une profonde déficience de ces cellules dans le sang et les organes lymphoïdes périphériques (Nahrendorf et al., 2007; Serbina and Pamer, 2006; Swirski et al., 2009; Tsou et al., 2007). L'expression de CCR2 est donc associée à la sortie de monocytes de la moelle vers le sang. CCR2 lie plusieurs CKs (CCL2, CCL7, CCL8, CCL11 et CCL12). Les souris CCL2^{-/-} et CCL7^{-/-} reproduisent partiellement le phénotype CCR2^{-/-} suggérant une contribution de ces deux CKs dans le recrutement des monocytes Ly6-C^{high} vers les tissus ou la sortie de la moelle (Tsou et al., 2007). En effet Tsou et al ont montré que CCR2 est requis lors de la phase initiale du recrutement des monocytes Ly6-C^{high} à un site inflammatoire, alors que Serbina et ses collègues suggèrent qu'il ne soit pas nécessaire au recrutement des monocytes Ly6-C^{high} en phase tardive (Serbina and Pamer, 2006 36).

D'un point de vue physiopathologique, il a été démontré que 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). Les monocytes Ly6-C^{high} sont importants dans le processus d'élimination des pathogènes par phagocytose, ils peuvent se différencier en DCs après expression du CD11c et des molécules de classe II et se comporter comme cellules présentatrices d'antigènes dans les ganglions drainants participant ainsi à la réponse immunitaire adaptative (Geissmann et al., 2003). Il a également été démontré que les monocytes Ly6-C^{high} interviennent directement dans le processus d'élimination des débris nécrotiques dans un modèle d'infarctus du myocarde par combinaison de leurs fonctions phagocytique et protéolytique (Nahrendorf et al., 2007).

Monocytes Ly6-C^{low/-} ou « résidents »

Ils sont caractérisés par le phénotype suivant: CD11b⁺, Csf1R⁺, F4/80⁺, Ly6-C^{low/-}, Ly6-G⁻, CCR2⁻, CX3CR1^{high}, LFA-1⁺.

Cette population est caractérisée par une plus petite taille (8-12µm), possède une durée de vie plus longue et une expression plus forte de CX3CR1 que les monocytes Ly6-C^{high}. Ils ont été dénommés monocytes résidents de par leur présence dans les tissus enflammés et sains. On les retrouve présents dans de nombreux organes dont le sang, les poumons, la rate, le foie et le cerveau. L'accumulation des monocytes Ly6-C^{low} au sein des tissus est facilitée par l'expression forte de CX3CR1 (Geissmann et al., 2003). Les monocytes Ly6-C^{low} répondent au CX3CL1 qui semble contribuer à leur recrutement précoce dans la rate au cours d'une infection bactérienne à *listeria monocytogenes* (Auffray et al., 2009a).

Propriétés fonctionnelles des monocytes Ly6-C^{low /-} et rôle CX3CR1

Si de nombreuses fonctions physiopathologiques ont été décrites pour les monocytes Ly6-C^{high}, les implications des monocytes Ly6-C^{low/-} ne sont, à ce jour, pas clairement établies. Ils ont été caractérisés pour leur activité phagocytaire des corps étrangers, sont capables d'acquérir un phénotype semblable aux cellules dendritiques (CD11c⁺, CMH de classe II⁺) et d'acquérir les fonctions de cellule présentatrice d'antigène. Ces monocytes sont également nommés « patrolling » {patrouilleurs} de par leur capacité à parcourir l'endothélium vasculaire contre le flux sanguin par une mobilité (le crawling) qui est dépendante de LFA-1 et CX3CR1 (Auffray et al., 2007). L'axe CX3CL1/CX3CR1 assure des fonctions importantes des monocytes Ly6-C^{low/-}. Les souris déficientes pour CX3CR1 ou CX3CL1 sont caractérisées par une diminution des monocytes Ly6-C^{low/-} sanguins ainsi que par une diminution du «patrolling» des monocytes Ly6-C^{low/-} (Auffray et al., 2007). L'axe CX3CL1/CX3CR1 peut favoriser la prise de greffe des monocytes Ly6-C^{low/-}. En effet, le groupe du Dr Geissmann a démontré que la déficience de CX3CR1 affecte la prise de greffe Ly6-C^{low/-} dans un modèle de co-transfert adoptif avec des monocytes CX3CR1⁺, suggérant un rôle de CX3CR1 dans le homing ou la survie des monocytes Ly6-C^{low/-} (Geissmann et al., 2003). D'autres études ont confirmé l'implication du couple CX3CL1/CX3CR1 dans la survie des monocytes. Le couple CX3CL1/CX3CR1 transmet un signal conduisant à la survie des monocytes Ly6-C^{low/-} en situation physiologique et inflammatoire (Landsman et al., 2009). Cette survie des monocytes Ly6-C^{low/-} au sein de souris CX3CL1^{-/-} peut être rétablie par expression

transgénique d'un mutant de la forme membranaire de CX3CL1 mais pas par expression d'un mutant de la forme soluble, suggérant que seule la forme membranaire joue un rôle dans ce processus de survie des monocytes Ly6-C^{low} /- (Kim et al., 2011).

A La différence des monocytes Ly6-C^{high}, les monocytes Ly6-C^{low} /- sont recrutés en phase tardive dans un modèle d'infarctus du myocarde induit par ischémie où ils produisent du VEGF (Vascular endothelial growth factor) et pourraient contribuer à la réparation tissulaire en favorisant l'accumulation de myofibroblastes, l'induction d'angiogénèse et la déposition de collagène (Nahrendorf et al., 2007).

Relation entre les monocytes Ly6-C^{high} et Ly6-C^{low}

S'il y a une relation phylogénique entre les deux populations monocytaires, celle-ci n'a toujours pas été élucidée. Néanmoins, Sunderkotter et al, par des expériences de déplétion et de suivi de la reconstitution des populations ainsi que par transfert adoptif, suggèrent que les monocytes Ly6-C^{high} seraient les précurseurs des monocytes résidents (Sunderkotter et al., 2004). Une fois au sein d'un tissu, les monocytes entament un programme de différenciation en macrophages ou cellules dendritiques (Figure 32).

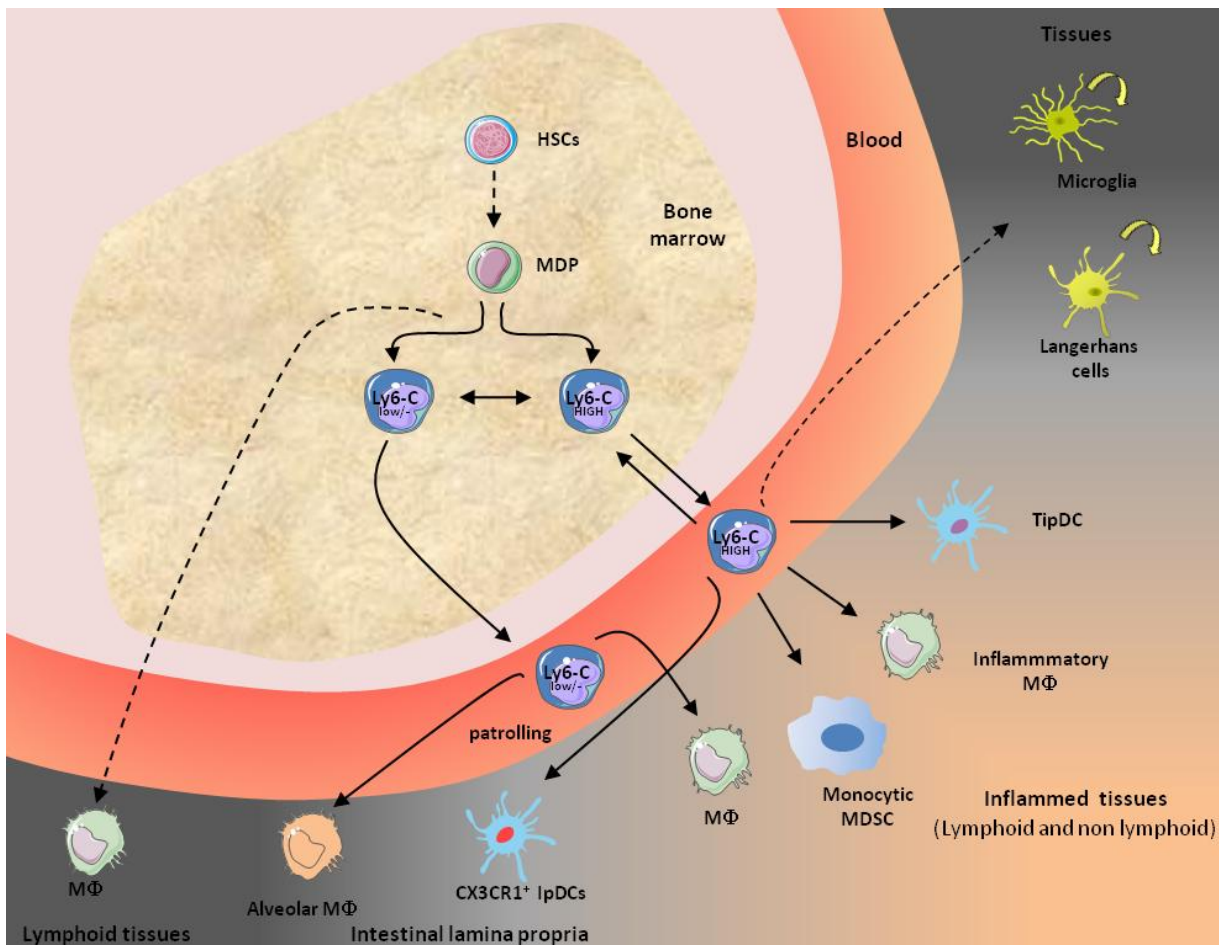


Figure 32 : Potentiel de différenciation des monocytes

Le précurseur des monocytes (MDP) donne naissance à deux populations monocytaires : [1] Les monocytes Ly6-C^{high} et [2] les monocytes Ly6-C^{low/-}. [1] En situation inflammatoire les monocytes Ly6-C^{high} ont la capacité de différenciation en cellules dendritiques productrices de TNFα et d'INOS (TipDCs), en macrophages inflammatoires (inflammatory MΦ) et en cellules myélosuppressives (MDSCs). Bien que les cellules microgliales et cellules de langerhans aient une capacité d'auto-renouvellement dans certaines conditions leur réservoir peut être approvisionné par la différenciation de monocytes Ly6-C^{high}. Les monocytes Ly6-C^{high} peuvent également se différencier en cellules dendritiques de la lamina propria (CX3CR1⁺ IpDCs). [2] Les monocytes Ly6-C^{low/-} quant à eux sont susceptibles de se différencier en macrophages (MΦ) au sein de tissus enflammés et en macrophage alvéolaire en situation homéostatique (alveolar MΦ). Les cellules plus immatures HSCs et MDPs sont également susceptibles de quitter la moelle osseuse pour se différencier en périphérie dans différents tissus (flèches en pointillés). Adapté de (Geissmann et al., 2010; Shi and Pamer, 2011).

Différenciation et plasticité des monocytes

Les monocytes ont longtemps été considérés comme les précurseurs sanguins des macrophages résidents et des cellules présentatrices d'antigènes tissulaires. En situation physiologique, il est difficile d'évaluer la contribution des monocytes dans l'approvisionnement des tissus en macrophages résidents et DCs. De plus, il a été montré qu'une importante proportion des DCs ne sont pas issus de la différenciation des monocytes mais auraient une origine lymphoïde. Néanmoins, en situation inflammatoire les macrophages et les DCs seraient d'origine monocytaires (Dunay et al., 2008; Robben et al., 2005; Shechter et al., 2009). Différentes approches expérimentales de déplétion in vivo des monocytes ont également permis de démontrer leur capacité de reconstitution des cellules de Langerhans de la peau (Ginhoux et al., 2006), des cellules microgliales (Mildner et al., 2007) et des phagocytes CX3CR1^{high} de la lamina propria intestinale (Varol et al., 2009) (Figure 33). Ainsi la différenciation des monocytes est déterminée par la composante en élément pathogène et facteur inflammatoire du milieu rencontré par les cellules (Serbina et al., 2008). In vitro, la différenciation des monocytes peut être contrôlée par les cytokines. En effet, la présence de GM-CSf et d'Il-4 induit une différenciation unilatérale des monocytes murins et humains en DCs quel que soit leur sous type (Sallusto and Lanzavecchia, 1994). L'addition de TGFβ1 confère un phénotype proche des cellules de Langerhans (Geissmann et al., 1998) tandis que l'exposition des monocytes au M-CSf induit leur différenciation en macrophages.

Différenciation en DCs

Les DCs d'origine monocyttaire possèdent des propriétés communes aux DCs d'origine lymphoïdes. Les monocytes recrutés sur un site inflammatoire s'activent et mûrent via l'apport de facteurs stimulants comme le TNFα, les INFs et le LPS. La maturation se caractérise phénotypiquement par la perte d'expression de RCKs inflammatoires et par l'expression de CCR7, le récepteur de CCL19 et CCL21 constitutivement exprimé au niveau des organes lymphoïdes secondaires. Ces caractéristiques permettent aux cellules dendritiques matures de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires où elles vont pouvoir initier la réponse lymphocytaire T spécifique d'antigène. Cependant, les DCs d'origine monocyttaire sont capables de présenter des antigènes mais ont une capacité de cross présentation limitée comparée au DCs d'origine lymphoïde (Banchereau and Steinman,

1998). De façon intéressante, CX3CR1 est exprimé tout au long de la différenciation des cellules dendritiques issues de précurseurs myéloïdes et favorise leur développement en situation physiologique (Lyszkiewicz et al., 2011). Lyszkiewicz et al suggèrent dans cette étude que CX3CR1 fournirait les signaux nécessaires à la survie des cellules ou leur permettrait d'accéder à des niches spécifiques d'organes.

Différenciation en macrophage

Les monocytes recrutés au sein des tissus sont capables de se différencier en macrophages. L'analyse transcriptionnelle des monocytes infiltrant le péritoine en réponse à une infection par *Listeria monocytogenes* indique que les monocytes Ly6-C^{low/-} initient un programme de différenciation proche de celui décrit pour les macrophages de type M2 ou « alternatively-activated- macrophages » qui impliqueraient des fonctions dans la réparation tissulaire et angiogénèse ainsi que des propriétés anti-inflammatoires. A l'inverse, dans le même modèle, les monocytes Ly6-C^{high} initialisent un programme de différenciation pro inflammatoire classique proche de celui des macrophages de type M1 ou des Ti PDC. (PDCs productrices de TNF α et D'iNOS) (Martinez et al., 2009). La suggestion que les sous populations de monocytes soient destinées à des fonctions distinctes et prédéfinies par des caractéristiques de type M1 ou M2 contredit la notion générale de plasticité. En effet, le concept de plasticité repose sur l'idée qu'une cellule se polarise et /ou se différencie en fonction de son micro environnement. Ce concept est fortement associé aux effets induits des cytokines sur les monocytes *in vitro*.

Environnement cytokinique et polarisation monocyttaire

Les combinaisons de cytokines (M-Csf+INF γ ou M-Csf+LPS) orientent les monocytes vers une différenciation de type M1. Les macrophages M1 (ou cellules activées classiquement) se comportent comme des sentinelles, ils possèdent une activité anti bactérienne, anti tumorale, produisent une grande quantité de TNF α , de monoxyde d'azote (NO), de ROS (Reactive Oxygen Species) et activent la réponse immunitaire par la production de cytokines telle que l'IL-12) (Mantovani et al., 2007; Martinez et al., 2009). Les macrophages de types M1 produisent de l'IL-12 et l'IL-23. Ces cytokines induisent la polarisation lymphocytaire vers un profil Th1 (Mantovani et al., 2002; Martinez et al., 2009; Verreck et al., 2004).

En revanche, les monocytes peuvent être différenciés en diverses populations de macrophages de type M2 lorsqu'ils sont stimulés avec de L'IL-4 et de L'IL-13 (M2a), avec des complexes immuns ou des ligands de TLR (M2b), ou en présence d'IL-10 (M2c) (Mantovani et al., 2004b). Les macrophages de type M2 sont caractérisés par la production d'IL-10^{high}, d'IL-12^{low}, d'IL-1ra^{high}, d'IL-1 decoyR^{high}, par la sécrétion de CKs CCL17 et CCL22, l'expression de récepteurs au mannose et de récepteurs dits « scavenger », par une faible capacité de présentation antigénique et par la promotion de la cicatrisation. D'autre part, ils favorisent l'élimination des débris, le remodelage des tissus lésés. Les macrophages de type M2 pourraient aussi jouer un rôle dans la résolution de l'inflammation par élimination des débris par endocytose et par la synthèse de facteurs trophiques comme les TGFβ (Martinez et al., 2009). De plus, ils contrôlent la réponse inflammatoire en inhibant les fonctions associées au macrophage M1 (Condeelis and Pollard, 2006; Mantovani et al., 2004a; Martinez et al., 2009; Pollard, 2009). La perte de l'équilibre dans le nombre des cellules de type M1 et M2 peut aboutir à des processus pathologiques. L'excès d'activation M1 pourrait en effet induire des maladies inflammatoires chroniques tandis que l'excès d'activation M2 pourrait promouvoir une immuno suppression importante (Condeelis and Pollard, 2006; Mantovani et al., 2004a) (Figure33).

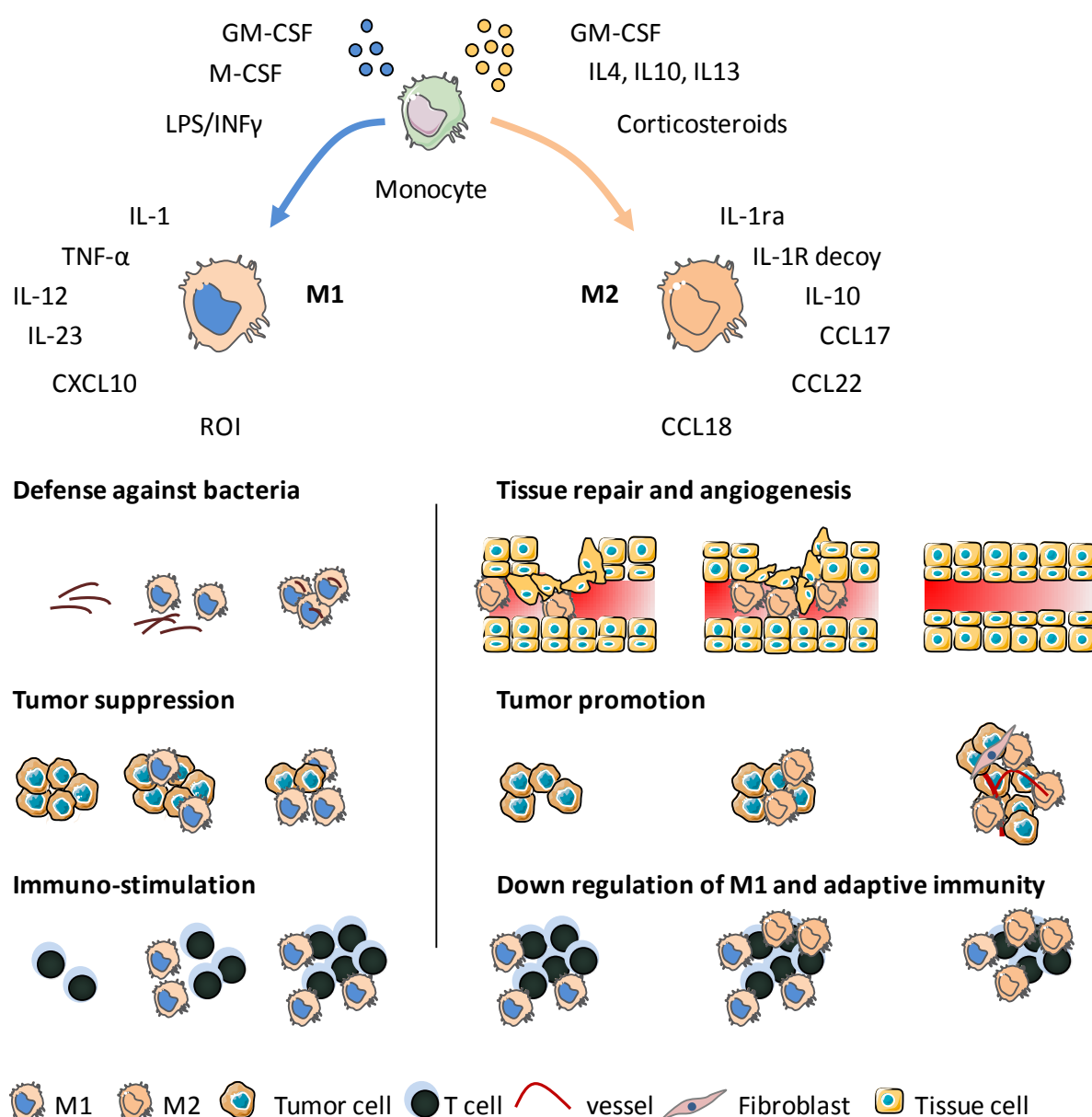


Figure 33 : Polarisation des macrophages

Les macrophages constituent une population cellulaire très hétérogène qui peut être divisée schématiquement en deux catégories M1 et M2. Les monocytes sanguins qui sont mis en contact de LPS et d'INF γ se polarisent en macrophages M1 (activation classique). Ils produisent de hauts niveaux d'IL-12, IL-1, IL-23, TNF α , et CXCL10. Ils possèdent une activité anti bactérienne et anti-tumorale. Ils produisent des ROS et peuvent se comporter en cellules présentatrices d'antigènes. En revanche, quand les monocytes se différencient en présence d'IL-4, d'IL-13, d'IL-10, ou de corticostéroïdes, ils se polarisent en macrophages M2 (activation alternative) et produisent des molécules telles que l'IL-10, CCL17, CCL22, l'IL-1Ra, et l'IL-1R decoy. Les macrophages M2 sont des agents de réparation de l'hôte : ils éliminent les débris cellulaires, ils participent au remodelage et à la cicatrisation de tissus endommagés. Au sein de la masse tumorale, ils exercent des fonctions similaires en favorisant la croissance tumorale. De plus, ils contrôlent la réponse inflammatoire en inhibant la réponse de type M1 et l'immunité adaptative. D'après (Solinas et al., 2009).

Caractérisation des monocytes humains

Chez l'homme, trois sous populations de monocytes sanguins ont été identifiées. Elles sont définies par l'expression du CD14 et du CD16 (FcγRIIIA+). Comme pour leurs homologues murins, elles peuvent également être caractérisées par l'expression de CCR2 et CX3CR1 (Auffray et al., 2009b).

Les monocytes CD14⁺CD16⁻ CCR2⁺ CX3CR1^{low}

Les monocytes « non classiques » représentent environ 90% des monocytes sanguins. Ils produisent de l'IL-6, de l'IL-8, mais également des CKs, CCL2 et CCL3 en réponse au LPS in vitro. A la différence de leurs homologues murins (monocytes Ly6-C^{high}), ils produisent de l'IL-10 plutôt que du TNFα et de l'INFγ (Ancuta et al., 2003; Cros et al., 2010; Geissmann et al., 2003; Weber et al., 2000; Ziegler-Heitbrock et al., 1992).

Deux autres sous populations de monocytes CD16⁺ CX3CR1^{high} CCR2^{low} (Ancuta et al., 2003; Geissmann et al., 2003; Weber et al., 2000) sont caractérisées par des fonctions différentes (Grage-Griebenow et al., 2001).

Monocytes CD14⁺CD16⁺ CX3CR1^{high} CCR2^{low}

Les monocytes « classiques » expriment également les récepteurs Fc CD64 et CD32 et possèdent une activité phagocytaire. Ils produisent de l'IL-6, du CCL3, du de TNF-α et de l'IL-1 en réponse au LPS in vitro (Auffray et al., 2009b), mais ne produisent pas de ROS (Cros et al., 2010). De par leur capacité à sécréter du TNF-α et de l'IL-1, les monocytes CD16⁺ ont anciennement été dénommés monocytes pro inflammatoires (Belge et al., 2002; Ziegler-Heitbrock, 2000). En effet, plusieurs études ont montré que ces monocytes sont retrouvés en grand nombre dans le sang de patients qui souffrent de pathologies inflammatoires aiguës (Mizuno et al., 2005) et de maladies infectieuses (Fingerle-Rowson et al., 1998; Horelt et al., 2002). Néanmoins, les monocytes CD14⁺, CD16⁺ sont également producteurs d'IL-10 à la suite d'une stimulation LPS in vitro (Cros et al., 2010; Skrzeczynska-Moncznik et al., 2008).

Monocytes CD14^{dim}CD16⁺ LFA-1⁺

Les monocytes « patrouilleur » représentent environ 7% des monocytes sanguins. Ces monocytes expriment un faible niveau de CD14, ils expriment le CD16 et pas d'autres récepteurs Fc. Ils produisent constitutivement l'IL-1RA antagoniste du récepteur à l'IL-1. Ils ne possèdent qu'une faible activité phagocytaire comparés aux monocytes CD14⁺ CD16⁻ et

ne produisent pas de ROS, pas de TNF α , ni d'IL-1 en réponse au LPS (Skrzeczynska-Moncznik et al., 2008). Ils produisent globalement peu de cytokines inflammatoires par stimulation au LPS (CD 14/TLR4) ni par stimulation via les TLR1 et TLR 2. Néanmoins, ils sont capables de sécréter du TNF- α , de l'IL-1 et du CCL3 en réponse au virus, ou motifs CpG via une activation spécifique du TLR7. De la même manière, leurs homologues murins (patrolling Monocyte Ly6-C^{low/-}) répondent mieux à une stimulation du TLR7 qu'à une stimulation LPS suggérant un degré de similitude inter-espèce (Cros et al., 2010).

Les nombreuses dénominations des monocytes entre les espèces murine et humaine peuvent porter à confusions dans la reconnaissance des différents sous types. Néanmoins, l'analogie des populations monocytaires entre la souris et l'homme sur la base des RCKs rend relativement relevant l'étude de ces sous populations.

IV Objectif de la thèse

La chimiothérapie est une approche conventionnelle dans le traitement du cancer. Au delà de l'effet toxique des différentes drogues sur les cellules tumorales, de plus en plus de travaux décrivent des effets bénéfiques ou délétères de ces thérapies sur les cellules du système immunitaire.. De nombreux travaux montrent que les populations d'origine myéloïdes monocyte/macrophage et cellules dendritiques, sont largement responsables de la promotion de la croissance tumorale ainsi que de l'immunosuppression de la réponse immune spécifique. Si les chimiothérapies semblent affecter les populations myéloïdes dans la tumeur permettant ainsi de rompre la barrière immunosuppressive, cet effet n'est le plus souvent que transitoire probablement dû au renouvellement rapide des populations myéloïdes.

Nous avons ainsi pour hypothèse qu'une intervention pharmacologique sur la mobilisation monocytaire pourrait améliorer l'efficacité des chimiothérapies en limitant l'effet immunosuppresseur du microenvironnement.

Les objectifs de ma thèse ont donc été de caractériser :

1-L'impact de la chimiothérapie anti-tumorale sur les populations myéloïdes. Nous avons porté plus particulièrement notre attention sur les macrophages et cellules dendritiques associés à la tumeur de par leur forte représentation dans le micro environnement tumoral. Nous avons cherché à comprendre les mécanismes immunosuppresseurs dépendant de ces cellules après chimiothérapie (CP) au sein de la tumeur dans un modèle de fibrosarcome (MCA-OVA suivi d'un transfert adoptif de LT-OT1 spécifique de l'antigène OVA). Etant donné l'effet du CP sur l'activation et la prolifération transitoire des LTs spécifiques de la tumeur nous avons voulu évaluer l'impact du CP sur les cellules myéloïdes associées à la tumeur et constater que le CP impactait fortement les TAMs et faiblement les TuDCs. Au regard de l'importance des cellules dendritiques dans l'activation des LTs, nous avons étudié les interactions de cette population par imagerie bi-photonique de tumeurs explantées issues de souris CD11c-YFP traitées par le CP et par un transfert adoptif de LTs OT1 fluorescents (CFP ou Dsred). Nous avons montré que les TuDCs piègent les LT OT1 suggérant un rôle immunosuppresseur de ces cellules.

2-Les mécanismes chimiokines impliqués dans la mobilisation monocyttaire au cours de la chimiothérapie. Etant donné l'impact du CP sur le compartiment monocyttaire, nous avons voulu déterminer le rôle des RCKs CCR2 et CX3CR1 dans la dynamique de mobilisation et de reconstitution monocyttaire. Pour ce faire, nous avons décidé d'étudier le comportement des monocytes au sein de souris déficientes pour les gènes de CCR2 et CX3CR1. Au regard de l'augmentation de la mobilisation et des monocytes Ly6-C^{high} au sein des souris déficientes pour CX3CR1, nous avons décidé d'étudier plus précisément l'axe CX3CL1/CX3CR1 suite à l'administration de CP. Les perturbations de l'expression de CX3CR1 sur les monocytes et de CX3CL1 sur les cellules médullaires endothéliales et stromales ainsi que de la diminution de l'adhérence dépendante de l'axe CX3CL1/CX3CR1 ex vivo nous ont conduits à étudier la dynamique de la reconstitution monocyttaire médullaire par imagerie intra-vitale. Nous avons déterminé le rôle de CX3CR1 dans la mobilité et le confinement médullaire des cellules monocytaires à l'aide de souris déficientes et d'un inhibiteur de CX3CR1.

La compréhension de ces phénomènes devrait nous permettre de comprendre les raisons de certains échecs thérapeutiques liés à l'environnement immunosuppresseur généré par les cellules myéloïdes et de proposer des approches de traitements complémentaires axés sur la mobilisation des cellules myéloïdes.

Résultats

1-Impact de la chimiothérapie anti tumorale sur les populations myéloïdes.

Au début de ma thèse, j'ai participé à la conclusion d'un travail de recherche consistant à comprendre les mécanismes immunosuppresseurs dépendant des cellules myéloïdes de la tumeur après chimiothérapie.

Principaux résultats

Nous avons développé et utilisé un modèle expérimental de tumeur ectopique dans lequel la masse tumorale se développe en moins d'une semaine à partir de l'inoculation en sous-cutané de cellules issues d'un fibrosarcome murin exprimant un antigène tumoral modèle (ovalbumine) (MCA-OVA). Ce modèle est reconnu pour permettre le développement d'un environnement tumoral particulièrement immunosuppresseur. En effet, contrairement à certains modèles de transplantation de tumeur, le transfert adoptif de lymphocytes T CD8 naïfs spécifiques de l'antigène tumoral (OVA) induit ne permet pas le contrôle de la croissance tumorale (article 1, figure 1A) suggérant un environnement immunosuppresseur important (Boissonnas et al., 2010; Zeelenberg et al., 2008).

Afin de réduire les potentialités immunosuppressives de l'environnement et de permettre au système immunitaire de développer une réaction immune anti-tumorale, les souris sont traitées avec un agent chimiothérapeutique, le cyclophosphamide (CP) 3 jours avant le transfert adoptif de lymphocytes T spécifiques de OVA (article 1, figure 1A). Le traitement augmente l'activation des LTs OT1 qui est caractérisée par une capacité de production d'INF γ augmentée après re-stimulation in vitro et une prolifération augmentée des cellules issues du ganglion drainant la tumeur (article 1 figure supplémentaire 1). Le traitement conduit également à une augmentation de la capacité de production d'INF γ après restimulation in vitro des LTs OT1 issus de la tumeur (article 1, figure 1D) ainsi qu'à une augmentation de l'infiltration des LTs OT1 dans la tumeur par rapport aux souris contrôles (article 1, figure 1C). Cependant, le traitement n'aboutit qu'à un contrôle transitoire de la tumeur par les cellules T (article 1, figure 1B). De plus le pourcentage des LTs OT1 capables de produire de l'INF γ diminue au cours du temps ce qui suggère une induction de tolérance (article 1, figure 1D).

Nous avons pu montrer par imagerie en temps réel que, dans la tumeur, les cellules dendritiques tumorales (TuDC) définies par l'expression du CD11c au sein de souris CD11c-YFP s'organisent en un réseau relativement dense et interconnecté et que le traitement chimiothérapeutique avait peu d'effet sur ce réseau (article 1, figure 2). Néanmoins, nous avons montré que le traitement par le CP augmente la proportion de LTs en contact avec les TuDCs in vivo (article 1, figure 4). Au cours de l'infiltration, les lymphocytes T ont des interactions stables et dépendantes de l'antigène OVA avec ces TuDCs (article 1, figure 3) et se positionnent dans les zones de forte densité en TuDCs (article 1, figure 5) et ainsi n'infiltrant pas la tumeur de façon homogène.

Nous proposons ainsi l'hypothèse que les TuDCs piègent les lymphocytes T infiltrant la tumeur (article 1, figure 6) par des interactions non efficaces qui réduisent les interactions cytotoxiques avec les cellules tumorales. Ces résultats sont présentés ci-après en détail dans l'article 1: « *CD8⁺ Tumor-Infiltrating T cells are trapped in Tumor-Dendritic Cell Network* » accepté dans le journal « *neoplasia* ».

Article 1

CD8⁺ Tumor-Infiltrating T Cells Are Trapped in the Tumor-Dendritic Cell Network^{1,2}

Alexandre Boissonnas^{*,†,‡}, Fabrice Licata^{*,†,‡},
Lucie Poupel^{*,†,‡}, Sébastien Jacquelin^{*,†,‡},
Luc Fetler[§], Sophie Krumeich[¶],
Clotilde Théry[¶], Sébastien Amigorena[¶]
and Christophe Combadière^{*,†,‡}

*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMR S945, Immunité et Infection, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France; [†]Université Pierre et Marie Curie (UPMC), Université Paris 06, UMR S945-IUC, Paris, France; [‡]Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Service d’Immunologie, Paris, France; [§]Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 168, Laboratoire de Physico-Chimie Curie, Institut Curie, Paris, France; [¶]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U932, Immunité et Cancer, Institut Curie, Paris, France

Abstract

Chemotherapy enhances the antitumor adaptive immune T cell response, but the immunosuppressive tumor environment often dominates, resulting in cancer relapse. Antigen-presenting cells such as tumor-associated macrophages (TAMs) and tumor dendritic cells (TuDCs) are the main protagonists of tumor-infiltrating lymphocyte (TIL) immunosuppression. TAMs have been widely investigated and are associated with poor prognosis, but the immunosuppressive activity of TuDCs is less well understood. We performed two-photon imaging of the tumor tissue to examine the spatiotemporal interactions between TILs and TuDCs after chemotherapy. In a strongly immunosuppressive murine tumor model, cyclophosphamide-mediated chemotherapy transiently enhanced the antitumor activity of adoptively transferred ovalbumin-specific CD8⁺ T cell receptor transgenic T cells (OTI) but barely affected TuDC compartment within the tumor. Time lapse imaging of living tumor tissue showed that TuDCs are organized as a mesh with dynamic interconnections. Once infiltrated into the tumor parenchyma, OTI T cells make antigen-specific and long-lasting contacts with TuDCs. Extensive analysis of TIL infiltration on histologic section revealed that after chemotherapy the majority of OTI T cells interact with TuDCs and that infiltration is restricted to TuDC-rich areas. We propose that the TuDC network exerts antigen-dependent unproductive retention that trap T cells and limit their antitumor effectiveness.

Neoplasia (2013) 15, 85–94

Abbreviations: TuDCs, tumor dendritic cells

Address all correspondence to: Alexandre Boissonnas, PhD, 91 boulevard de l’hôpital, Paris 75013, France. E-mail: alexandre.boissonnas@upmc.fr

¹This work was supported by grants from Inserm and Université Pierre et Marie Curie “Emergence” and from the “Ligue contre le cancer”. S.J. was supported by the FP7 European grants Endostem and RAIDS, and F.L. was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). C.C. is a recipient of a contract “Interface” from Assistance Publique–Hôpitaux de Paris.

²This article refers to supplementary materials, which are designated by Figures W1–W3 and Movies W1–W9 and are available online at www.neoplasia.com.

Received 20 September 2012; Revised 26 November 2012; Accepted 29 November 2012

Introduction

Unexpected observations have been reported in cancer clinical trials and animal models following the combination of chemotherapy and immunotherapy [1]. Indeed, improved prognoses after cancer vaccine [2] or adoptive cell [3] therapies have been observed when immunotherapeutic agents are administered in combination with chemotherapeutic regimens. Conventional cancer therapies are primarily based on the preferential targeting of tumor cells, which are actively proliferating and require higher quantities of growth factors and nutrients than healthy tissues. It has been shown that direct cytotoxicity toward tumor cells induces immunogenic cross-presentation of dying tumor cells [4,5] or sensitizing tumor cells to cytotoxic T lymphocyte (CTL) activity, both in human tumor cell lines [6] and mouse models [7]. Cyclophosphamide (CP) is an alkylating agent often used in cancer chemotherapy and for prevention of graft-versus-host disease [8]. Several reports describe a hematopoietic cell-mediated antitumor effect after CP treatment. The mechanisms involved are not well understood, but there is no doubt that CTLs also contribute to this antitumor activity. Increased tumor-specific T lymphocyte proliferation has been associated with the lymphoablative properties of CP [9,10]. CP has also been described to selectively deplete or inhibit immunosuppressive populations, such as regulatory T cells [11–13] and myeloid-derived suppressor cells [14]. The balance between immunostimulatory effects of chemotherapy and the immunosuppressive tumor environment has a complex outcome on the orchestration of T cell antitumor activity. Indeed, increased antitumor activity is mostly transient and tumor control relapses when a *de novo* equilibrium is reached through immunoselection and/or immunosubversion of the newly activated CTLs [15]. Antigen-presenting cells and especially tumor-associated macrophages (TAMs) and tumor dendritic cells (TuDCs) have been widely involved in tumor progression and immunosubversion of CTLs [16–19]. TAMs and TuDCs share common markers and their phenotypic distinction is still a matter of debate. Despite increasing knowledge in the processes of T cell immunosubversion by TAMs, the spatiotemporal orchestration of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs)/TuDCs cross talk in living tissue has been poorly investigated. Deciphering the mechanisms by which antigen-presenting cells rapidly limit CTL-mediated destruction represents a prerequisite to improve the efficacy of therapeutic regimens.

Here, we used an intravital imaging approach to study in a highly immunosuppressive tumor model in mice how the TuDC network affects tumor-specific T lymphocyte infiltration after CP treatment.

Materials and Methods

Ethics Statement

Animal experiments were approved by the local Institutional Animal Care and Use Committee: Centre d'Exploration Fonctionnelle, Pitié-Salpêtrière.

Mice

C57BL/6 female mice (6 to 10 weeks) were obtained from Charles River (Les Oncins, France). C57BL/6 *Rag2*^{-/-} TCR (V α 2, V β 5) transgenic mice (OTI) were crossed to CD45.1 C57BL/6, Actb-ECFP/BL6, or Actb-DsRed/BL6 (Animalerie Centrale, Institut Curie) to obtain OTI CD45.1, OTI-CFP, and OTI-DsRed mice, respectively. CD11c-YFP transgenic mice (CD11c-YFP) [20] were bred in our Animal Facility (Centre d'Exploration Fonctionnelle, Pitié-Salpêtrière).

Cells

The MCA101 (MCA) cell line [21] (kindly provided by L. Zitvogel, Institut Gustave-Roussy, Villejuif, France) was stably transfected with a plasmid encoding for soluble ovalbumin (OVA) or a control plasmid (Mock) to generate MCA-OVA and MCA cell lines, respectively [22]. MCA cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium and the EL4 cell line in RPMI (Gibco, Invitrogen, Cergy Pontoise, France), supplemented with antibiotics and 10% fetal calf serum.

CD8⁺ OTI T cells (specific for OVA_{257–264} peptide in a H2-K^b context) and polyclonal CD8⁺ T cells were either obtained from lymph nodes of OTI *Rag2*^{-/-} mice (herein called OTI T cells, with a purity between 94% and 98%) or after magnetic beads sorting of lymph node cells from non-RAG OTI transgenic mice or from Actb-DsRed/BL6 for polyclonal CD8⁺ T cells, using the CD8⁺ negative sorting kit from Miltenyi Biotec (Paris, France) according to the manufacturer's instructions (purity above 90%).

In Vivo Tumor Growth and Treatments

MCA-OVA cells (2×10^5) were injected subcutaneously in the flank of mice. Tumor size was measured twice a week using a caliper, $V = L \times l \times (L + l)/2$. Chemotherapy was performed 7 days after tumor inoculation by a single intraperitoneal injection of CP (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) diluted in phosphate-buffered saline (PBS) at 100 mg/kg. Adoptive T cell transfer was performed at day 10 after tumor inoculation by intravenous (i.v.) injection of 5×10^6 freshly harvested OTI T cells. For MCA tumor imaging, MCA cells were injected in a contralateral manner with MCA-OVA. For the kidney tumor model, 2×10^5 EL4 cells were injected i.v. This injection route induces secondary localization of EL4 cells into the kidney and leads to paraplegia within 18 to 25 days. Mice were sacrificed at the first step of paraplegia, considered as the end point of survival. Kaplan-Meier survival was then performed according to these criteria. For intravital imaging, 5×10^6 freshly harvested polyclonal CD8⁺ T cells were adoptively transferred 3 days after EL4 inoculation to induce antigen-specific expansion and infiltration into the tumor.

Flow Cytometry

Phenotypic characterization of all cell populations was performed using either a FACSCalibur or FACSCanto II (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) for acquisition. For analysis, FlowJo software (Tree Star Inc, Ashland, OR) was used. MCA-OVA tumor and draining lymph node (axillary) were harvested at indicated days. MCA-OVA tumors and draining lymph node were entirely mashed in PBS with 0.5% BSA and filtered using 70- μ m cell strainer (BD Biosciences, San Jose, CA). Surface staining was performed by incubating 50 μ l of cell suspension (1/10th of the total) with 1 μ g/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 antibodies. The following panel of surface antibodies was used: anti-CD11b (clone M1/70), anti-Ly6C (clone AL-21), anti-Ly6G (clone 1A8), anti-CD45 (clone 30-F11), anti-CD11c (clone HL3), anti-I-Ab (clone AF6-120.1), anti-CD8 (clone 53-6.7), anti-CD69 (clone H1.2F3), anti-CD45.1 (clone A20), anti-interferon- γ (IFN- γ) (clone XMG1.2), anti-IL4R α from Pharmingen, BD Biosciences, anti-F4/80 (clone BM8) from eBioscience (Paris, France), and anti-Mgl1 from AbD Serotec (Colmar, France). After incubation, cell suspensions were washed once in PBS with 0.5% BSA. For intracellular cytokine staining, cell suspensions were restimulated *ex vivo* with 1 μ M OVA_{257–264} for 3 hours at 37°C in the presence of 5 μ g/ml Brefeldin A. After surface staining, cells were fixed in

4% paraformaldehyde (PFA) for 20 minutes, washed twice in perm/wash solution (BD Biosciences), and incubated for 20 minutes in perm/wash in the presence of anti-IFN- γ (clone XMG1.2). Samples were washed in PBS with 0.5% BSA 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- μ m polybead carboxylate microspheres (Polysciences, Niles, IL) according to the formula: Nb of cells = (Nb of acquired cells \times 10,000)/(Nb of acquired beads). The number of cells obtained for each sample was extrapolated to the whole organs.

In Vivo Proliferation Assay

CD45.1 OTI T cells were incubated for 10 minutes at 37°C in PBS with 5 mM carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE; Molecular Probes, Invitrogen, Cergy Pontoise, France). 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 axillary lymph nodes and tumor were measured while gating on CD45.1⁺CD8⁺ cells.

In Vitro Proliferation Assay

CD11c⁺ cells were isolated from either MCA or MCA-OVA tumors of CP-treated or untreated mice using magnetic beads according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec; CD11c purity was above 80%). After purification, CD11c⁺ cells (5×10^4) and CFSE-labeled naïve OTI T cells (10^5) were incubated in flat 96-well plate. After 3 days of coculture, cells were harvested and stained for flow cytometry analysis with anti-CD69 and anti-CD8 antibodies.

Multiphoton Imaging

Fluorescent OTI T cells (5×10^6) were injected i.v. Imaging experiments on tumors were performed 4 or 7 days after adoptive transfer. Tumors were carefully explanted from a skin flap. The thin fat layer was removed from the peritoneal side of the tumor to directly access the tumor parenchyma. Accessibility to the tumor parenchyma was evaluated by imaging an MCA-OVA tumor transfected with a yellow fluorescent protein (YFP)-encoding plasmid (see Figure 2D). Tumors were immobilized in an imaging chamber perfused with oxygenated (95% O₂ plus 5% CO₂) RPMI medium containing 10% fetal calf serum. The local temperature was monitored and maintained at 37°C. Dead cell staining was performed by a slow intratumoral injection of 50 μ l of PBS with 1 mg/ml 4', 6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI), at a distance from the analyzed area. We considered for imaging, peripheral areas of the tumor parenchyma in which OTI T cells were infiltrated disregarding the potential variability in the ratio between stromal cells and tumor cells. We assume that these regions are, however, representative to evaluate OTI T cell infiltration. For EL4 tumor, intravital imaging was performed on mouse kidney 18 days after tumor inoculation of CD11c-YFP mice. Briefly, mice were anesthetized with 2.5% isoflurane vaporized in a 70/30 mixture of O₂/N₂O. Kidneys were immobilized and exposed using a custom-made stereotactic holder. Mouse temperature was monitored and maintained at 37°C. Renal tubules were defined according to their autofluorescence and by i.v. Hoechst injection (50 μ g in PBS) previous to imaging session.

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 ChameleonU, 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. The system included three external non-descanned detectors in reflection, which allow the simultaneous record of three fluorescent channels using a combination of two dichroic mirrors (565 and 690 nm) with 565/610 (DsRed) and 500/550 (YFP) band-pass filters and 485 low-pass filter (CFP, SHG, DAPI, Hoechst). The excitation wavelength was 870 nm. Cell motility was measured every 30 seconds by six consecutive 5- μ m z spacing stacks using a plan apochromat $\times 20$ (NA = 1) water immersion objective. For volume rendering movies, 1- to 3- μ m z spacing stacks were performed, and three-dimensional (3D) reconstruction and volume rendering program from Imaris software (Bitplane, Zurich, Switzerland) were applied. For T cell tracking, images were average-projected and T cell motility parameters (previously defined [23]) were calculated using automatic tracking with manual correction using Imaris software. Cells that could not be tracked for more than 2 minutes were not considered. The arrest coefficient is defined as the proportion of time each cell's instantaneous velocity (calculated for every 30-second interval) is lower than 2 μ m/min. The cell 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. Quantification of OTI/CD11c⁺YFP cell interactions was manually characterized according to the following criteria: 1) "stable" contact, defined by OTI T cell making contact with the same YFP⁺ cell lasting all the imaging periods; 2) "confined" contact, defined by a single OTI making motile contact with one or more YFP⁺ cells present in close vicinity; 3) "distant" contact, defined by a single OTI making sequential contacts with at least two different distant YFP⁺ cells. The acquisition and analysis protocols for all experimental conditions to be compared were identical.

Histologic Tumor Analysis

Sagittal sections in the middle of tumors was performed as described [23], fixed overnight in 4% PFA, frozen in Tissue-Tek OCT compound, and sectioned (5 μ m) with a cryostat (Leica). Tumor sections were additionally stained with hematoxylin/eosin or DAPI. Quantification of T cell and TuDC densities was performed by automatic tracking using Imaris software. Distance measurement was performed manually using Imaris software. The acquisition and analysis protocols for all images were identical.

Statistical Analysis

Two-way analysis of variance (ANOVA) was performed to compare tumor growth. For other comparisons, one-way ANOVA test was first performed, when significant, two by two Mann-Whitney rank sum tests were then performed to compare highly skewed distributions (typically, intravital analysis of cell behavior), and unpaired Student's t tests were used to compare Gaussian-like distributions (typically, flow cytometric analysis of numbers and frequencies of cell populations). Spearman test was performed for correlation analysis (symbols used: * P < .05; ** P < .01; *** P < .001; NS, not significant).

Results

Chemotherapy Increases TIL Infiltration but Transiently Controls Tumor Growth

Ectopic tumors expressing model antigens such as OVA usually develop into highly immunogenic tumors for which the transfer of OVA-specific T cells confers tumor rejection. We have previously

described [22,24] a methylcholanthrene-induced fibrosarcoma cell line (MCA101) expressing OVA (MCA-OVA) that grows as solid subcutaneous syngeneic tumor after inoculation in C57Bl/6 mice. Injection of anti-OVA transgenic CD8⁺ T cells (OTI T cells) 10 days after tumor inoculation was unable to control the rate of tumor growth, in accordance with a potent immunosuppressive environment induced by the tumor (Figure 1A). To overcome the immunosuppressive barrier, we performed intraperitoneal injection of CP at 100 mg/kg, 7 days after tumor inoculation. Single injection of CP led to a significant reduction in tumor growth in treated compared to untreated mice ($P < .001$; Figure 1A). Adoptive transfer of naïve OTI T cells, 3 days after chemotherapy, induced a more pronounced reduction in tumor growth (Figure 1A). Between days 10 and 18, OTI T cell transfer significantly reduced the percent change of tumor volume, but after day 18, the percent change was similar for all conditions, suggesting that tumor growth control by OTI T cells was only transient (Figure 1B). Analysis of OTI priming in tumor-draining lymph node revealed that CP treatment induced a significant increase in both the proliferation rate of OTI T cells and their IFN- γ production after *in vitro* restimulation with their cognate antigen (Figure W1). This increased expansion was associated with enhanced OTI infiltration into the tumor in CP-treated compared to untreated animals (Figure 1C) and with an increased ability to produce IFN- γ after *in vitro* restimulation with cognate antigen (Figure 1D). Despite an increased number and frequency of infiltrating OTI T cells after CP treatment, the frequency of IFN- γ -producing OTI T cells after *in vitro* restimulation was significantly impaired

between days 4 and 7 after transfer (Figure 1D), suggesting tolerance induction of OTI T cells, in accordance with tumor growth relapse.

CP Treatment Barely Affects the TuDC Network within the Tumor Parenchyma

To address the reasons why, despite efficient T cell priming and massive tumor infiltration, OTI T cells were unable to fully reject the tumor after chemotherapy, we characterized the myeloid cell compartment within the tumor. Tumor infiltrating CD11b⁺Ly6G⁻ myeloid cells expressed both CD11c and F4/80 markers, suggesting a strong overlap between TAM and TuDC populations (Figure 2A). Engelhardt et al. recently used the transgenic CD11c-YFP mouse strain to define TuDCs as a specific subpopulation of TAMs [19]. Two subsets of myeloid CD11b⁺Ly6G⁻ cell populations were distinguished in MCA-OVA tumor according to YFP expression that we designated TuDCs for YFP⁺ myeloid cells and TAMs for YFP⁻ cells, as proposed by Engelhardt et al. [19]. Extensive phenotyping in MCA-OVA tumors showed that TuDCs were CD11c^{high}F4/80^{high}Ly6C^{low} major histocompatibility complex (MHC) class II IAb⁺ but also expressed more Mgl1 and IL4R α . The TAM population was much more heterogeneous, including mature Ly6C^{low} and immature Ly6C^{high} macrophages [25,26] and displayed lower CD11c and I-Ab expression (Figure 2B). The TAM compartment increased after CP treatment corresponding to the infiltration of the Ly6C^{high} subset, whereas the number of TuDCs was apparently not modified. Nevertheless, a slight difference in Ly6C and F4/80 expression by TuDCs was observed in mice treated by CP compared to untreated mice, suggesting a rapid turnover of TuDCs

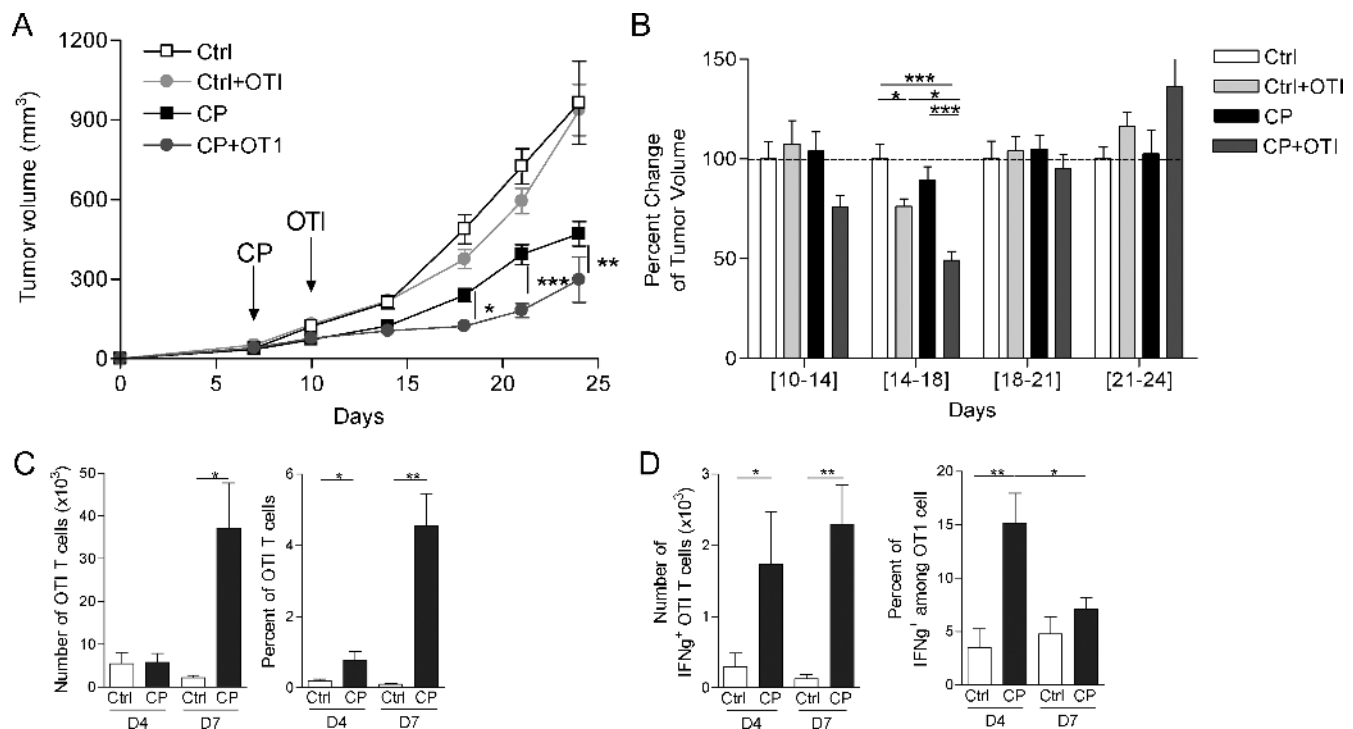


Figure 1. Chemotherapy increases TIL infiltration but transiently controls tumor growth. (A) MCA-OVA tumor cells were inoculated in the flank of C57Bl/6 mice and tumor growth was monitored. Intraperitoneal injection of CP (100 mg/kg) was performed at day 7 and naïve OTI T cells were adoptively transferred at day 10. Graphs represent mean \pm SEM tumor volume of 15 to 20 mice in each group pooled from four independent experiments. (B) Graph represents percent change in tumor growth determined by normalizing to Ctrl values, the fold increase of tumor volume during the indicated periods. Statistical analyses (ANOVA and Bonferroni post *t* test) were performed on raw data. (C–D) Graphs represent percent and absolute number of CD45.1 OTI T cells (C) and IFN- γ -producing CD45.1 OTI T cells (D) within the tumor. Bars represent mean \pm SEM from at least five mice of two to four independent experiments.

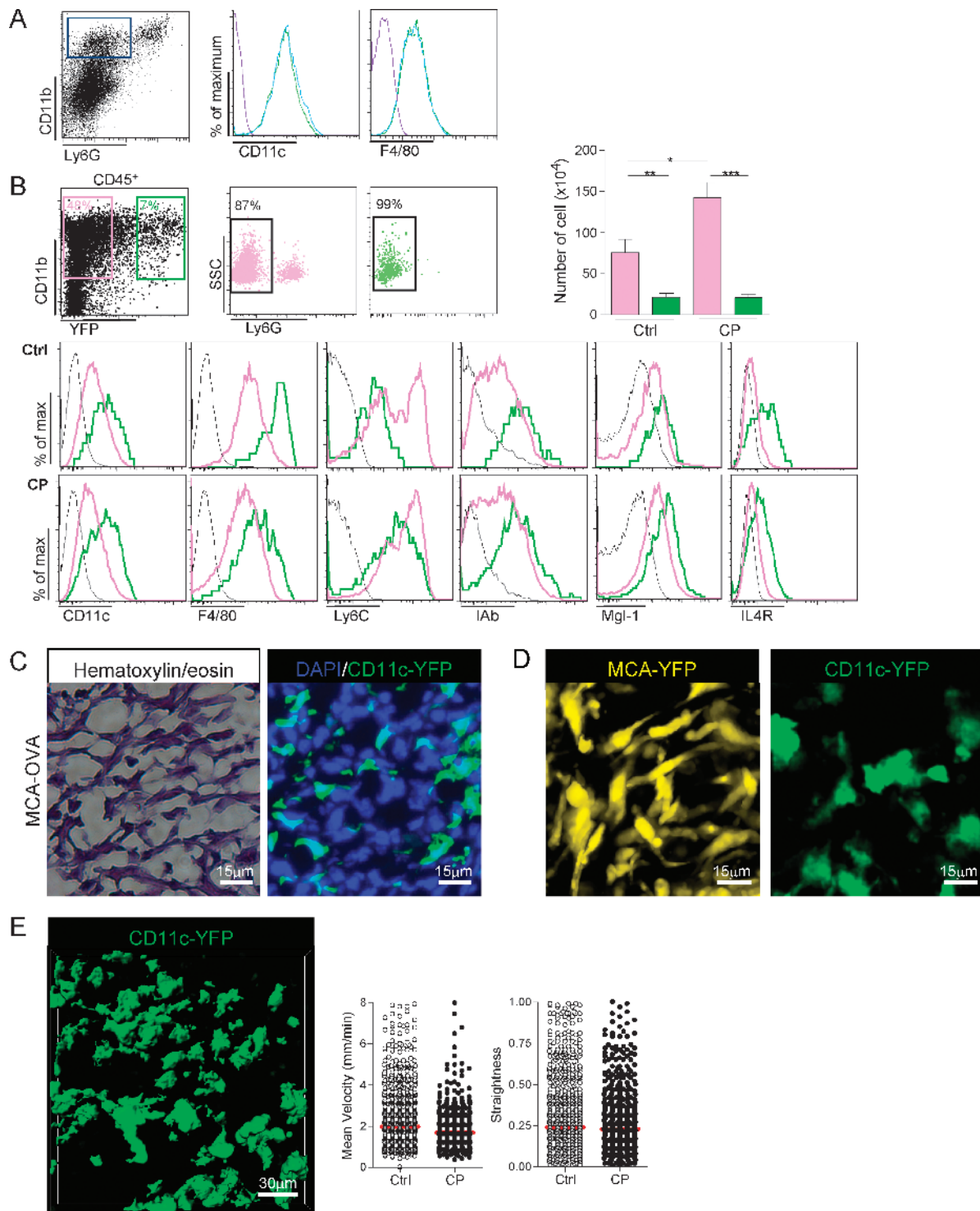


Figure 2. CP treatment barely affects the TuDC network within the tumor parenchyma. (A) Representative overlay histogram plot of CD11c and F4/80 expression gated on CD11b⁺Ly6G⁻ myeloid cells within the MCA-OVA tumors, 7 days after CP treatment (blue) or without treatment (green). Isotype staining is represented (purple). (B) Comparative multiparametric flow cytometric analysis of CD45⁺CD11b⁺YFP⁻ (TAMs, pink) and CD45⁺CD11b⁺YFP⁺ cells (TuDCs, green) from MCA-OVA tumors, 10 days after CP treatment or not. Bars represent the number of indicated cell populations (bars represent mean \pm SEM from 9 to 16 mice of three independent experiments). (C) Representative hematoxylin/eosin staining (left) and fluorescent image (right) of frozen MCA-OVA tumor section from CD11c-YFP transgenic tumor-bearing mice. (D) Representative TPLSM images of an explanted MCA-OVA tumor transiently transfected with a YFP-encoding plasmid (left) and an MCA-OVA tumor inoculated in a CD11c-YFP transgenic mouse (right). (E) Volume rendering image (Movie W1) of an MCA-OVA tumor from a CD11c-YFP mouse. Graphs represent the quantification of YFP⁺ velocity and straightness, 10 days after CP treatment or not. Red bar represents the median ($n = 822$ and $n = 547$ for Ctrl and CP-treated mice pooled from at least two independent experiments).

arising from the CP-mediated mobilization of Ly6C^{high} subset (Figure 2B). Histologic images (Figure 2C) and TPLSM images (Figure 2D) showed that TuDCs were distributed within the whole tumor parenchyma. Real-time imaging of the tumor in CD11c-YFP transgenic mice showed that TuDCs were slowly motile (mean velocity $V_{\text{mean}} = 2.4 \pm 1.6 \mu\text{m}/\text{min}$) and displayed reduced displacements (straightness = 0.3 ± 0.2 ; Movie W1 and Figure 2E). TuDCs were however very dynamic with intense protrusive activity and performing several interconnections constituting a mesh (Movie W1). CP treatment did not affect the behavior of the TuDCs (Figure 2E).

In conclusion, CP treatment induces strong infiltration of immature macrophages but barely affects the TuDC network.

OTI T Cells Make Ag-dependent Interactions with TuDCs

To characterize the dynamic of TuDC and OTI T cell interactions within the tumor, MCA-OVA and MCA tumors were inoculated in a contralateral manner into CD11c-YFP mice. We used two-photon microscopy to monitor, 4 days after adoptive transfer, OTI T cell be-

havior in explanted tumors (Figure 3A and Movies W2–W3). In CP-treated as well as untreated mice, OTI T cells and YFP⁺ cells were found in close proximity throughout the tumor parenchyma. Short movies with increased spatial resolution and volume rendering program confirmed that OTI T cells performed direct contacts with YFP⁺ cells (Movies W4–W5). The OTI T cell arrest coefficient was higher in MCA-OVA compared to MCA tumors showing that OTI T cell made antigen-specific arrest on either tumor cells or TuDCs (Figure 3B). CD11c⁺ cells isolated from MCA-OVA tumors cross-primed naïve OTI T cells *in vitro*, confirming that TuDCs were presenting the cognate antigen OVA_{257–264} (Figure W2). We thus performed individual characterization of OTI T cells and defined three different types of contacts with YFP⁺ cells: 1) “stable” contacts, defined by OTI T cell making contact with the same YFP⁺ cells and lasting all the imaging periods; 2) “confined” contacts, defined by transient contacts with one or more YFP⁺ cells present in close vicinity; 3) “distant” contacts, defined by sequential contacts with at least two different distant YFP⁺ cells (Movie W6 and Figure 3C). In both CP-treated and untreated mice, up to 70% of

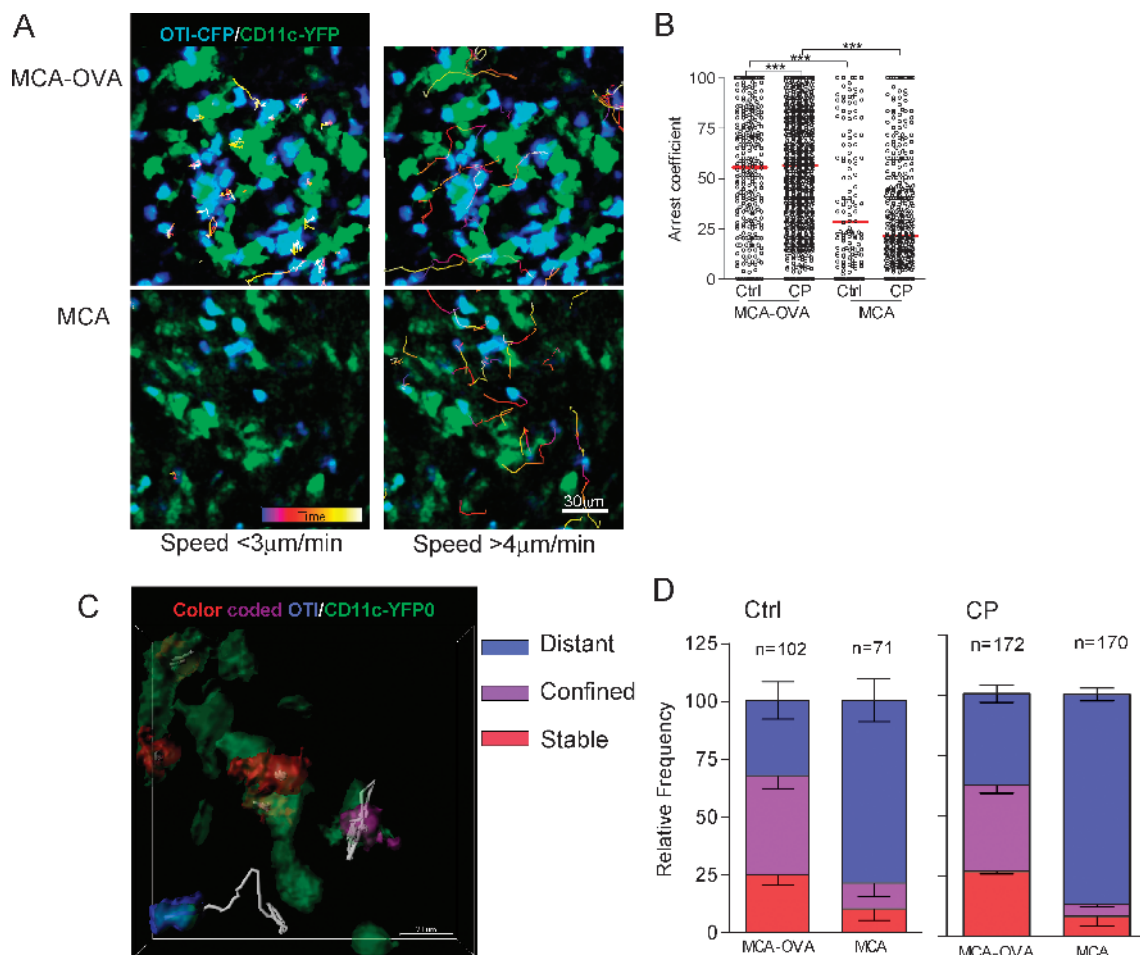


Figure 3. OTI T cells make Ag-dependent interactions with TuDCs. (A) Representative TPLSM images of OTI T cells (cyan) and YFP⁺ stromal cells (green) within an MCA tumor and an MCA-OVA tumor, 4 days after OTI-CFP T cell adoptive transfer in a CP-treated CD11c-YFP-transgenic mouse. Track paths of OTI T cell moving at the indicated mean velocity are shown colored according to the time of imaging (color-coded time bar is shown). (B) Quantification of OTI T cell arrest coefficient (MCA Ctrl, $n = 137$; CP, $n = 419$ and MCA-OVA Ctrl, $n = 271$; CP, $n = 920$). Mann-Whitney statistical significances are indicated (upper right). (C) Volume rendering reconstitution image shows three representative OTI T cells colored according to the type of interaction performed with YFP⁺ cells. OTI T cell track paths are represented in white. (D) Quantification of the relative frequency of the three types of OTI T cell/YFP⁺ cell interactions. Bars represent mean \pm SD of the relative frequency of the three types of interactions in each movie (three to four different movies have been evaluated for each condition). Total numbers of OTI T cell characterized are indicated.

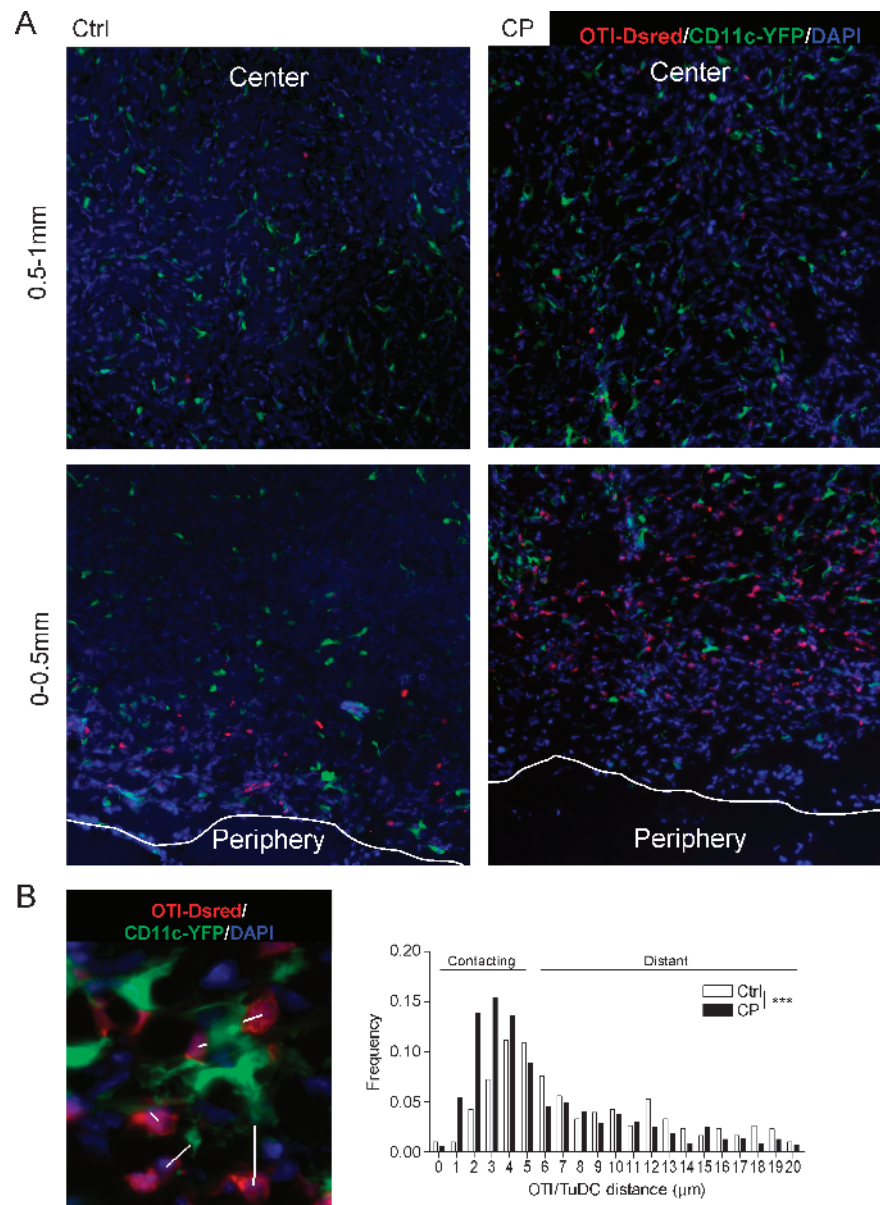


Figure 4. The proportion of TILs contacting TuDCs is enhanced after chemotherapy. OTI-DsRed T cells were adoptively transferred into CD11c-YFP transgenic mice bearing MCA-OVA tumor treated or not with CP. Seven days after adoptive transfer, tumors were carefully orientated and sectioned to define the periphery and the center of the tumor. (A) Representative tumor sections are shown and the distance from the periphery is indicated. OTI T cells are red, YFP⁺ cells are green, and tumor parenchyma is stained by DAPI (blue). (B) Representative examples of the OTI T cell/YFP⁺ distance measurement (white bars) between the center of the T cell and its proximal YFP⁺ cell. Graph represents the frequency distribution of the distances (right). Mean radius of OTI T cell is 5 μ m, and conjugates with a distance less than 5 μ m are considered as contacting cells [$n = 304$ OTI cells for Ctrl (white bars) and $n = 880$ OTI cells for CP-treated mice (black bars) pooled from two to three different tumors].

OTI T cells made more stable and confined contacts with YFP⁺ cells in MCA-OVA compared to 22% in MCA tumors (Figure 3D). We conclude that OTI T cells make antigen-specific interactions with TuDCs and that chemotherapy does not affect this behavior.

To evaluate whether the TIL/TuDC interactions characterized could be observed in another tumor model, we used the EL4 thymoma injected i.v. to C57Bl6 mice. EL4 cells spontaneously localize to several organs such as kidney and liver, where they develop into tumor nodules and induce animal death between 18 and 27 days (Figure W3A). Unfortunately, the OVA-expressing EL4 cell line is strongly immunogenic and was fully rejected when injected i.v. To examine CD8⁺ T cell in-

filtration, we adoptively transferred purified polyclonal CD8⁺ T cells from the lymph nodes of naïve Actb-DsRed/BL6 mice, 3 days after EL4 cell injection into CD11c-YFP mice. We performed intravital imaging of tumor nodules in the kidney on anesthetized mice 18 days after tumor inoculation and quantified the interaction between TILs and TuDCs (Figure W3B and Movie W7). Eighty percent of kidney-infiltrating CD8⁺-DsRed TILs made interactions with TuDCs. Up to 60% were stable or confined similarly to antigen-specific interactions observed in the MCA-OVA tumors (Figure W3C). We conclude that preferential TIL interactions with TuDCs are applicable to several kinds of tumors.

The Proportion of TIL Contacting TuDC Is Enhanced after Chemotherapy

Two-photon imaging allows the visualization of only peripheral areas of the tumor. Thus, we further evaluated by histologic analysis on orientated sections of MCA-OVA tumors (as described [23]) the proportion of OTI T cell in contact with TuDCs, 7 days after adoptive transfer at the time tolerance was induced. In untreated mice, OTI T cells were only located at the periphery compared to CP-treated mice for which OTI T cells infiltrated in higher number and in deeper regions of the tumor (Figure 4A). Considering that the mean radius of OTI T cells is 5 μm , quantification of the distance between the center of OTI T cell and the nearest TuDC showed that 29% and 54% of OTI T cells were in contact (less than 5 μm) with YFP⁺ cells in untreated and CP-treated mice, respectively (Figure 4B). Thus, the proportion of TILs contacting TuDCs is enhanced after chemotherapy.

TIL Infiltration Is Stopped in TuDC-Rich Areas

We hypothesized that TuDC network would influence OTI T cell infiltration after CP treatment. Seven days after adoptive transfer, peripheral regions of the tumor were filled by collagen fibers (Figure 5A). DAPI injection revealed that collagen-rich areas were full of

dead cells (Figure 5B). Analysis of T cell motility confirmed that in “collagen-rich” regions, T cells displayed higher velocity and straightness compared to “TuDC-rich” areas (Figure 5C and Movies W8–W9), suggesting that OTI T cells were trapped by TuDC network.

TILs Are Trapped in TuDC Network

To address the question of whether TuDCs retained OTI T cells, we performed histologic analysis of the distribution of OTI T cells and YFP⁺ cells. Quantification of the YFP⁺ cell density on histologic section, 7 days after adoptive transfer (Figure 6A), clearly showed a positive correlation between the density of OTI T cells and YFP⁺ cells in subregions of the tumor (Figure 6B). We conclude that OTI T cells are trapped by TuDCs through antigen-specific interactions, restricting their infiltration into the whole tumor parenchyma.

Discussion

Conventional chemotherapies provide clinically interesting immunostimulatory outcomes, but most often, effects are transient and fail because of the tumor-induced immunosuppressive environment. TAMs are the main protagonists involved in T cell immunosubversion [18]. They are represented by a very heterogenous and plastic population

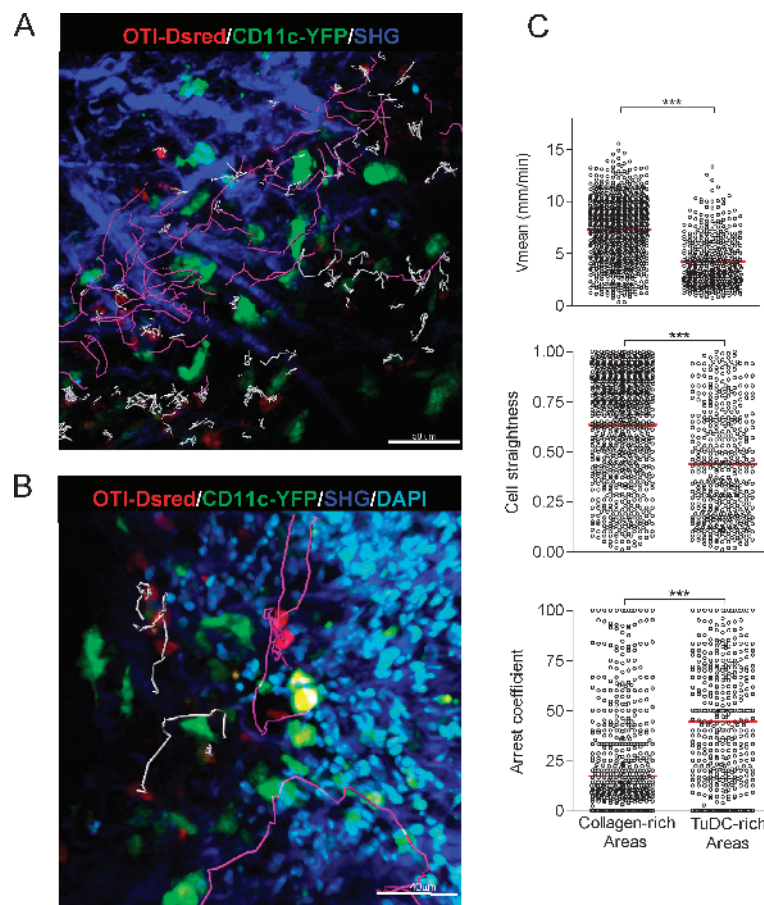


Figure 5. TIL infiltration is stopped in TuDC-rich areas. (A) TPLSM image showing collagen fibers (blue), YFP⁺ cells (green), and OTI T cells (red) in the peripheral area of an MCA-OVA tumor from a CP-treated mouse. Representative track paths of OTI T cell with a straightness of >0.5 are indicated in purple and those with a straightness of <0.5 are in white. (B) TPLSM image after DAPI injection (cyan). Representative track paths of OTI T cell in DAPI-rich area are indicated in purple and those in TuDC-rich area are in white. (C) Graphs represent the quantification of OTI T cell velocity, straightness, and arrest coefficient, 7 days after OTI T cell adoptive transfer in CP-treated mice (data are pooled from at least three independent experiments). Red bar represents the mean. Mann-Whitney statistical significances are indicated.

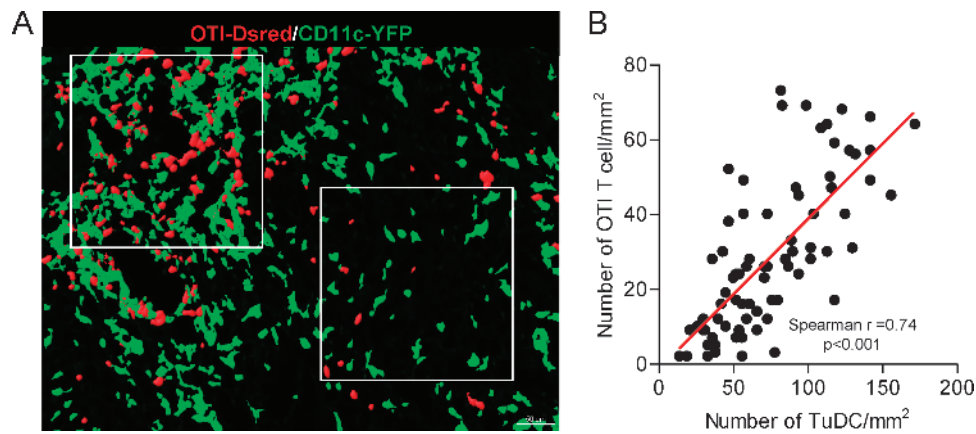


Figure 6. TILs are trapped in TuDC network. OTI T cell and YFP⁺ cell densities were quantified by histologic analysis 7 days after adoptive transfer of OTI-DsRed T cell into CD11c-YFP transgenic mice bearing MCA-OVA tumors treated with CP. (A) The image illustrates cell densities in 250- μ m² fields (white square) after volume rendering. White squares were located by area with homogenous distribution of OTI T cells. (B) Each dot represents the density of OTI T cells as a function of the density of TuDCs. The numbers of red and green cells were determined automatically in 75 different fields from more than 20 images taken serially from the periphery to the center of the tumor, of three different tumors. Red line represents the linear regression. Spearman r and P value are indicated.

[27] and their frequency is associated with poor prognosis. Despite preferential localization of TAMs in hypoxic regions has been documented, their angiogenic, tissue remodeling, growth factor-providing, and immunosuppressive properties are required in the whole tumor parenchyma [28–30]. TuDCs also play a role in the subversion of adaptive immunity [18]. TuDCs share common markers with TAMs, and their phenotypic and functional distinction is still a matter of debate. Recently, Engelhardt et al. provided clear evidence in a new transgenic PyMT-MMTV strain that TuDCs display potent immunosuppressive activity toward adoptively transferred OTI T cells through stable engagement [19]. The role of TuDC in adaptive T cell immunosubversion after chemotherapy is less well documented.

After adoptive transfer into MCA-OVA-bearing mice, tumor-specific CD8⁺ T cells were primed in the draining lymph node and infiltrated the tumor but failed to control tumor growth [24]. Mice preconditioning by CP treatment efficiently increased priming of T cells and tumor infiltration but had only a transient control in tumor progression associated with a rapid loss of effector functions. We deciphered antitumor-specific T cell infiltration after chemotherapy by following their interactions with TuDCs using two-photon real-time imaging technology on explanted tumor tissues. We used the CD11c-YFP transgenic mice and showed that YFP⁺ cells were distributed in the whole parenchyma, exhibited reduced displacements but strong protrusive activity that allowed interconnections, and generated a network of ramified TuDCs like that described previously for macrophages [31]. CP induces dendritic cell (DC) precursor expansion and activation between 10 and 15 days after treatment, which correlates with increased T cell antitumor activity [32–36]. After CP treatment, we observed an accumulation of an immature Ly6C^{high} myeloid population in the YFP⁺ myeloid cell compartment. The possible overlap of this Ly6C^{high} subset with the myeloid-derived suppressor cell Gr1⁺ population may lead to confused interpretations and warrants caution. Nakasone et al. observed CCR2-dependent infiltration of myeloid cells after chemotherapy in a mammary carcinoma model and a delayed tumor relapse in CCR2-deficient mice [37], suggesting that after *de novo* infiltration of mobilized inflammatory monocytes, these last

converted into pro-tumoral myeloid cells. Increased Ly6C and reduced F4/80 expression on YFP⁺ cell after CP treatment suggested that Ly6C^{high} myeloid subset also contributed to the renewal of TuDCs. The number of TuDCs was not affected by CP treatment, suggesting a controlled process of renewal. We next addressed whether this network of YFP⁺ cells would impact T cell infiltration. Live imaging of the explanted tumor showed that OTI T cell more stably engage YFP⁺ cells in MCA-OVA tumors compared to contralateral MCA tumors. These observations suggested that TIL/TuDC preferential interaction was due to the availability of antigen rather than other nonspecific receptor/ligand recognition. Up to 54% of OTI T cells were in close contact with YFP⁺ cells in CP-treated animals, 7 days after adoptive transfer, compared to 29% in control animals, suggesting that TIL/TuDC conjugates accumulated when tumor cells were partially eliminated. Colocalization of the two populations within the whole tumor parenchyma supported that OTI T cells were trapped by the TuDC network. The reasons why TuDCs were resistant to OTI T cell-mediated cell death will require further investigations. Increased doses of CP treatment improved the rejection of the tumor by OTI T cells (data not shown) and emphasized myeloablation, suggesting that destruction of TuDCs by stronger and longer myeloablation would improve the T cell-mediated rejection. We observed that the trapping of TILs within the TuDC network could be also observed in an aggressive model of secondary tumor localization in the kidney, suggesting that trapping of TILs is applicable to different tumors. In this *in vivo* imaging system, we observed that TIL and TuDC interactions were similar to those observed in explanted MCA-OVA tumors, suggesting that the explanted tissue procedure does not affect the interaction. We could not confirm that red fluorescent CD8⁺ T cells within the tumor were antigen-specific. Nevertheless, no red fluorescent CD8⁺ T cells could be detected in non-tumor-bearing mice (unpublished observation) and only activated cells are those that usually infiltrate the tumor.

We propose that despite strong antitumor effector activity induced by chemotherapy, TuDC networks trap T cells through antigen-subversive interactions leading to their tolerance. Our work provides

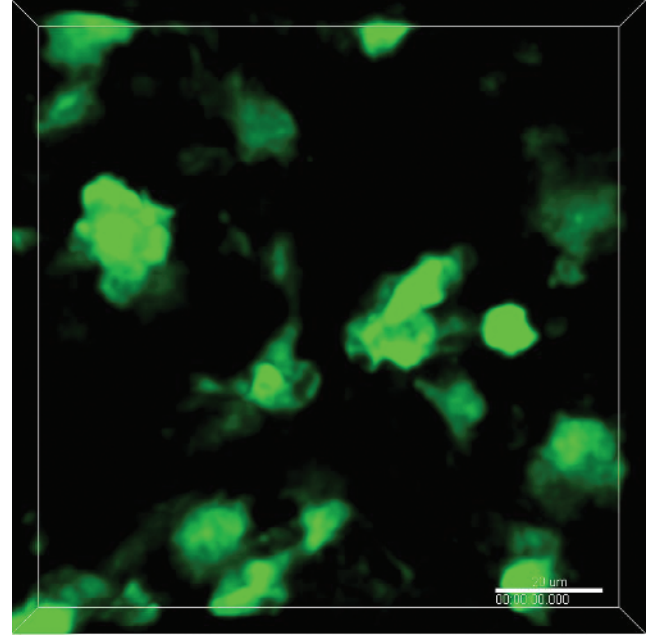
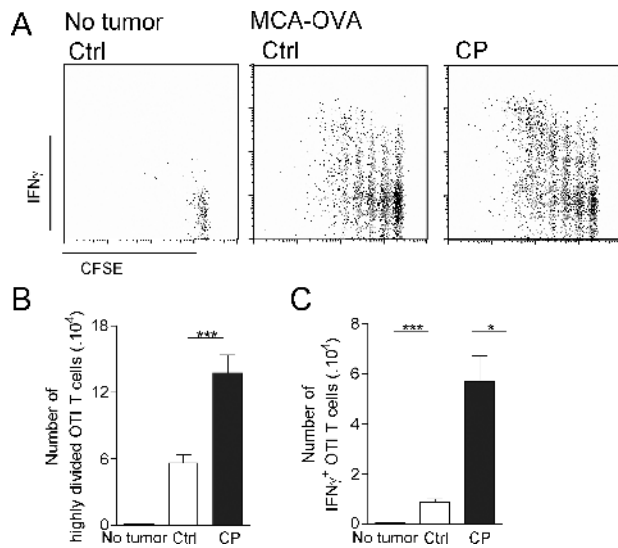
new insights into the spatiotemporal orchestration of TIL/TuDC interactions and provides perspectives for the improvement of anti-cancer chemotherapy.

Acknowledgments

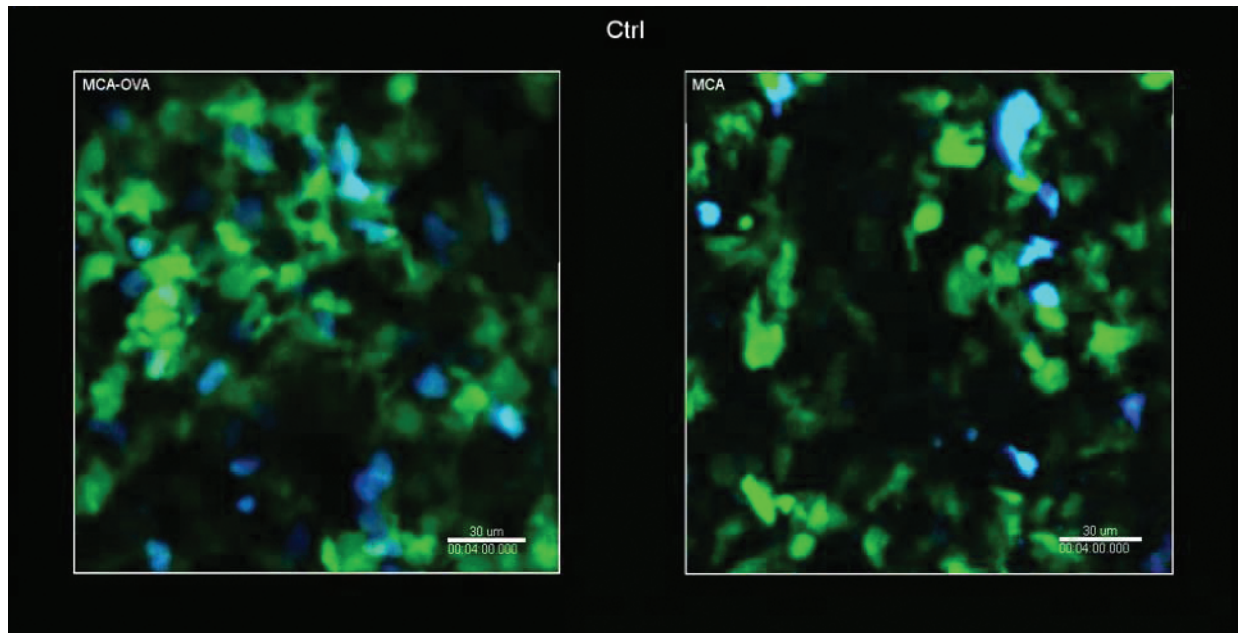
The authors thank Matthew Krummel for helpful discussion, Shanon Murray and William Avery Hudson for editorial assistance, Maria-Grazia Ruocco for critical reading of the manuscript, Plateforme Imagerie Pitié-Salpêtrière (PICPS) for assistance with the two-photon microscope, and the animal facility "NAC" for mice breeding assistance.

References

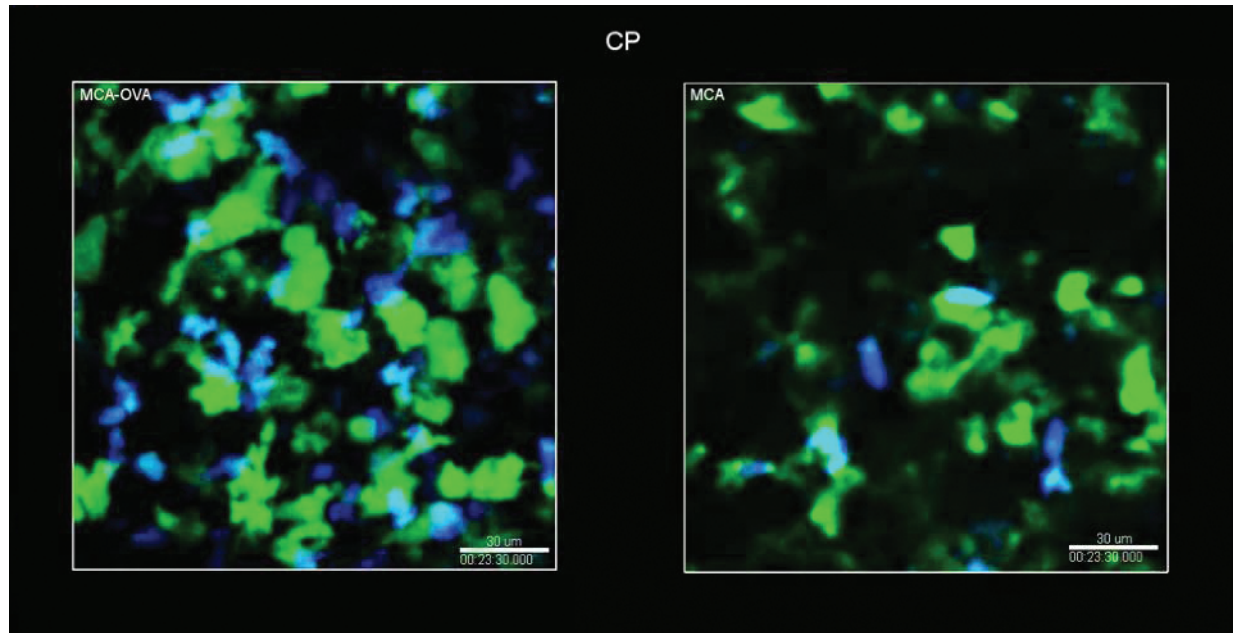
- Ramakrishnan R, Antonia S, and Gabrilovich DI (2008). Combined modality immunotherapy and chemotherapy: a new perspective. *Cancer Immunol Immunother* **57**, 1523–1529.
- Schlom J, Arlen PM, and Gulley JL (2007). Cancer vaccines: moving beyond current paradigms. *Clin Cancer Res* **13**, 3776–3782.
- Dudley ME, Yang JC, Sherry R, Hughes MS, Royal R, Kammula U, Robbins PF, Huang J, Citrin DE, Leitman SF, et al. (2008). Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemotherapy preparative regimens. *J Clin Oncol* **26**, 5233–5239.
- Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, Mignot G, Maiuri MC, Ullrich E, Saulnier P, et al. (2007). Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* **13**, 1050–1059.
- Ghiringhelli F, Apetoh L, Housseau F, Kroemer G, and Zitvogel L (2007). Links between innate and cognate tumor immunity. *Curr Opin Immunol* **19**, 224–231.
- Garnett CT, Palena C, Chakraborty M, Tsang KY, Schlom J, and Hodge JW (2004). Sublethal irradiation of human tumor cells modulates phenotype resulting in enhanced killing by cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res* **64**, 7985–7994.
- Ramakrishnan R, Assudani D, Nagaraj S, Hunter T, Cho HI, Antonia S, Altiock S, Celis E, and Gabrilovich DI (2010). Chemotherapy enhances tumor cell susceptibility to CTL-mediated killing during cancer immunotherapy in mice. *J Clin Invest* **120**, 1111–1124.
- Luznik L, Jones RJ, and Fuchs EJ (2010). High-dose cyclophosphamide for graft-versus-host disease prevention. *Curr Opin Hematol* **17**, 493–499.
- Greenberg PD, Kern DE, and Cheever MA (1985). Therapy of disseminated murine leukemia with cyclophosphamide and immune Lyt-1⁺, 2⁺ T cells. Tumor eradication does not require participation of cytotoxic T cells. *J Exp Med* **161**, 1122–1134.
- Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Sherry R, Restifo NP, Hubicki AM, et al. (2002). Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* **298**, 850–854.
- Ghiringhelli F, Menard C, Puig PE, Ladoire S, Roux S, Martin F, Solary E, Le Cesne A, Zitvogel L, and Chauffert B (2007). 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* **56**, 641–648.
- Lutsiak ME, Semnani RT, De Pascalis R, Kashmiri SV, Schlom J, and Sabzevari H (2005). Inhibition of CD4⁺25⁺ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide. *Blood* **105**, 2862–2868.
- North RJ (1982). Cyclophosphamide-facilitated adoptive immunotherapy of an established tumor depends on elimination of tumor-induced suppressor T cells. *J Exp Med* **155**, 1063–1074.
- Berraondo P, Nouze C, Previle X, Ladant D, and Leclerc C (2007). Eradication of large tumors in mice by a tritherapy targeting the innate, adaptive, and regulatory components of the immune system. *Cancer Res* **67**, 8847–8855.
- Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, and Kroemer G (2008). Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol* **8**, 59–73.
- Pollard JW (2009). Trophic macrophages in development and disease. *Nat Rev Immunol* **9**, 259–270.
- Gabrilovich DI and Nagaraj S (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* **9**, 162–174.
- Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Schioppa T, Saccani A, Allavena P, and Sica A (2004). Infiltration of tumours by macrophages and dendritic cells: tumour-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Novartis Found Symp* **256**, 137–145; discussion 146–138, 259–169.
- Engelhardt JJ, Boldajipour B, Beemiller P, Pandurangi P, Sorensen C, Werb Z, Egeblad M, and Krummel MF (2012). Marginating dendritic cells of the tumor microenvironment cross-present tumor antigens and stably engage tumor-specific T cells. *Cancer Cell* **21**, 402–417.
- Lindquist RL, Shakhar G, Dudziak D, Wardemann H, Eisenreich T, Dustin ML, and Nussenzweig MC (2004). Visualizing dendritic cell networks *in vivo*. *Nat Immunol* **5**, 1243–1250.
- Restifo NP, Spiess PJ, Karp SE, Mule JJ, and Rosenberg SA (1992). A nonimmunogenic sarcoma transduced with the cDNA for interferon γ elicits CD8⁺ T cells against the wild-type tumor: correlation with antigen presentation capability. *J Exp Med* **175**, 1423–1431.
- Zeelenberg IS, Ostrowski M, Krumeich S, Bobrie A, Jancic C, Boissonnas A, Delcayre A, Le Pecq JB, Combadiere B, Amigorena S, et al. (2008). Targeting tumor antigens to secreted membrane vesicles *in vivo* induces efficient antitumor immune responses. *Cancer Res* **68**, 1228–1235.
- Boissonnas A, Feder L, Zeelenberg IS, 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, Scholer-Dahirel A, Simon-Blancal V, Pace L, Valet F, Kissenpfennig A, Sparwasser T, Malissen B, Feder L, and Amigorena S (2010). Foxp3⁺ T cells induce perforin-dependent dendritic cell death in tumor-draining lymph nodes. *Immunity* **32**, 266–278.
- de Bruijn MF, Sliker WA, van der Loo JC, Voerman JS, van Ewijk W, and Leenen PJ (1994). Distinct mouse bone marrow macrophage precursors identified by differential expression of ER-MP12 and ER-MP20 antigens. *Eur J Immunol* **24**, 2279–2284.
- Sunderkotter C, Nikolic T, Dillon MJ, Van Rooijen N, Stehling M, Drevets DA, and Leenen PJ (2004). Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol* **172**, 4410–4417.
- Biswas SK and Mantovani A (2010). Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol* **11**, 889–896.
- Condeelis J and Pollard JW (2006). Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* **124**, 263–266.
- Sica A, Larghi P, Mancino A, Rubino L, Porta C, Totaro MG, Rimoldi M, Biswas SK, Allavena P, and Mantovani A (2008). Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol* **18**, 349–355.
- Allavena P, Sica A, Solinas G, Porta C, and Mantovani A (2008). The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. *Crit Rev Oncol Hematol* **66**, 1–9.
- Caillou B, Talbot M, Weyemi U, Pioche-Durieu C, Al Ghuzlan A, Bidart JM, Chouaib S, Schlumberger M, and Dupuy C (2011). Tumor-associated macrophages (TAMs) form an interconnected cellular supportive network in anaplastic thyroid carcinoma. *PLoS One* **6**, e22567.
- Salem ML, Diaz-Montero CM, Al-Khami AA, El-Naggar SA, Naga O, Montero AJ, Khafagy A, and Cole DJ (2009). Recovery from cyclophosphamide-induced lymphopenia results in expansion of immature dendritic cells which can mediate enhanced prime-boost vaccination antitumor responses *in vivo* when stimulated with the TLR3 agonist poly(I:C). *J Immunol* **182**, 2030–2040.
- Nakahara T, Uchi H, Lesokhin AM, Avogadri F, Rizzuto GA, Hirschhorn-Cymerman D, Panageas KS, Merghoub T, Wolchok JD, and Houghton AN (2010). Cyclophosphamide enhances immunity by modulating the balance of dendritic cell subsets in lymphoid organs. *Blood* **115**, 4384–4392.
- Salem ML, Al-Khami AA, El-Naggar SA, Diaz-Montero CM, Chen Y, and Cole DJ (2010). Cyclophosphamide induces dynamic alterations in the host micro-environments resulting in a Flt3 ligand-dependent expansion of dendritic cells. *J Immunol* **184**, 1737–1747.
- Schiavoni G, Sistigu A, Valentini M, Mattei F, Sestili P, Spadaro F, Sanchez M, Lorenzi S, D'Uro MT, Belardelli F, et al. (2011). Cyclophosphamide synergizes with type I interferons through systemic dendritic cell reactivation and induction of immunogenic tumor apoptosis. *Cancer Res* **71**, 768–778.
- Salem ML, El-Naggar SA, and Cole DJ (2011). Cyclophosphamide induces bone marrow to yield higher numbers of precursor dendritic cells *in vitro* capable of functional antigen presentation to T cells *in vivo*. *Cell Immunol* **261**, 134–143.
- Nakasone ES, Askautrud HA, Kees T, Park JH, Plaks V, Ewald AJ, Fein M, Rasch MG, Tan YX, Qiu J, et al. (2012). Imaging tumor-stroma interactions during chemotherapy reveals contributions of the microenvironment to resistance. *Cancer Cell* **21**, 488–503.



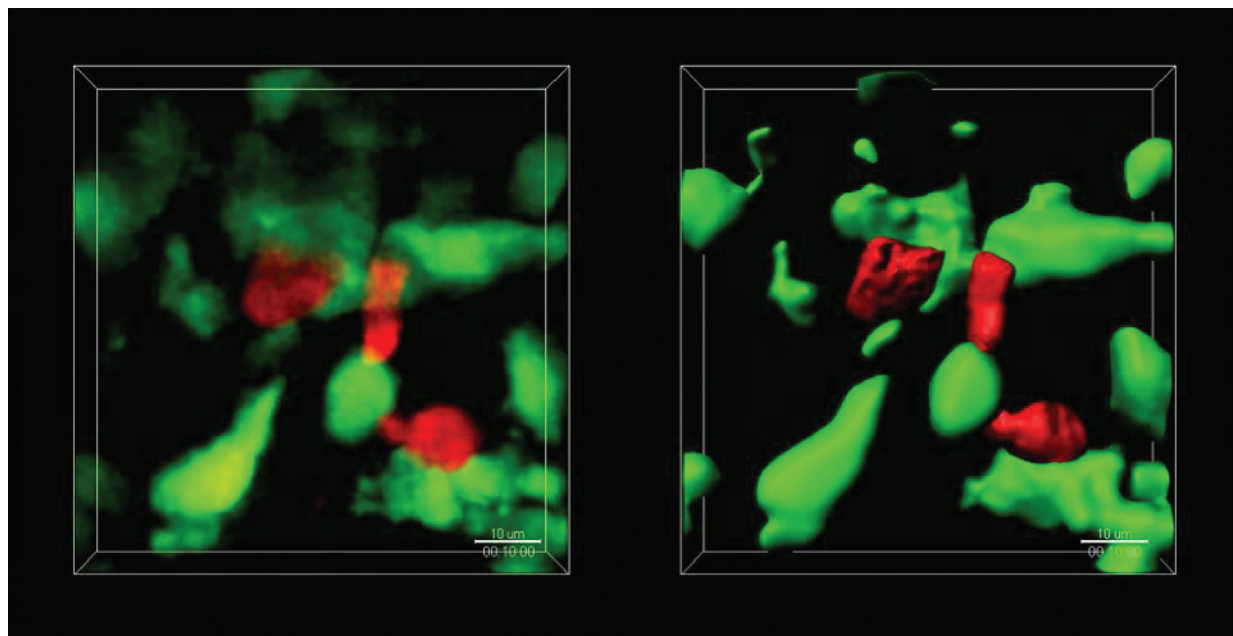
Movie W1. TuDCs make dynamic interconnections within the tumor parenchyma. Time-lapse TPLSM video showing YFP⁺ cells (green) within an MCA-OVA tumor explanted from a CD11c-YFP transgenic mouse.



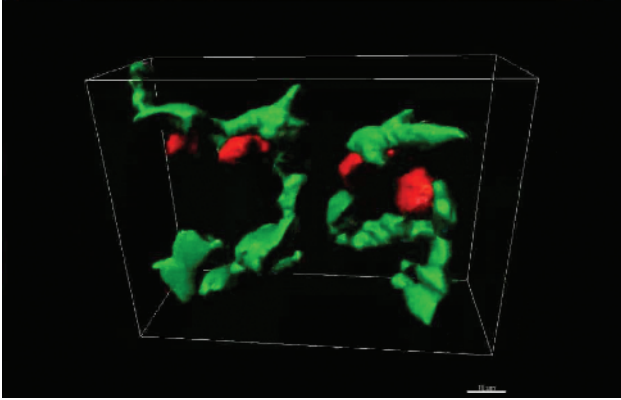
Movie W2. Antigen-specific OTI/TuDC interactions within untreated tumors. Montage of two time-lapse TPLSM videos showing OTI-CFP cells (cyan) and CD11c-YFP⁺ cells (green) within an MCA-OVA tumor (left) and an MCA tumor (right), 4 days after adoptive transfer in the absence of CP treatment.



Movie W3. Antigen-specific OTI/TuDC interactions within CP-treated tumors. Montage of two time-lapse TPLSM videos showing OTI-CFP cells (cyan) and CD11c-YFP⁺ cells (green) within an MCA-OVA tumor (left) and an MCA tumor (right), 4 days after adoptive transfer in a mouse treated with 100 mg/kg CP.



Movie W4. Volume rendering OTI/TuDC interactions. Montage of two time-lapse TPLSM 3D videos showing OTI-DsRed cell (red) and CD11c-YFP⁺ cell (green) interactions within an MCA-OVA tumor before (left) and after (right) volume rendering.



Movie W5. 3D reconstruction of volume rendering OTI/TuDC interactions. TPLSM 3D reconstruction of 1-μm z spacing stack showing OTI-DsRed cell (red) and CD11c-YFP⁺ cell (green) interactions within an MCA-OVA tumor after volume rendering.

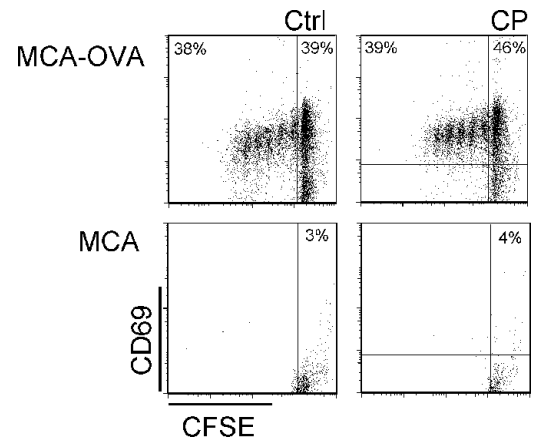
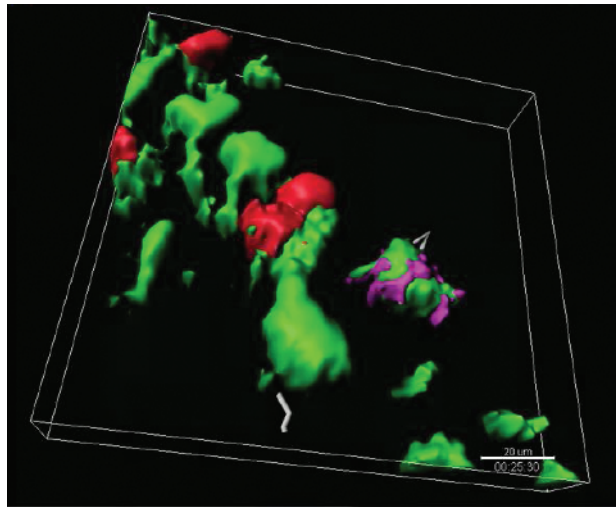


Figure W2. TuDCs cross prime OTI T cells. Representative dot plot of CD69 expression and CFSE dilution profile of OTI T cells 3 days after coculture with CD11c⁺ cells isolated from MCA-OVA tumors (upper panels) or MCA tumors (lower panels) treated or not by CP. Results are representative of two independent experiments.



Movie W6. Volume rendering of distinct OTI/TuDC interactions. Time-lapse TPLSM 3D video showing different types of OTI-DsRed (colored) and YFP⁺ (green) cell interactions after volume rendering. Blue represents distant contact, purple represents confined contact, and red represents stable contacts. OTI T cell track paths are displayed in white.

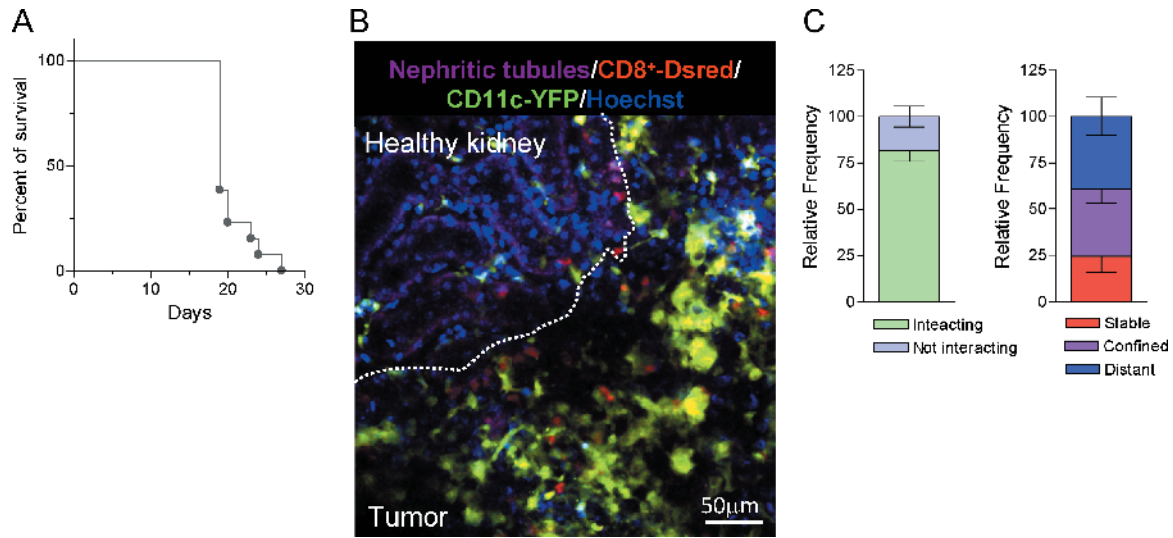
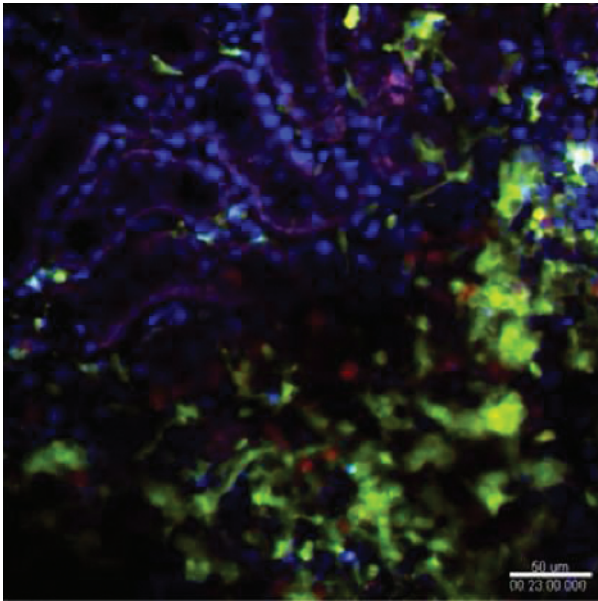
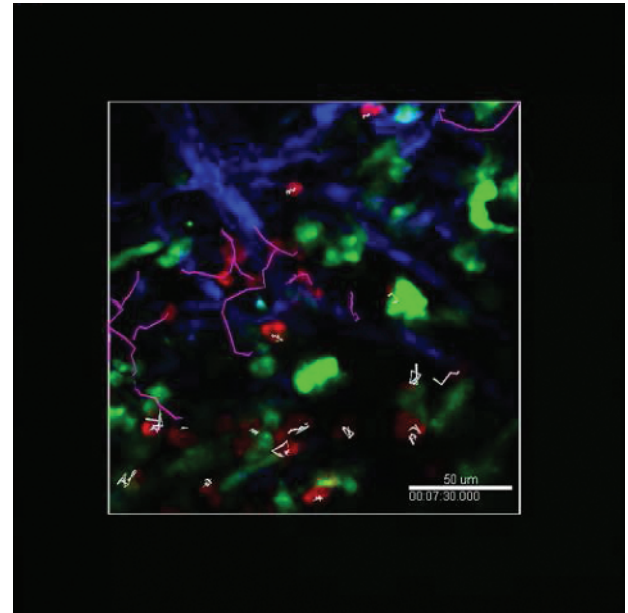


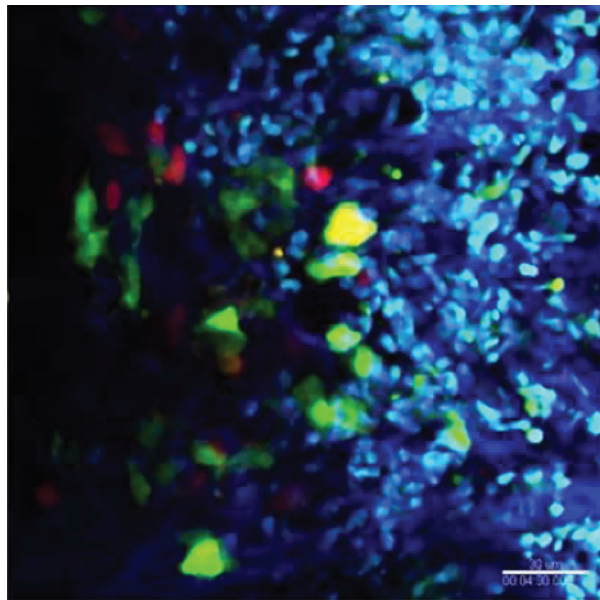
Figure W3. TILs interact with TuDCs of renal tumor. (A) EL4 tumor cells were inoculated i.v. into C57Bl/6 mice and survival was monitored. Kaplan-Meier survival curve represents a pool of 13 mice of three independent experiments. (B) TPLSM image showing CD8⁺-DsRed T cells (red), CD11c-YFP⁺ cells (yellow), and autofluorescent renal tubules (purple) within an EL4-kidney tumor, 18 days after tumor cell injection. Nucleus staining (blue) is performed by i.v. injection of Hoechst (50 μ g in PBS) before imaging. White dashed line delimits the healthy kidney and the tumor nodule. (C) Quantification of the proportion of OTI T cells interacting with YFP⁺ cells and the relative frequency of the different types of OTI/YFP⁺ cell interactions. Bars represent mean \pm SD from eight different movies of three different mice. Total T cells quantified is $n = 334$.



Movie W7. TIL and TuDC interactions in EL4-kidney tumor. Time-lapse TPLSM video showing CD8⁺-DsRed T cells (red) and CD11c-YFP⁺ cells (yellow) within an EL4-kidney tumor, 18 days after i.v. injection. Nucleus staining (blue) of autofluorescent renal tubules (purple) is performed by i.v. injection of Hoechst (50 μ g) before imaging.



Movie W8. OTI T cell dynamics in different regions of the tumor. Time-lapse TPLSM video showing OTI-DsRed cells (red), CD11c-YFP⁺ cells (green), and collagen fibers (SHG signal in blue) within an MCA-OVA tumor, 7 days after adoptive transfer in a mouse treated with 100 mg/kg CP. OTI T cell track paths with a straightness of >0.5 are in purple and those with a straightness of <0.5 are in white.



Movie W9. OTI T cell dynamics in different regions of the tumor. Time-lapse TPLSM video showing OTI-DsRed cells (red), CD11c-YFP⁺ cells (green), DAPI⁺ dead cells (cyan), and collagen fibers (SHG signal in blue) within an MCA-OVA tumor, 7 days after adoptive transfer in a mouse treated with 100 mg/kg CP.

Résultats complémentaires

Si le réseau des TuDcs est faiblement affecté par le CP, nous avons observé que le traitement par CP avait un fort impact sur le compartiment monocytaire. Nous avons montré qu'à cette dose le CP induit une déplétion partielle des monocytes Ly6-C^{high} (CD11b⁺, Ly6-C^{high}, Ly6-G⁻) suivie d'un rebond massif de ces cellules qui vont recoloniser la tumeur (Figure 34).

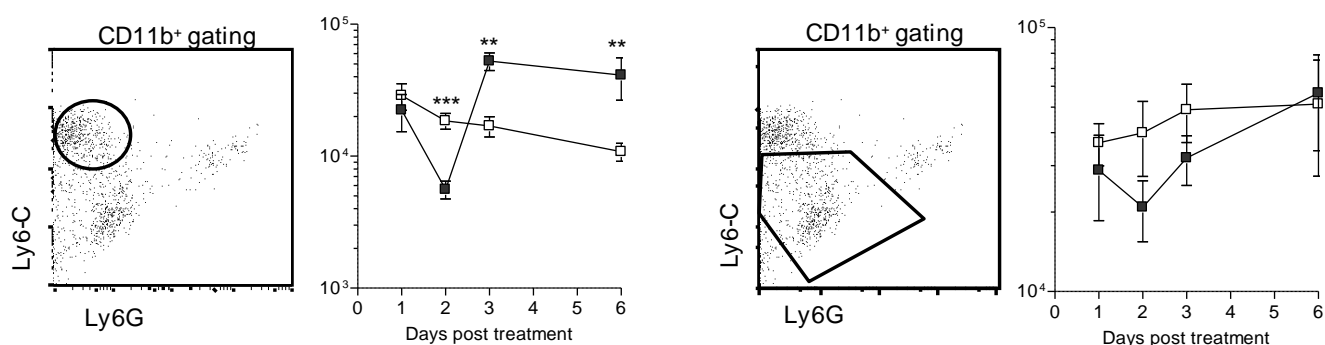


Figure 34: le CP induit une reconstitution massive des monocytes Ly6C^{high} dans la tumeur.

Les cellules tumorales MCA-ova sont injectées (s.c 2.10⁵ cellules par souris), à j7 les souris sont traitées ou non par le CP (i.p 100mg /kg). La tumeur est récupérée entre J1 et J7 post traitement. Les populations monocytaires sont identifiées, quantifiées et comparées aux tumeurs non traitées par le CP. Les carrés noirs représentent le nombre de monocytes dans les tumeurs de souris traitées par le CP et les carrés blancs le nombre de monocytes dans les tumeurs de souris non traitées.

Comme nous l'avons vu précédemment, les monocytes Ly6-C^{high} expriment CCR2 et sont sensibles à CCL2. Cet axe chimiokinique joue un rôle central dans la sortie médullaire et le recrutement périphérique des monocytes. Afin d'évaluer le rôle de la sortie médullaire et de l'infiltration intra tumorale des monocytes Ly6-C^{high} induite par chimiothérapie sur la croissance tumorale, nous avons réalisé des expériences de croissances tumorales au sein de souris CCR2^{-/-}. Nous avons d'abord évalué la reconstitution et la mobilisation des monocytes Ly6-C^{high} à la suite d'un traitement au CP dans les souris CCR2^{-/-}. Nous n'avons pas constaté de différence dans la reconstitution médullaire au sein des souris CCR2^{-/-}. Néanmoins, en accord avec la littérature, nous avons observé une profonde diminution de la reconstitution périphérique des monocytes Ly6-C^{high} (Figure 35).

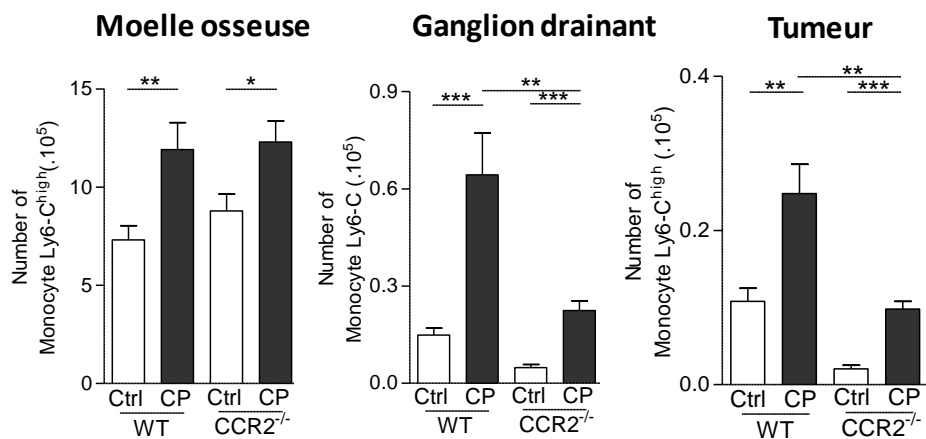


Figure 35 : Accumulation médullaire et faible reconstitution monocyttaire périphérique dans les souris CCR2^{-/-}

Les cellules tumorales MCA-ova sont injectées (s.c 2.10⁵ cellules par souris), à j7 les souris sont traitées par le CP (i.p 100mg /kg). La moelle osseuse, les ganglions et la tumeur sont récupérés à J12 et les monocytes Ly6-C^{high} quantifiés.

La diminution du recrutement monocyttaire est associée à une perte de l'efficacité anti-tumorale induite par le traitement chimiothérapeutique et par le transfert de LTs spécifiques dans les souris CCR2^{-/-} (Figure 36).

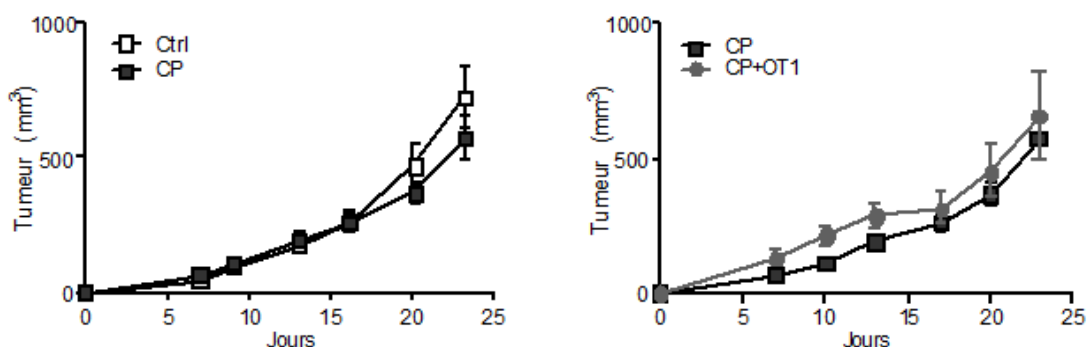


Figure 36: Absence de l'efficacité anti tumorale du CP et du transfert adoptif de LTs OT1 dans les souris CCR2^{-/-}.

Les souris sont injectées par (s.c 2.10⁵ MCA ovas). Sept jours plus tard les souris sont traitées par CP (i.p 100 mg/kg) et reçoivent ou non un transfert adoptif de lymphocytes OT1 (i.v 5.10⁶ à j10).

Ces résultats indiquent que l'efficacité chimiothérapeutique du CP nécessite la mobilisation des monocytes Ly6-C^{high} médullaires et suggère donc un rôle anti-tumoral de cette population en accord avec les résultats du groupe du Dr Berraondo (Medina-Echeverz and Berraondo, 2012). Dans cette étude, la combinaison de CP et d'IL-12 aboutit à l'éradication de 70% des tumeurs dans un modèle de cancer colo rectal. La réponse anti tumorale est associée à l'infiltration de la tumeur par des monocytes Ly6-C^{high}. De plus, ils montrent par des tests d'activation au LPS que les cellules monocytaires issues des tumeurs traitées par le CP+ IL-12 sécrètent moins de molécules immunosuppressives (IL-10 et NO) que les cellules monocytaires issues des tumeurs non traitées. Les CKs et cytokines produites par les cellules monocytaires issues des tumeurs traitées ont un profil comparable à des macrophages de type M1 en contraste avec un profil de type M2 observé pour les cellules monocytaires issues des tumeurs non traitées.

Le recrutement des monocytes dans les différents tissus est un élément clé dans les processus physiologiques et inflammatoires. La compréhension des mécanismes qui gouvernent le trafic monocytaire représente un enjeu majeur dans le développement de stratégies thérapeutiques ciblant cette population, ce qui concerne un grand nombre de pathologies inflammatoires non exclusives du cancer dans les pays développés (e.g. maladies cardiovasculaires, chocs septiques). Je me suis donc intéressé à la compréhension des mécanismes qui gouvernent la mobilisation des monocytes Ly6-C^{high} à la suite d'un traitement chimiothérapeutique.

2-Etudes des mécanismes chimiokines impliqués dans la mobilisation monocyttaire au cours de la chimiothérapie

Les monocytes murins sont des cellules d'origine myéloïde caractérisées notamment par une expression différentielle des RCKs CCR2 et CX3CR1 au cours de leur maturation. L'implication de CCR2 dans la sortie des monocytes Ly6-C^{high} de la moelle vers le sang est relativement bien caractérisée. En revanche, bien que CX3CR1 soit induit dans la maturation des monocytes et impliqué dans un certain nombre de fonctions cellulaires des populations non-classiques telles que la survie, l'adhérence, le crawling dans la lumière vasculaire, son rôle dans le trafic des monocytes classiques ou inflammatoires est peu documenté. Notre travail a consisté à étudier le rôle de CCR2 et de CX3CR1 dans la rétention et la mobilisation des monocytes médullaires dans un modèle murin de reconstitution myéloïde induite par chimiothérapie.

Principaux résultats

Le cyclophosphamide est un agent alkylant qui induit une déplétion profonde et transitoire des cellules myéloïdes (Salem et al., 2010). Nous avons montré que le traitement au CP induit une déplétion transitoire des cellules myéloïdes suivie d'une reconstitution massive des réservoirs de monocytes médullaire et splénique (article 2, figure1). Pour ce faire, nous avons, sur une période de 12 jours, suivi la cinétique de renouvellement des 2 sous populations monocytaires suite à l'administration de CP. Durant les trois premiers jours qui suivent le traitement, les monocytes médullaires et périphériques sont déplétés. Nous avons observé, en parallèle, une forte prolifération des monocytes Ly6-C^{high} médullaires durant cette période (article 2, figureS-1A). Au cinquième jour, le nombre de monocytes des compartiments médullaires sanguins et médullaires est normalisé. Au septième jour, on observe une stabilisation du nombre de monocytes Ly6-C^{high} médullaires corrélée à une accumulation des monocytes Ly6-C^{high} dans le sang et la rate suggérant une sortie des monocytes médullaires. Enfin à J12, le nombre de monocytes est proche des valeurs observées avant le traitement au CP dans les trois compartiments étudiés.

Nous avons ensuite comparé la reconstitution monocyttaire dans les souris sauvages et les souris déficientes pour les RCKs CCR2 ou CX3CR1 afin d'évaluer leur rôle au cours de la reconstitution monocyttaire (article 2, figure1). Durant les trois premiers jours post

traitement la déplétion des monocytes s'est avérée identique au sein des trois souches de souris étudiées.

Au cinquième jour, l'accumulation de monocytes médullaires est équivalente aux souris non traitées au sein des souris WT et CCR2. Cependant, nous avons observé une légère diminution du nombre de monocytes Ly6-C^{high} médullaires au sein des souris CX3CR1 par rapport aux souris WT. Cette diminution est corrélée à une augmentation significative de la mobilisation des monocytes Ly6-C^{high} dans le sang comparée aux souris WT et CCR2. En accord avec le rôle de CCR2 dans la sortie des monocytes inflammatoires de la moelle, nous avons mis en évidence une légère accumulation des monocytes Ly6-C^{high} au sein des souris CCR2^{-/-} observable sept jours après traitement. Le défaut de sortie des monocytes Ly6-C^{high} au sein des souris CCR2^{-/-} se traduit par une profonde diminution de mobilisation de cette population comparée au souris sauvages et CX3CR1^{-/-}.

Au septième jour post traitement, le nombre de monocytes Ly6-C^{high} sanguin est équivalent au sein des souris WT et CX3CR1^{-/-}. Au niveau splénique, nous avons observé une forte augmentation de l'accumulation des monocytes Ly6-C^{high} au sein des souris CX3CR1 comparé aux souris WT, ces monocytes provenant essentiellement des monocytes mobilisés dans le sang mais aussi de la prolifération locale de ces cellules (article 2, figureS1B). Nous avons ainsi mis en évidence une mobilisation accrue des monocytes Ly6-C^{high} au sein des souris CX3CR1^{-/-} comparée au souris WT et CCR2^{-/-} suggérant que CX3CR1 est impliqué dans la mobilisation des monocytes.

Afin d'évaluer plus précisément le rôle de CX3CR1, nous avons évalué l'expression de CX3CR1 sur les monocytes ainsi que l'expression de CX3CL1 sur les cellules endothéliales et stromales médullaires durant la reconstitution monocyttaire déclenchée par le CP au sein de souris WT. Nous avons mis en évidence une diminution de l'expression de CX3CR1 sur les monocytes (article2, figure3A-B) ainsi qu'une diminution de l'expression de son ligand à la surface des cellules endothéliales et stromales médullaires (article2, figureS3A-B). Nous avons montré, par le biais de test d'adhérence cellulaire, que la diminution d'expression de CX3CR1 est corrélée à une diminution spécifique de l'adhérence CX3CL1-dépendante des cellules médullaires ex vivo (article2, figure3C). Ces résultats suggèrent que CX3CR1

contribuerait à la rétention des monocytes dans la moelle osseuse au cours de la reconstitution.

Afin de valider cette hypothèse, nous avons mis au point un système expérimental pour visualiser au niveau de la moelle de l'os calvarien, et en temps réel par microscopie biphotonique, la dynamique monocyttaire au cours des différentes phases de la reconstitution monocyttaire sur la souris « MacBlue » (Hume, 2011) qui expriment un reporter fluorescent CFP sous contrôle de promoteurs Csf1R (article2, figure4). Au cours de la reconstitution, le comportement global des cellules change reflétant une redistribution dans les différents compartiments au cours du temps (article2, figure5). En absence de CX3CR1 la mobilité des cellules semble accrue dans la moelle osseuse en accord avec une diminution de l'adhérence (article2, figure6). Finalement, l'utilisation d'un antagoniste de CX3CR1 a confirmé son rôle sur la mobilité des cellules monocyttaires (article2, figure7).

L'imagerie in vivo de la moelle osseuse combinée à l'administration d'un antagoniste de CX3CR1 nous a permis de montrer un rôle spécifique de CX3CR1 dans le crawling endothéliale et le confinement des cellules monocyttaires au niveau des sinus médullaires et du parenchyme. Nos résultats montrent le rôle de CX3CR1 dans le processus de mobilisation monocyttaire.

Ces résultats sont présentés ci-après en détail dans l'article 2: « *CX3CR1 controls the release of medullar Ly6C^{high}-monocytes during cyclophosphamide-mediated myelorestitution.* » soumis pour publication dans le journal « *Blood* ».

Article 2

CX3CR1 controls the release of medullar Ly6C^{high} monocytes during myelorestitution after chemotherapy in mice

Sébastien Jacquelin¹⁻², Fabrice Licata¹⁻², Karim Dorgham¹⁻², Patricia Hermand¹⁻², Lucie Poupel¹⁻², Elodie Guyon¹⁻², Philippe Deterre¹⁻², David A. Hume³, Christophe Combadière¹⁻² and Alexandre Boissonnas¹⁻²

1 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale UMR S945, Immunité et infection, CHU Pitié-Salpêtrière, 91 boulevard de l'hôpital 75013 Paris, France

2 Université Pierre et Marie Curie (UPMC) Université Paris VI, UMR S945, F-75006, Paris, France

3 The Roslin Institute and Royal (Dick) School of Veterinary Studies, Easter Bush, Midlothian EH25 9RG, Scotland, United Kingdom

Running title: Imaging bone marrow monocyte during myelorestitution

Corresponding author: Alexandre Boissonnas, alexandre.boissonnas@upmc.fr

Tel : +33140779897 Fax : +33140779734

Word count for Text : 3907 ; Abstract: 199 ; 7 Figures ; 43 References ; 4 supplemental Figures and 6 Videos

Abstract

The chemokine receptor CCR2 controls the release of Ly6C^{high} monocytes from the bone marrow and their recruitment to sites of inflammation. A second chemokine receptor, CX3CR1, is differentially expressed on monocyte subsets. We examined the role of CX3CR1 in monocyte trafficking during the recovery phase after cyclophosphamide (CP)-induced myeloablation and observed that, in the absence of CCR2, Ly6C^{high} monocytes accumulated in the bone marrow and peripheral reconstitution was severely impaired compared to wild-type (WT) mice. Contrastingly, in the absence of CX3CR1, Ly6C^{high} monocytes accumulated less rapidly in the marrow but recovered faster in the blood and were more recruited into the spleen, suggesting opposite action between CCR2 and CX3CR1 in the myelorestoration. During the recovery phase, marrow medullar monocytes displayed lower CX3CR1 expression and reduced their adherence to coated CX3CL1. Intravital imaging of the bone marrow showed that CP treatment impacts monocyte trafficking between the parenchyma and the vasculature. Medullar monocytes in CX3CR1^{-/-} mice, and mice treated with a specific antagonist of CX3CR1, displayed increased mean velocity and displacement and reduced their arrest coefficient compared to WT mice. This study indicates that CX3CR1 contributes to the retention of Ly6C^{high} monocytes in the bone marrow and thereby controls their release.

Introduction

Monocytes are myeloid-derived cells that belong to the mononuclear phagocyte system¹. They arise from hematopoietic stem cells in the bone marrow, are released into the bloodstream and colonize peripheral organs in normal and inflammatory conditions² where they differentiate into macrophages or dendritic cells with multiple functions in homeostasis, and innate and acquired immunity³⁻⁵. The alkylating agent cyclophosphamide (CP) is a common chemotherapeutic drug known to adversely cause transient ablation of mature myeloid cell populations⁶⁻⁸. The recovery phase following CP treatment provides a model of clinical relevance in which to study the processes that control monocyte trafficking.

The migration of myeloid cells is controlled by specific chemoattractants called chemokines. Subsets of monocytes in the mouse, defined by the expression of hematopoietic cell differentiation antigen Ly6C, also differ in their expression of the chemokine receptors CCR2 and CX3CR1^{5,9}. Monocytes accumulate in the bone marrow of mice lacking CCR2 and fewer circulating monocytes and monocyte-derived populations are detected in peripheral organs¹⁰⁻¹³. These findings implicate CCR2 in the egress of monocytes from the bone marrow. CCR2 is also required for the early phase of monocyte recruitment to an inflammatory site¹¹, although this recruitment later becomes CCR2-independent¹⁰.

The level of CX3CR1 on monocytes increases with maturation in the marrow and correlates inversely with the Ly6C marker and with CCR2 in the blood. The ligand of CX3CR1, CX3CL1, can be presented either in a soluble form with potent chemoattractive activity¹⁴ or a membrane-anchored form giving rise to a very strong adhesive activity¹⁵⁻¹⁸. CX3CR1 may contribute to cell recruitment during

inflammation through either chemotactism ^{1,19} or adhesion ^{20,21}. In addition, CX3CR1 is required for monocyte crawling or “patrolling” in the lumen of the blood vessels ²². In the current study, we examined the expression and function of CX3CR1 during monocyte recovery after CP-induced myeloablation. We further developed an intravital imaging approach of calvaria bone tissues to examine the role of CX3CR1 in cell motility within the bone marrow. The results indicate a complex interplay between CCR2 and CX3CR1 in the control of monocyte release from the bone marrow.

Material and methods

Mice

Balb/c mice were purchased from Elevage Janvier (Le Genest, Saint Isle, France). CCR2^{-/-} and CX3CR1^{-/-} Balb/c mice, CX3CR1-GFP-Kin (CX3CR1^{gfp/+} and CX3CR1^{gfp/gfp})²³ and Csf1r-Gal4VP16/UAS-ECFP (MacBlue)²⁴ mice were bred in the animal facility, Nouvelle Animalerie Commune, Pitié-Salpêtrière. All mice were used between 8 and 12 weeks old. All experiment protocols were approved by the local animal experimentation and ethics committee guidelines.

Chemotherapeutic treatment

For all experiments, mice were treated or not (NT or Day 0) with a single intraperitoneal injection of Cyclophosphamide (CP) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) at 175 mg/Kg reconstituted in 0.9% saline.

Flow cytometry

Flow cytometry was performed using a LSRII (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) for acquisition and analysis was performed using FlowJo software (Tree Star, Inc, Ashland, OR, USA). Blood was drawn and directly stained with antibodies. Bone marrow cells were harvested by flushing out thighbones or mashing skull bones in PBS with 0.5% of bovin serum albumin (BSA). Spleen cells were filtered using 70µm cell strainer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Surface staining was performed by incubating 50µl of cell suspension (1/10th of the total organ) with 1µg/ml purified anti-CD16/32 (2.4G2, BD Biosciences) for 10min at 4°C to block Fc-mediated binding and for an additional 20min with appropriate dilution of specific antibodies (see supplementary information). After incubation, cell suspensions were washed once in

PBS 0.5% BSA. For cell cycle staining, after surface staining, cells were fixed using Lyse / fix buffer kit (BD Biosciences) for 10 min, washed twice and incubated for 20 min in perm/wash solution. Cells were washed once in PBS. Subsequent DNA staining was performed by incubating the cells with 2 μ M Topro-3 iodide (Life Technologies, Saint Aubin, France) and 50 μ g/ml of ribonuclease A in PBS. After 1 hour, cell suspensions were directly analyzed by flow cytometry.

Adoptive transfer experiment

Bone marrow monocytes were isolated from CX3CR1^{gfp/+} and CX3CR1^{gfp/gfp} mice 5 days after CP treatment and were labeled in PBS with Hoechst 33342 (3 μ M) and CMTMR (10 μ M) respectively. Then cells were co-transferred into C57Bl6 recipient mice treated by CP 2 days before. Bone marrow (1 thighbone), blood and spleen of recipient mice were harvested 20h after adoptive transfer and the percentage of transferred monocytes was calculated by counting the absolute number of GFP⁺Hoechst⁺ and GFP⁺CMTMR⁺ cells recovered in each organ and per ml of blood.

CX3CR1 staining

Bone marrow cells from CX3CR1^{gfp/+} and CX3CR1^{gfp/gfp} mice were harvested and 1/10th of the cell suspensions were incubated in 96 round-bottom well plate in RPMI (Gibco, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with antibiotics and 10% fetal calf serum (FCS) in the presence of 100nM human CX3CL1-Alexa647 (Almac Group, Craigavon, United Kingdom) for 1 hour at 37°C. Cells were washed twice in PBS-BSA 0.5% and directly analyzed by flow cytometry. Results are expressed in mean fluorescent intensity of Alexa-647 gated on GFP^{low} population as previously performed with CX3CL1-Fc²⁵.

Cell Adhesion Assays

25nM full-length CX3CL1-His (R&D Systems, Lille, France) was adsorbed overnight to flat bottom 96 well microtiter plates (Nunc A/S, Roskilde, Denmark) at 4°C in 50µl of 25mM Tris pH8, 150mM NaCl. Well surfaces were then blocked for 2h at room temperature with 1% non-fat milk in the same buffer. For adhesion assays, bone marrow cells from CX3CR1^{gfp/+} or CX3CR1^{gfp/gfp} mice were resuspended in Ca-Mg-free PBS and 5x10⁵ total cells were added per well and incubated at room temperature. For blocking experiments, before adhesion, cells were treated for 15min at room temperature with 500nM CX3CL1, CCL2 (Peprtech-Levallois-Perret, France) or CX3CL1 antagonist protein (F1), (kindly provided by A. Proudfoot, Merck-Serono). After 45min wells were washed to remove non-adherent cells as described previously²⁶. A wide-field picture of each well was captured using a Nikon AZ100 microscope with FITC filter set. The percentage of GFP⁺ adherent cells was calculated as a ratio of the total number of GFP⁺ adherent cells to the total number of GFP⁺ cells loaded in each well, determined by flow cytometric analysis for each condition.

Results

CX3CR1 and CCR2 have opposite actions in Ly6C^{high} monocyte recovery after myeloablation.

In order to investigate the mechanism of myelorestoration, wild type (WT), CCR2^{-/-} and CX3CR1^{-/-} Balb/c mice were treated with a single dose of CP (175mg/kg). The numbers of cell of different myeloid subsets were monitored in the bone marrow (**Figure 1A and Figure S1**), the blood (**Figure 1B and Figure S1**) and the spleen (**Figure 1C and Figure S1**) of Balb/c mice at different time point before and after CP treatment. The CD11b⁺ Ly6C^{high}Ly6G⁻ populations represented the immature or inflammatory monocytes (**Figure 1**). This population expressed CCR2, CD115 and F4/80 (data not shown). The CD11b⁺ Ly6C^{low}Ly6G⁻ population was more heterogeneous (**Figure S1**). The levels of all surface markers varied in different tissues reflecting variation among mature monocytes and subsets of macrophages. Finally, the CD11b⁺ Ly6C^{low}Ly6G⁺ represented neutrophils ²⁷ (**Figure S1**). Within 24 hours, treatment with CP almost completely ablated the Ly6C^{high} monocyte subset in the bone marrow (**Figure 1A**), the blood (**Figure 1B**) and the spleen (**Figure 1C**) in all three mouse strains. In the bone marrow of WT mice, monocytes number recovered by day 5 with an apparent overshoot of the number at steady state ($24.8 \pm 7 \times 10^4$ at day 0 versus $45 \pm 22 \times 10^4$ cells/thighbone at day 5, $p < 0.05$), which was maintained until day 12 (**Figure 1A**). Consistent with the role of CCR2 in inflammatory monocyte egress, Ly6C^{high} monocyte accumulation was somewhat greater by day 7 in the CCR2^{-/-} mice ($49.8 \pm 3.6 \times 10^4$ versus $67.6 \pm 6.1 \times 10^4$ cells/thighbone in WT and CCR2^{-/-} respectively) (**Figure 1A**). By contrast, in CX3CR1^{-/-} mice there was significant reduction in the number of Ly6C^{high} monocytes in the bone marrow at day 5 after CP treatment ($45 \pm 22 \times 10^4$ compared to $25 \pm 4.7 \times 10^4$

cells/thighbone in WT and CX3CR1^{-/-} respectively) (**Figure 1A**). The recovery phase in the bone marrow was associated with a rebound in the blood (**Figure 1B**) and the spleen (**Figure 1C**). Consistently, CCR2 deficiency resulted in a substantial defect in the number of Ly6C^{high} monocytes in the blood and the spleen^{10,11}. Conversely, CX3CR1 deficiency led to an increased accumulation of Ly6C^{high} monocytes at day 5 in the blood (**Figure 1B**) and day 7 in the spleen (**Figure 1C**).

The Ly6C^{low} populations were also ablated by CP treatment, and recovered in the bone marrow and the spleen by day 7 and accumulated by day 12 (**Figure S1A**). The recovery was similar in the absence of CCR2 and CX3CR1 except that the accumulation in spleen was reduced in CCR2^{-/-} mice, which may reflect a role for Ly6C^{high} cells as progenitors (**Figure S1A right**). Finally, neutrophil reconstitution was also similar in all mouse strains (**Figure S1B**), showing that the effects of CCR2- and CX3CR1-deficiency were restricted to Ly6C^{high} monocytes.

The difference observed in the recovery phase of the Ly6C^{high} monocytes could be related to differential proliferation rates between mutant mice. Nevertheless, the number of cycling Ly6C^{high} monocytes was similar in the bone marrow of mutant and WT mice (**Figure S2A**). By contrast, the proportion of cycling cells at day 1 was considerably lower in the CCR2^{-/-} mice (21±2% in CCR2^{-/-} and 61±2.4% in WT mice), which can be attributed to the impaired egress of non-cycling monocytes (**Figure S2A**). The proportion of cycling Ly6C^{high} monocytes in the spleen was very low compared to the bone marrow during the recovery phase (1.3% at day 5 and 3.6% at day 7), increased at later time point (23% at day 12) but was the same in the CX3CR1^{-/-} mice (**Figure S2B**).

In conclusion, CP treatment induces a systemic ablation of myeloid subsets because of the rapid turnover of these populations ²⁸. This depletion is followed by increased rate of Ly6C^{high} monocyte proliferation, egress from the marrow and peripheral replenishment. Our data confirm the known role of CCR2 in this process but indicate an unexpected opposing function of CX3CR1.

CX3CR1 reduced medullar Ly6C^{high} monocytes release into the bloodstream.

Splenic recruitment of Ly6C⁺(Gr1⁺) monocytes into the spleen is partially CX3CR1-dependent after irradiation or infection but CX3CR1-independent in the steady state ^{1,25}, suggesting that Ly6C^{high} monocytes accumulation was linked to higher frequency of blood monocytes released from the marrow in CX3CR1^{-/-} mice. To address this question, we first used CX3CR1^{gfp/+} and CX3CR1^{gfp/gfp} reporter lines ²³ and monitored the two monocyte subsets based on GFP expression (**Figure 2A**). Consistent with the results above, CX3CR1^{gfp/gfp} mice had greater recovery of CX3CR1^{low}Ly6C^{high} monocytes in blood and the spleen than CX3CR1^{gfp/+} mice after CP ablation and the CX3CR1^{high}Ly6C^{low} subset was similarly affected (**Figure 2B**).

We next transferred CX3CR1^{gfp/+} labelled with Hoechst and CX3CR1^{gfp/gfp} bone marrow cells labelled with CMTMR I.V. into CP-treated mice and looked at the proportion of monocytes infiltrating the bone marrow and the spleen (**Figure 2C**). CX3CR1^{gfp/+} and CX3CR1^{gfp/gfp} monocytes from the blood colonized the bone marrow and the spleen equally. Accordingly, we hypothesised that CX3CR1 expression constrains the release of medullar Ly6C^{high} monocytes into the bloodstream after CP treatment.

CP treatment reduced CX3CR1-dependent adherence of marrow monocytes.

CX3CR1 activity in the marrow would depend upon the presence of its ligand. The presence of the membrane bound form of the ligand CX3CL1 was examined with a goat antibody against rat CX3CL1 using flow cytometry of isolated bone marrow cells. Specific staining was detected on both CD45⁺CD31⁻ stromal cell populations and CD45⁺CD31⁺ endothelial cell populations (**Figure S3A**). The number and frequency of CX3CL1-expressing cells decreased transiently following CP administration and recovered by day 5 (**Figure S3B**). Contrastingly soluble CX3CL1 in the serum was not modified by CP treatment (**Figure S3C**).

CX3CR1 expression on bone marrow monocytes was also transiently modified after CP treatment. Green fluorescent protein (GFP) mean fluorescence intensity (MFI) on both subsets of monocyte was reduced at day 3 and start to recover by day 5 on Ly6C^{high} monocytes (**Figure 3A**). To confirm the loss of CX3CR1 function in response to CP, we used CX3CL1 conjugated with Alexa-647 to stain the receptor (**Figure 3B**) as previously performed²⁵. Membrane CX3CR1 staining was lower at day 3 and 5 after CP treatment, compared to untreated mice. Specificity of the detection was confirmed by the absence of signal in CX3CR1^{gfp/gf} mice. The adherence of monocytes to CX3CL1 was also strongly reduced following CP treatment (**Figure 3C**). We conclude that CP treatment induces a strong local modulation of both receptor and the membrane anchored form ligand within the CX3CR1 axis in the bone marrow.

Comparative imaging of CX3CR1^{gfp/+} and MacBlue mice

To understand the function of CX3CR1 in monocyte trafficking in the marrow, we developed intravital imaging of the skull-bone marrow using two different mouse strains: the CX3CR1^{gfp/+} mouse²³ and the MacBlue transgenic mouse^{24,29}. GFP⁺ and

CFP⁺ cells were located in similar areas, the GFP⁺ cells in CX3CR1^{gfp/+} mice were larger with numerous dendritic-like structure whereas CFP⁺ cells of MacBlue mice were mainly rounded (**Figure 4A**). GFP⁺ cells in the CX3CR1^{gfp/+} line include RANK-positive cells able to differentiate into mature osteoclasts ³⁰. On FACS profiling, all CFP⁺ marrow cells from a MacBlue-CX3CR1^{gfp/+} mouse were GFP⁺ but around 22% of GFP⁺ cells were CFP⁻, confirming that cell populations are not fully overlapping (**Figure 4B**). Ly6C^{high} monocytes were CFP⁺/GFP⁺, as expected from the profile on circulating monocytes ²² but the level of GFP was considerably less intense than the CFP, which is amplified in the MacBlue mouse (**Figure 4B**). In addition, the level of CFP was not down-regulated after CP treatment (**Figure 4C**). Hence, the MacBlue mice provide a better model than the CX3CR1^{gfp/+} mice with which to monitor the behavior of medullar monocytes.

CP treatment induced monocyte redistribution in the bone marrow.

Different bone marrow compartments were initially distinguished through microvasculature staining by I.V. injection of rhodamine-dextran. Areas outside the microvasculature were representative of bone marrow parenchyma ³¹. We thus analyzed CFP⁺ cell dynamics in these distinct regions of the bone marrow tissue. Representative wide fields of skull-bone marrow tissue illustrate the cell density in the parenchymal region before and after CP treatment (**Figure 5A and Video 1**). The proportion of Ly6C^{high} monocytes among CFP⁺ cells is indicated in the associated dot plot. Following CP treatment, the massive CP-mediated ablation of CFP⁺ monocytes was evident. From day 1 to day 3, the parenchyma was denuded of cells; however numerous non-motile blastic cells became detectable (**Figure 5A and Video 1**). Ly6C^{high} monocytes represented a lower proportion of CFP⁺ cells at these time points

confirming their preferential elimination. By day 5, the proportion of Ly6C^{high} monocytes increased and cells reappeared in clusters (**Figure 5A and Video 1**). Time lapse imaging showed that at day 7, consistent with the accumulation observed by flow cytometry, the density of cells was so high that distinction between cells was difficult. To follow the migration of the monocyte compartment after ablation and during the recovery phase, we performed automatic 3D tracking of individual CFP⁺ cells and compared the distribution of cell velocity as a function of cell straightness at different time point after CP treatment. Quadrant defined the median value of cell velocity (2μm/min) and the median value of cell straightness (0.25) at steady state in parenchyma. In the steady state, most CFP⁺ cells were relatively sessile, 58% with a slow mean velocity (<2μm/min) and 48% with reduced straightness (<0.25) (**Figure 5A**). The proportions of these motility classes changed only marginally following CP administration, despite the large changes in cell numbers.

Representative fields of skull bone marrow vessels illustrate the cell density in the vasculature before and after CP treatment (**Figure 5B and Video 2**). Monocytes in vascular areas of untreated mice displayed higher median velocities (4μm/min) and more directed migration (median straightness=0.5) from those in the parenchyma (**Figure 5B**). Cells could be arrested, slowly motile or crawling on the endothelium (**Video 3**). After CP treatment, the proportion of very motile monocytes (53% with a mean velocity>4μm/min) diminished by day 1 (40%) and further by day 3 (29%), consistent with the clearance of monocytes from the bloodstream. Very motile monocytes in the vasculature started to reappear by day 5 (41%) when cell egress became evident. In addition, cells accumulated in the vicinity of microvasculature (**Video 2**), apparently adhered for several minutes to the abluminal side of the vessels, and then following transendothelial migration, rapidly disappeared in the

blood flow (**Video 4**). In summary, after CP treatment, monocytes were mostly depleted in parenchymal area of the bone marrow and the vasculature. During the recovery phase, monocytes redistributed in the whole parenchyma, formed proliferating clusters and reconstituted the medullar compartment. They subsequently accumulated in the vicinity of blood vessels and egressed toward the bloodstream.

CX3CR1 reduced monocytes motility in the bone marrow.

We next compared the motility of monocytes in MacBlue CX3CR1^{gfp/gfp} and MacBlue mice in the steady state and during the recovery phase (**Figure 6A, video 5**). Prior to CP administration, in both the parenchyma and the vasculature, mean velocity and cell straightness were higher and arrest coefficient was lower in the absence of CX3CR1 consistent with lower cell adherence (**Figure 6B**). The differences were retained following CP administration. Mean velocity and cell straightness were significantly higher and arrest coefficient lower in the absence of CX3CR1 in both the parenchymal areas and the vasculature (**Figure 6B**).

To confirm the function of CX3CR1 in marrow monocytes, we used the polypeptide antagonist of CX3CR1 (F1)³² in combination with live imaging. An in vitro cell adhesion assay (as described **Figure 3C**) showed that soluble F1 impaired cell adhesion of CX3CR1⁺ cells to fixed CX3CL1 in vitro (**Figure S4A**). To study the impact of the antagonist in vivo, we employed the hydrodynamic-based in vivo transfection procedure described by Liu et al³³ to deliver a plasmid encoding F1 conjugated with the mouse IgG2aFc domain (Ig)³², which increases in vivo stability of the chemokine. In this experimental system, systemic expression of IgF1 was detected for at least three days after transfection (**Figure S4B**). Transfection of the IgF1 or Ig control plasmid was performed three days after CP treatment and the

effect was examined two days later on MacBlue mouse **(Figure 7A, Video 6)**. Consistent with the results obtained in the absence of CX3CR1, CFP⁺ cells increased their mean velocity and their straightness and decreased their arrest coefficient in both the parenchyma and the vasculature of the bone marrow, consistent with reduced adhesion to CX3CL1⁺ stromal and endothelial cells **(Figure 7B)**.

We conclude that CX3CR1 increases monocyte arrest, which limits their trafficking in the different bone marrow compartments consistent with a reduced release into the bloodstream.

Discussion

Ly6C⁺ monocytes are a relatively short-lived population in mouse peripheral blood. Previous studies using monocyte ablation with toxic liposomes ³⁴ suggested that Ly6C⁺ cells are immature, and the marker is down-regulated as they mature in the circulation. As reviewed by Geissman et al. ⁵, adoptive transfer experiments suggest that these cells can also traffic back into marrow. A recent study demonstrated that the maturation of Ly6C⁺ monocytes requires CSF-1 receptor signaling ³⁵. Monocyte production, egress from the marrow, circulating half-life, entry into tissues, local proliferation, and eventual death are all regulated processes that contribute to their many functions in health and disease ^{2,29,36-38}. Although monocytic cell recovery and mobilization after CP treatment is not physiological, it is clearly relevant to recovery post chemotherapy in human patients.

The novel feature of this study was the demonstration of the function of CX3CR1/CX3CL1 axis in the control of release of Ly6C^{high} monocytes. This function was not expected, because the level of CX3CR1 increases with maturation, and the CX3CR1-EGFP reporter is substantially increased in the mature Ly6C^{low} population. In CX3CR1^{-/-} mice, Ly6C^{high} monocyte release was increased resulting in monocyte accumulation into the spleen, whereas accumulation of Ly6C^{low} subsets was similar in WT and CX3CR1^{-/-} mice. By contrast, neutrophil release following CP administration was unaffected in CCR2^{-/-} and CX3CR1^{-/-} mice compared to WT, so the function of CX3CR1 is specific to monocytic cells that express low levels of the receptor. The Ly6C^{low} subset represents a very heterogeneous population including resident monocytes, dendritic cells and macrophages differentiated from the Ly6C^{high} subset ⁵. Ly6C^{low} subset accumulation in the spleen after CP treatment correlated with the reduction in the Ly6C^{high} monocytes, reflecting a role for this last as

progenitors. The increased accumulation might be observable on Ly6C^{high} monocytes only because of the balance between CCR2-dependant egress and CX3CR1-mediated retention. Thus, the relative expression of CCR2 and CX3CR1 may control the trafficking of the different subsets. In addition, it is difficult to determine whether a defect in the survival of Ly6C^{low} populations due to CX3CR1 deficiency could reduce the accumulation of this subset ²¹. CP treatment induced a disruption of the CX3CR1/CX3CL1 axis through both CX3CL1-expressing cell elimination and CX3CR1 down regulation. Interestingly we did not detect any variation in concentration of serum CX3CL1, suggesting that increased release is linked to reduced anchored CX3CL1-mediated retention or recapture in the marrow rather than soluble CX3CL1-mediated chemotaxis. Indirectly, this disruption could impact the survival of macrophages ^{21,39} that participate in the retention of hematopoietic stem cell retention through the CXCR4 axis ⁴⁰. The relative importance of the survival, adhesive and chemotactic properties of CX3CR1 may be determined through further investigation. CX3CR1 has been shown to be involved in the recruitment of monocytes into the spleen during *Listeria* infection and after irradiation but not in steady state ¹. Co-transfer of CX3CR1^{gfp/+} and CX3CR1^{gfp/gfp} bone marrow monocytes in the context of CP treatment showed no differences in splenic homing. The first conclusion is that CX3CR1 is not required to enter the spleen after CP treatment as well as in steady state. As a consequence, the increased accumulation observed in CX3CR1^{-/-} mice is due to increased released from the bone marrow toward the blood. Local proliferation of Ly6C^{high} monocytes could contribute also to their accumulation within the spleen to reconstitute the secondary reservoir ^{13,28,41,42}. However, cell cycle analysis in CX3CR1^{-/-} mice was similar compared to WT mice, which confirmed that the increased accumulation observed between day 5 and 7

could not be attributable to increased rate of cycling in CX3CR1^{-/-} mice. Previous studies have shown that CCR2 is essential for egress of monocytes from bone marrow and their recruitment to an inflammatory site after treatment with intraperitoneal thioglycollate¹¹ or LPS⁴³. By contrast, we found no effect of CX3CR1 deficiency on the depletion of Ly6C^{high} monocytes from the marrow or blood in response to thioglycollate (data not shown) suggesting that CCR2-mediated recruitment overrides the function of CX3CR1 in retention.

In vivo imaging using two-photon microscopy has provided new insights into the behavior of these highly motile cells, but the marrow compartment has been difficult to access. Previous studies used the CX3CR1-EGFP reporter to examine the migration of osteoclast precursors during bone remodeling^{30,31}. In the present study, the use of MacBlue mice permitted effective imaging of the behavior of monocytes within different marrow compartments and showed that monocyte redistribution between these compartments correlated with CX3CR1 down-modulation. Genetic or pharmacological CX3CR1 invalidation increased monocyte mobility in the parenchymal and vascular regions of the bone marrow confirming its implication in monocyte adherence to CX3CL1-expressing cells in untreated as well as CP-treated mice and suggesting that CX3CR1 controls monocyte trafficking also in the steady state.

In conclusion, we have used a novel approach to demonstrate the function of the CX3CR1/CX3CL1 axis in the mobilization of monocytes after a chemotherapeutic treatment. Modulating the rate of cell mobilization during the myelorestorative phase by combining therapeutic regimens targeting the CX3CR1 axis could contribute to recovery from a range of insults and to effective host defense.

Acknowledgments

The authors wish to thank William Avery Hudson for editorial assistance. Dr Behazine Combadière for helpful discussions, the Plateforme Imagerie Pitié-Salpêtrière (PICPS) for assistance with the two-photon microscope and the animal Facility “NAC” for mice breeding assistance. This work was supported by grants from Inserm from Université Pierre et Marie Curie “Emergence”, from la “Ligue contre le cancer”, from “Agence Nationale de la Recherche” (n°ANR-09-PIRI-0003) and the RAIDs FP7 European grant (n° 304810). SJ and was supported by the FP7 European grant Endostem and FL was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). C.C. is recipient of a contract « Interface » from Assistance Publique-Hopitaux de Paris. PD is a scientist of the Centre National de la Recherche Scientifique.

Authorship

SJ: performed research, analyzed and interpreted data, performed statistical analysis and wrote the manuscript.

LF and PH: performed research, analyzed data.

KD: performed research, analyzed data, produced vital reagents

LP, EG: performed research, contributed vital reagents

PD: designed research and wrote the manuscript.

DA H: provided vital reagents and wrote the manuscript.

CC: designed research, contributed vital reagents and wrote the manuscript.

AB: designed research, performed research, analyzed and interpreted data, performed statistical analysis, and wrote the manuscript.

The authors have no commercial affiliation or conflicting financial interests.

References

1. Auffray C, Fogg DK, Narni-Mancinelli E, et al. CX3CR1⁺ CD115⁺ CD135⁺ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation. *J Exp Med*. 2009;206(3):595-606. Prepublished on 2009/03/11 as DOI jem.20081385 [pii] 10.1084/jem.20081385.
2. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(11):762-774. Prepublished on 2011/10/11 as DOI nri3070 [pii] 10.1038/nri3070.
3. Stout RD, Suttles J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J Leukoc Biol*. 2004;76(3):509-513. Prepublished on 2004/06/26 as DOI 10.1189/jlb.0504272 jlb.0504272 [pii].
4. Hume DA. Differentiation and heterogeneity in the mononuclear phagocyte system. *Mucosal Immunol*. 2008;1(6):432-441. Prepublished on 2008/12/17 as DOI mi200836 [pii] 10.1038/mi.2008.36.
5. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*. 2010;327(5966):656-661. Prepublished on 2010/02/06 as DOI 327/5966/656 [pii] 10.1126/science.1178331.
6. Salem ML, Al-Khami AA, El-Naggar SA, Diaz-Montero CM, Chen Y, Cole DJ. Cyclophosphamide induces dynamic alterations in the host microenvironments resulting in a Flt3 ligand-dependent expansion of dendritic cells. *J Immunol*. 2010;184(4):1737-1747. Prepublished on 2010/01/20 as DOI jimmunol.0902309 [pii] 10.4049/jimmunol.0902309.
7. Nakahara T, Uchi H, Lesokhin AM, et al. Cyclophosphamide enhances immunity by modulating the balance of dendritic cell subsets in lymphoid organs. *Blood*. 2010;115(22):4384-4392. Prepublished on 2010/02/16 as DOI blood-2009-11-251231 [pii] 10.1182/blood-2009-11-251231.
8. Medina-Echeverz J, Fioravanti J, Zabala M, Ardaiz N, Prieto J, Berraondo P. Successful colon cancer eradication after chemoimmunotherapy is associated with profound phenotypic change of intratumoral myeloid cells. *J Immunol*. 2011;186(2):807-815. Prepublished on 2010/12/15 as DOI jimmunol.1001483 [pii] 10.4049/jimmunol.1001483.
9. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(12):953-964. Prepublished on 2005/12/03 as DOI nri1733 [pii] 10.1038/nri1733.
10. Serbina NV, Pamer EG. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol*. 2006;7(3):311-317. Prepublished on 2006/02/08 as DOI ni1309 [pii] 10.1038/ni1309.
11. Tsou CL, Peters W, Si Y, et al. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest*. 2007;117(4):902-909. Prepublished on 2007/03/17 as DOI 10.1172/JCI29919.
12. Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, et al. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med*. 2007;204(12):3037-3047. Prepublished on 2007/11/21 as DOI jem.20070885 [pii] 10.1084/jem.20070885.
13. Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, et al. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science*. 2009;325(5940):612-616. Prepublished on 2009/08/01 as DOI 325/5940/612 [pii]

10.1126/science.1175202.

14. Garton KJ, Gough PJ, Blobel CP, et al. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1). *J Biol Chem.* 2001;276(41):37993-38001. Prepublished on 2001/08/10 as DOI 10.1074/jbc.M106434200 M106434200 [pii].

15. Boring L, Gosling J, Chensue SW, et al. Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. *J Clin Invest.* 1997;100(10):2552-2561. Prepublished on 1997/11/20 as DOI 10.1172/JCI119798.

16. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature.* 1997;385(6617):640-644. Prepublished on 1997/02/13 as DOI 10.1038/385640a0.

17. Fong AM, Robinson LA, Steeber DA, et al. Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow. *J Exp Med.* 1998;188(8):1413-1419. Prepublished on 1998/10/23 as DOI.

18. Hermand P, Pincet F, Carvalho S, et al. Functional adhesiveness of the CX3CL1 chemokine requires its aggregation. Role of the transmembrane domain. *J Biol Chem.* 2008;283(44):30225-30234. Prepublished on 2008/08/30 as DOI M802638200 [pii] 10.1074/jbc.M802638200.

19. Pan Y, Lloyd C, Zhou H, et al. Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation. *Nature.* 1997;387(6633):611-617. Prepublished on 1997/06/05 as DOI 10.1038/42491.

20. Imai T, Hieshima K, Haskell C, et al. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell.* 1997;91(4):521-530. Prepublished on 1997/12/09 as DOI S0092-8674(00)80438-9 [pii].

21. Kim KW, Vallon-Eberhard A, Zigmond E, et al. In vivo structure/function and expression analysis of the CX3C chemokine fractalkine. *Blood.* 2011;118(22):e156-167. Prepublished on 2011/09/29 as DOI blood-2011-04-348946 [pii] 10.1182/blood-2011-04-348946.

22. Auffray C, Fogg D, Garfa M, et al. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science.* 2007;317(5838):666-670. Prepublished on 2007/08/04 as DOI 317/5838/666 [pii] 10.1126/science.1142883.

23. Jung S, Aliberti J, Graemmel P, et al. Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol.* 2000;20(11):4106-4114. Prepublished on 2000/05/11 as DOI.

24. Ovchinnikov DA, van Zuylen WJ, DeBats CE, Alexander KA, Kellie S, Hume DA. Expression of Gal4-dependent transgenes in cells of the mononuclear phagocyte system labeled with enhanced cyan fluorescent protein using Csf1r-Gal4VP16/UAS-ECFP double-transgenic mice. *J Leukoc Biol.* 2008;83(2):430-433. Prepublished on 2007/11/01 as DOI jlb.0807585 [pii] 10.1189/jlb.0807585.

25. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity.* 2003;19(1):71-82. Prepublished on 2003/07/23 as DOI S1074761303001742 [pii].

26. Hermand P, Huet M, Callebaut I, et al. Binding sites of leukocyte beta 2 integrins (LFA-1, Mac-1) on the human ICAM-4/LW blood group protein. *J Biol Chem.* 2000;275(34):26002-26010. Prepublished on 2000/06/10 as DOI 10.1074/jbc.M002823200 M002823200 [pii].

27. Fleming TJ, Fleming ML, Malek TR. Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family. *J Immunol.* 1993;151(5):2399-2408. Prepublished on 1993/09/01 as DOI.

28. Leuschner F, Rauch PJ, Ueno T, et al. Rapid monocyte kinetics in acute myocardial infarction are sustained by extramedullary monocytopoiesis. *J Exp Med*. 2012;209(1):123-137. Prepublished on 2012/01/04 as DOI jem.20111009 [pii] 10.1084/jem.20111009.
29. Hume DA. 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. *J Leukoc Biol*. 2011;89(4):525-538. Prepublished on 2010/12/21 as DOI jlb.0810472 [pii] 10.1189/jlb.0810472.
30. Ishii M, Egen JG, Klauschen F, et al. Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature*. 2009;458(7237):524-528. Prepublished on 2009/02/11 as DOI nature07713 [pii] 10.1038/nature07713.
31. Ishii M, Kikuta J, Shimazu Y, Meier-Schellersheim M, Germain RN. Chemorepulsion by blood S1P regulates osteoclast precursor mobilization and bone remodeling in vivo. *J Exp Med*. 2010;207(13):2793-2798. Prepublished on 2010/12/08 as DOI jem.20101474 [pii] 10.1084/jem.20101474.
32. Dorgham K, Ghadiri A, Hermand P, et al. An engineered CX3CR1 antagonist endowed with anti-inflammatory activity. *J Leukoc Biol*. 2009;86(4):903-911. Prepublished on 2009/07/03 as DOI jlb.0308158 [pii] 10.1189/jlb.0308158.
33. Liu F, Song Y, Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther*. 1999;6(7):1258-1266. Prepublished on 1999/08/24 as DOI 10.1038/sj.gt.3300947.
34. Sunderkotter C, Nikolic T, Dillon MJ, et al. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol*. 2004;172(7):4410-4417. Prepublished on 2004/03/23 as DOI.
35. Hume DA, Macdonald KP. Therapeutic applications of macrophage colony-stimulating factor-1 (CSF-1) and antagonists of CSF-1 receptor (CSF-1R) signaling. *Blood*. 2011;119(8):1810-1820. Prepublished on 2011/12/22 as DOI blood-2011-09-379214 [pii] 10.1182/blood-2011-09-379214.
36. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:669-692. Prepublished on 2009/01/10 as DOI 10.1146/annurev.immunol.021908.132557 10.1146/annurev.immunol.021908.132557 [pii].
37. Pollard JW. Trophic macrophages in development and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(4):259-270. Prepublished on 2009/03/14 as DOI nri2528 [pii] 10.1038/nri2528.
38. Soehnlein O, Lindbom L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(6):427-439. Prepublished on 2010/05/26 as DOI nri2779 [pii] 10.1038/nri2779.
39. Landsman L, Bar-On L, Zernecke A, et al. CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. *Blood*. 2009;113(4):963-972. Prepublished on 2008/10/31 as DOI blood-2008-07-170787 [pii] 10.1182/blood-2008-07-170787.
40. Chow A, Lucas D, Hidalgo A, et al. Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. *J Exp Med*. 2011;208(2):261-271. Prepublished on 2011/02/02 as DOI jem.20101688 [pii] 10.1084/jem.20101688.

41. Robbins CS, Chudnovskiy A, Rauch PJ, et al. Extramedullary hematopoiesis generates Ly-6C(high) monocytes that infiltrate atherosclerotic lesions. *Circulation*. 2012;125(2):364-374. Prepublished on 2011/12/07 as DOI CIRCULATIONAHA.111.061986 [pii] 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.061986.
42. Cortez-Retamozo V, Etzrodt M, Newton A, et al. Origins of tumor-associated macrophages and neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(7):2491-2496. Prepublished on 2012/02/07 as DOI 1113744109 [pii] 10.1073/pnas.1113744109.
43. Shi C, Jia T, Mendez-Ferrer S, et al. Bone marrow mesenchymal stem and progenitor cells induce monocyte emigration in response to circulating toll-like receptor ligands. *Immunity*. 2011;34(4):590-601. Prepublished on 2011/04/05 as DOI S1074-7613(11)00074-4 [pii] 10.1016/j.immuni.2011.02.016.

Figure Legends

Figure 1. CX3CR1 and CCR2 have opposing actions in monocyte recovery after myeloablation.

Representative dot plots previously gated on CD11b⁺ cells indicate the gating strategy for Ly6C^{high} monocyte subset from the bone marrow **(A)**, the blood **(B)** and the spleen **(C)** (percent \pm SD of gated subset from untreated mice are indicated). Kinetic of Ly6C^{high} monocyte recovery after CP treatment (175mg/kg) in Balb/c (empty), CCR2^{-/-} (grey) and CX3CR1^{-/-} (black) mice was monitored. D0 corresponds to untreated mice. Graph represents absolute number \pm SEM of Ly6C^{high} monocytes after CP treatment in bone marrow, blood and spleen. (n=6 to 15 mice for each time point out of at least three independent experiments. Two way ANOVA with Bonferroni comparison post-test was performed, Statistical significances between WT and knock-out strains are indicated).

Figure 2. CX3CR1 reduced medullar Ly6C^{high} monocytes release into the bloodstream.

(A) Representative dot plots previously gated on CD11b⁺ cells indicate the gating strategy in the bone marrow, the blood and the spleen for Ly6C^{high}- and Ly6C^{low}- myeloid subsets based on CX3CR1 expression using CX3CR1^{gfp/+} mice. **(B)** Bars represent absolute number \pm SEM of the two monocyte subsets before and 5 days after CP treatment in bone marrow, blood and spleen of CX3CR1^{gfp/+} and CX3CR1^{gfp/gfp} mice. (n= at least 9 mice for each time point pooled from three independent experiments, a one-way ANOVA with bonferroni comparison post-test was performed. **(C)** Bone marrow cells from CX3CR1^{gfp/+} and CX3CR1^{gfp/gfp} mice were harvested 5 days after CP treatment, labeled with CMTMR and Hoechst respectively and grafted into C57Bl6 recipient mice 2 days after CP treatment. The day after bone marrow, blood and spleen were harvested and the percent of transferred cells recovered was calculated for each organ and per ml of blood. Dot plots indicate the gating strategy of transferred cell recovery.

Figure 3. CP treatment reduced CX3CR1-dependent adherence of marrow monocytes.

(A) Dot plots represent Ly6C and GFP expression gated on CD11b⁺Ly6G⁻ cells on both bone marrow monocyte subsets at different time points after CP treatment of CX3CR1^{gfp/+} mice. Mean GFP MFI±SD is indicated (n=5 to 10 mice per time point out of three independent experiments, a one-way ANOVA with Bonferroni comparison post-test was performed). **(B)** Representative histogram plot overlay of CX3CL1-Alexa647 expression gated on bone marrow GFP⁺ cells in each indicated conditions. GFP^{high}-expressing cells corresponding to Ly6C^{low} monocytes have been excluded from the gating. Graph represents mean±SEM of the CX3CL1-Alexa647 MFI in each condition (n=5 to 9 different mice out of 4 independent experiments, one-way ANOVA with Bonferroni comparison post-test was performed). **(C)** Graph represents mean±SEM of the percentage of adherent GFP⁺ bone marrow cells on CX3CL1-coated well from CP-treated or untreated CX3CR1^{gfp/+} and CX3CR1^{gfp/gfp} mice. To evaluate adherence specificity to coated CX3CL1, cells have been previously incubated or not with soluble CX3CL1. GFP⁺ adherent cells on uncoated wells have been subtracted for each condition. (data are collected from triplicate out of two independent experiments, a one-way ANOVA with Bonferroni comparison post-test was performed)

Figure 4. Comparative imaging of CX3CR1^{gfp/+} and MacBlue mice

(A) Representative Two-photon laser scanning microscopy (TPLSM) images of mouse skull bone tissues from CX3CR1^{gfp/+} and MacBlue mice. GFP⁺ cells appear in green, CFP⁺ cells appear in cyan, microvasculature was visualized using rhodamine-dextran (red). Bone matrix is visualized by second harmonic generation (blue). **(B)** Representative dot plots of GFP and CFP co-expression and CD11b, Ly6C, Ly6G expression gated on the indicated populations from MacBlue-CX3CR1^{gfp/+} mouse (Mean percentage±SD from n=6 different mice pooled from two independent experiments are indicated) **(C)** Impact of CP treatment on GFP and CFP expression on skull bone marrow total cell from CX3CR1^{gfp/+} and MacBlue mice.

Figure 5. CP treatment induced monocytes redistribution in the bone marrow

TPLSM images of monocyte cells (Cyan) in parenchymal zones **(A)** and bone marrow vasculature **(B)** of skull bone tissue of MacBlue mice. Vasculature is in red (rhodamine-dextran), bone matrix is in blue (SHG). White bars represent 50µm. Dot plots (upper right corner) indicate the percentage of Ly6C^{high}-monocytes among

CFP⁺ cells. Graphs represent the distribution of cell straightness as a function of cell mean velocity after CP treatment. Quadrants separate cells according to straightness value=0.25 for parenchyma and =0.5 for vasculature and to mean velocity=2μm/min for parenchyma and =4μm/min for vasculature (corresponding to the median values for each compartments in untreated mice). Quadrant statistics are indicated for each condition (parenchyma: NT n=687, D1 n=327; D3 n=219, D5 n=448; Vasculature: NT n=583, D1 n=899; D3 n=566, D5 n=498 from at least three different mice in each conditions).

Figure 6. CX3CR1 reduced monocytes motility in the bone marrow

(A) Representative TPLSM images of mouse skull bone tissues from MacBluxCX3CR1^{gfp/gfp} mouse. Vasculature is in red (rodhamine-dextran), bone matrice is in blue (SHG). **(B)** Summary of CFP⁺ cell velocity, straightness and arrest coefficient in BM parenchyma and vasculature of untreated and CP-treated MacBlue (black) and MacBluxCX3CR1^{gfp/gfp} (blue) mice. Red bars represent median (Data points represent individual cells compiled from at least three different experiments, Mann-Whitney sum tests was performed).

Figure 7. CX3CR1 blockade changed monocyte behavior in the marrow.

(A) TPLSM images of CFP⁺ cells (cyan) in blood vessels (red) of skull bone tissue, 5 days after CP treatment of MacBlue mice and 2 days after in vivo transfection of an Ig-encoding plasmid (upper panel) or IgF1-encoding plasmid (lower panel). Associated track paths of cells are represented by colored lines (right panels). **(B)** Summary of CFP⁺ cell velocity, straightness and arrest coefficient after in vivo transfection with Ig-encoding plasmid (black round) or IgF1-encoding plasmid (blue round) in both parenchyma (left) and vasculature (right). Red bars represent medians (Data points represent individual cells compiled from a minimum of three different experiments, Mann-Whitney sum tests was performed).

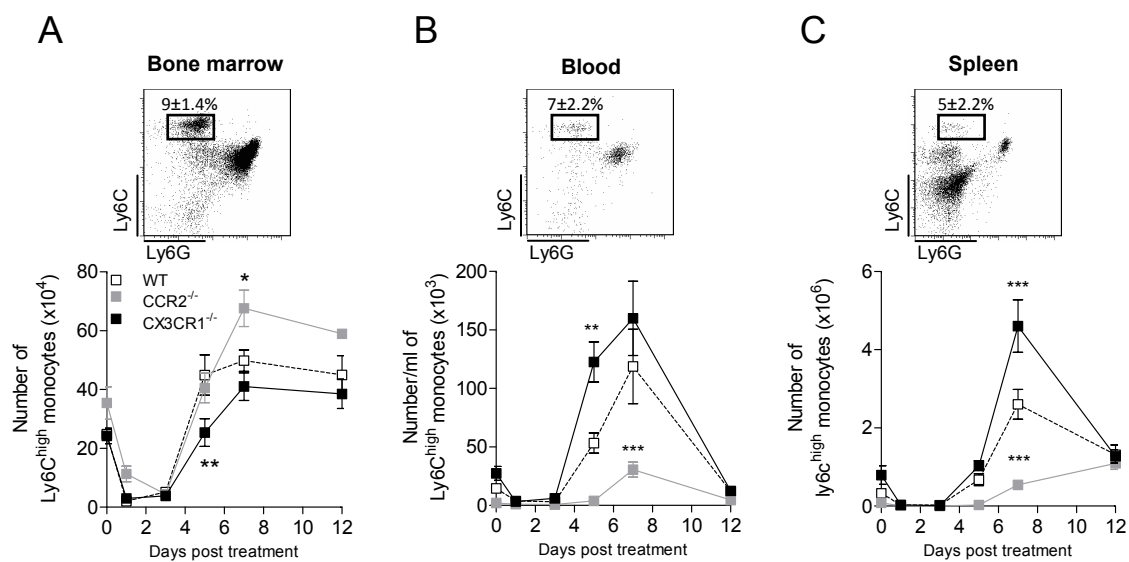


Figure 1. CX3CR1 and CCR2 have opposing actions in Ly6C^{high}-monocyte recovery after myeloablation.

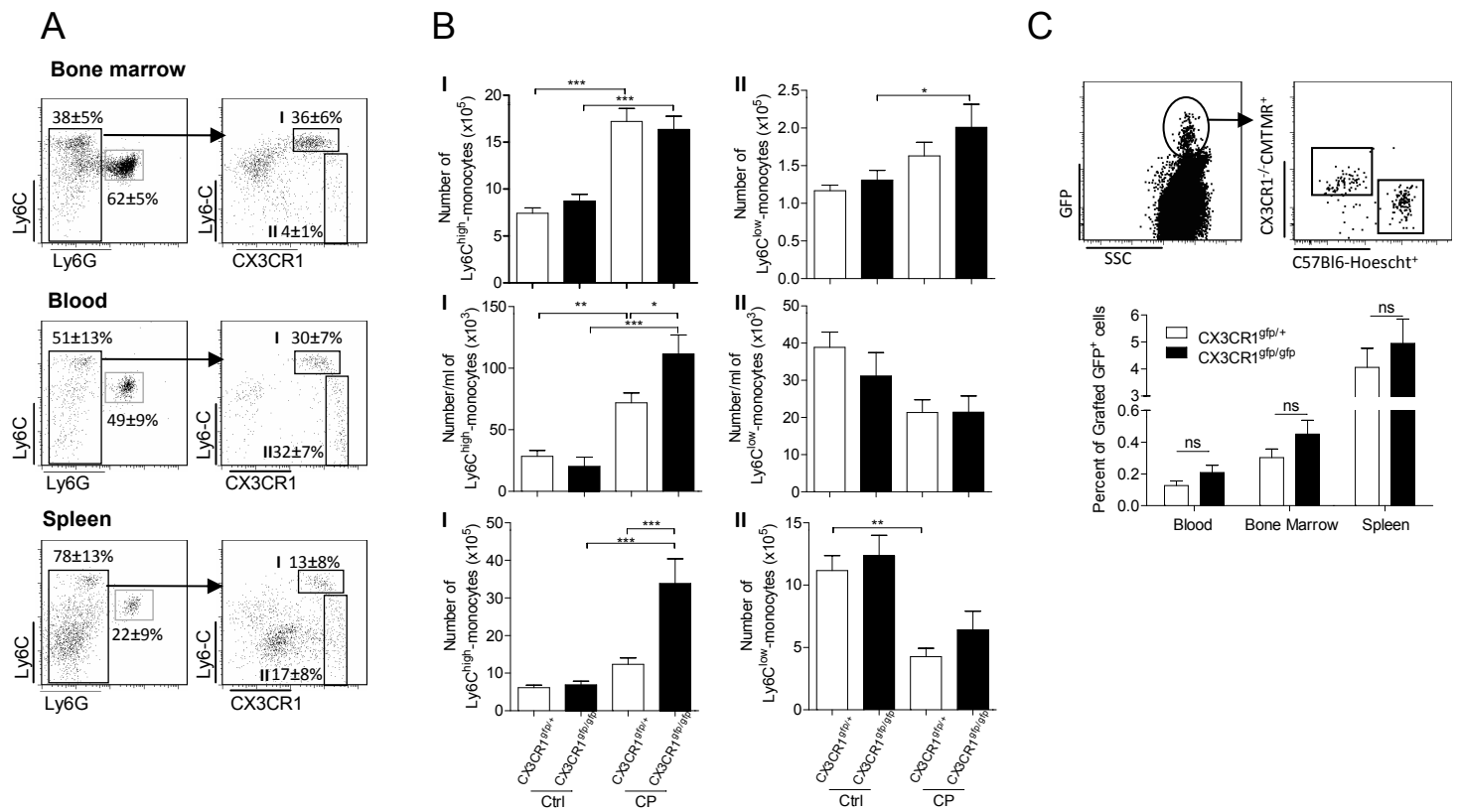


Figure 2. CX3CR1 reduced medullar Ly6C^{high}-monocytes release into the bloodstream.

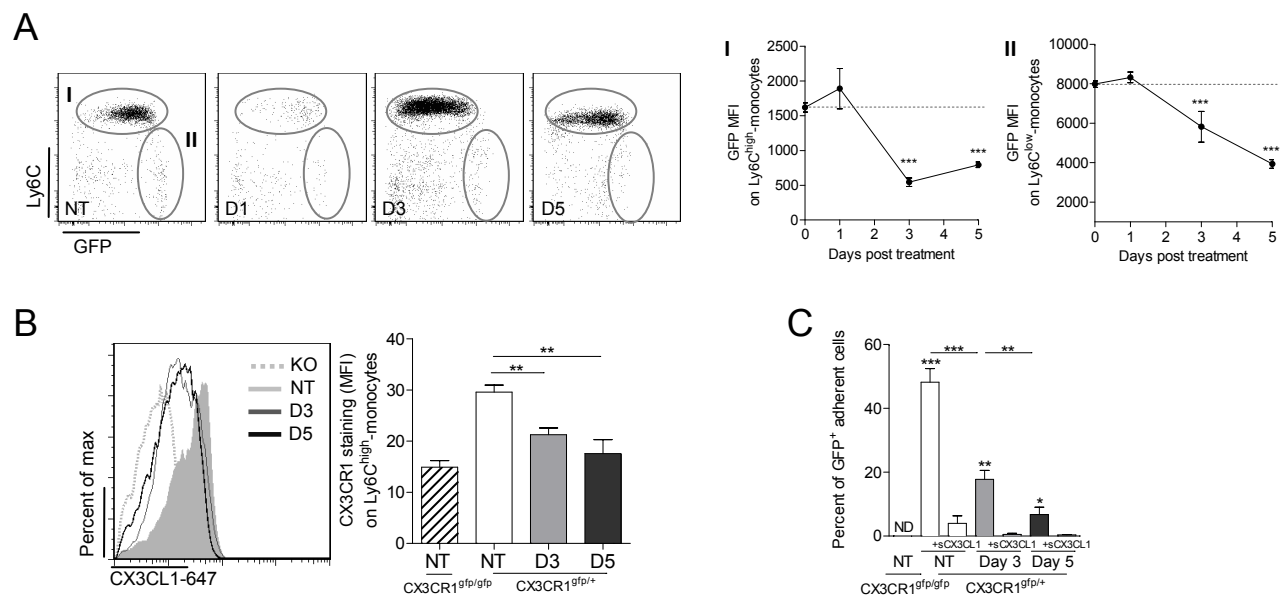
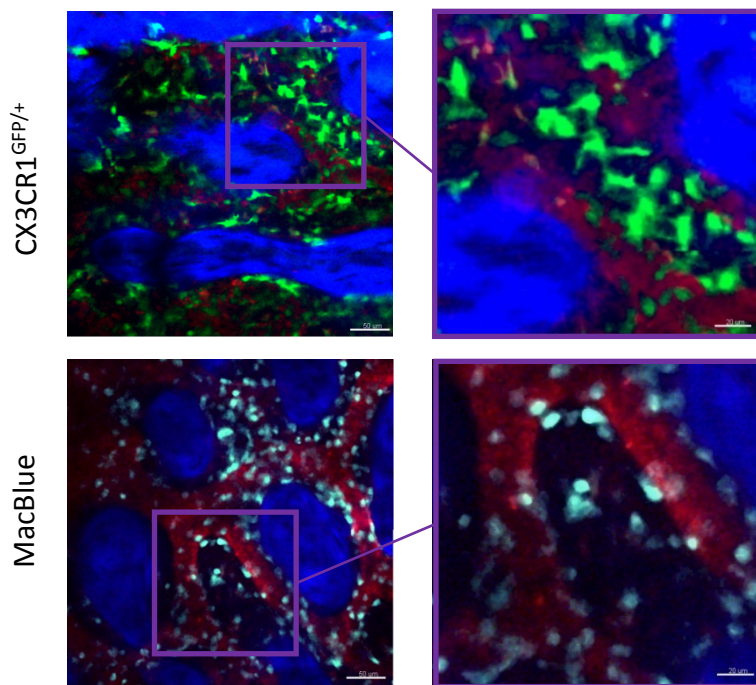
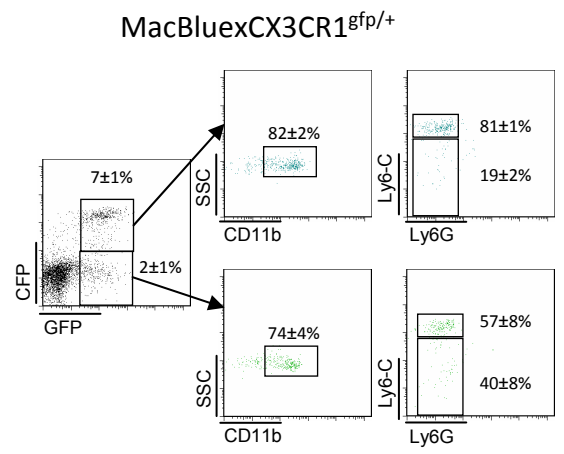


Figure 3. CP treatment reduced CX3CR1-dependent adherence of marrow monocytes.

A



B



C

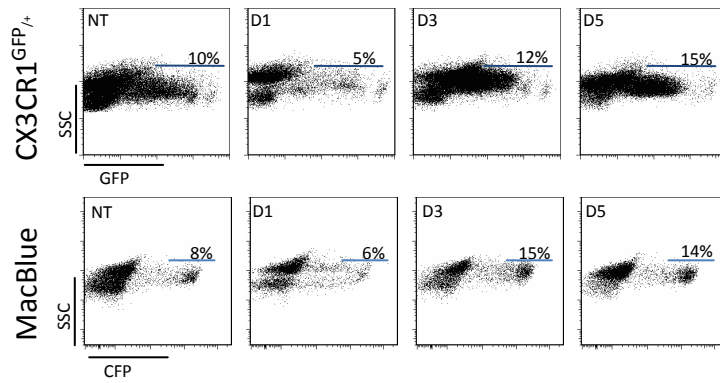


Figure 4. Comparative imaging of CX3CR1^{GFP/+} and MacBlue mice

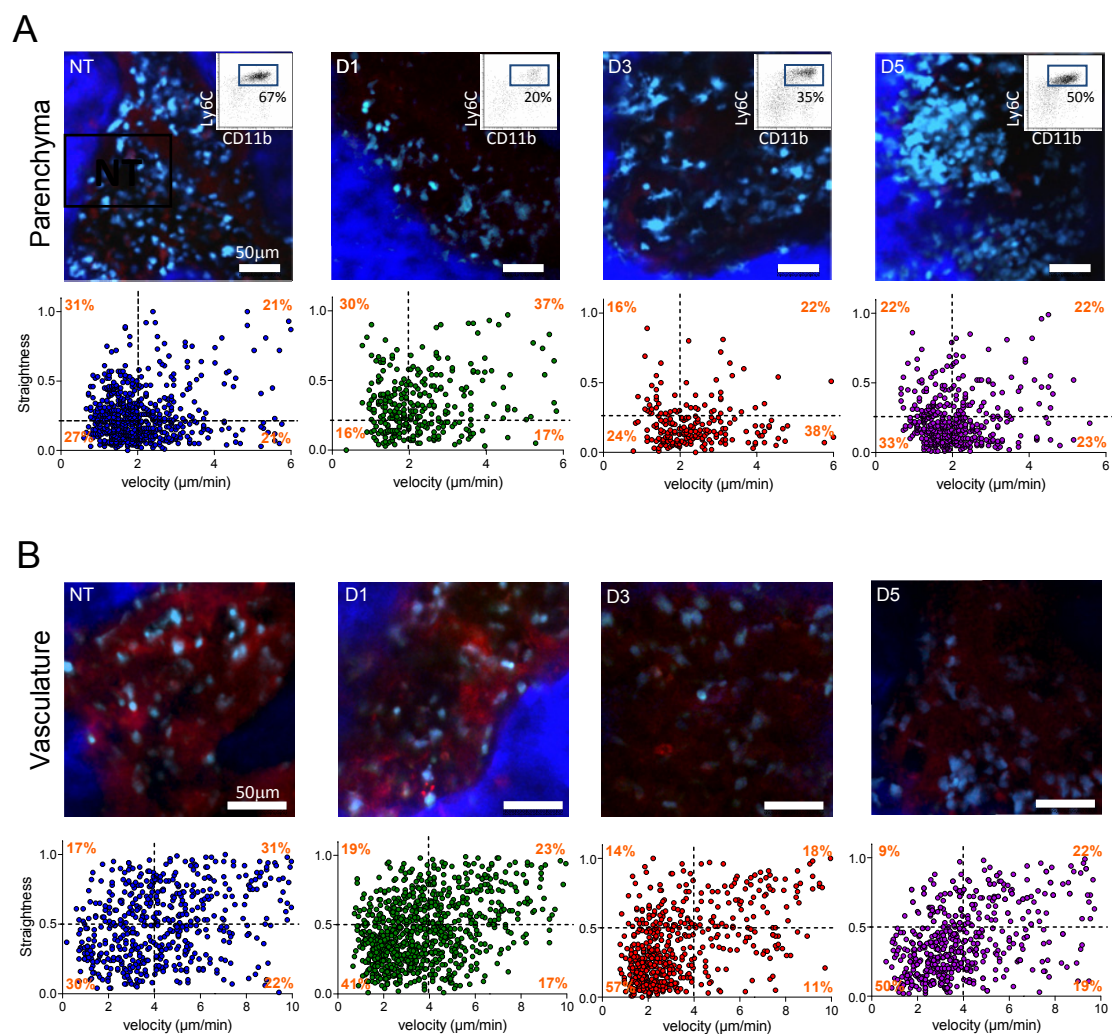
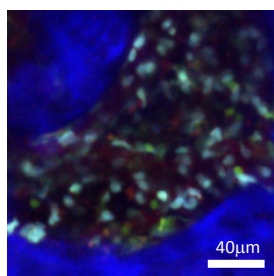


Figure 5. CP treatment induced monocytes redistribution in the bone marrow

A



B

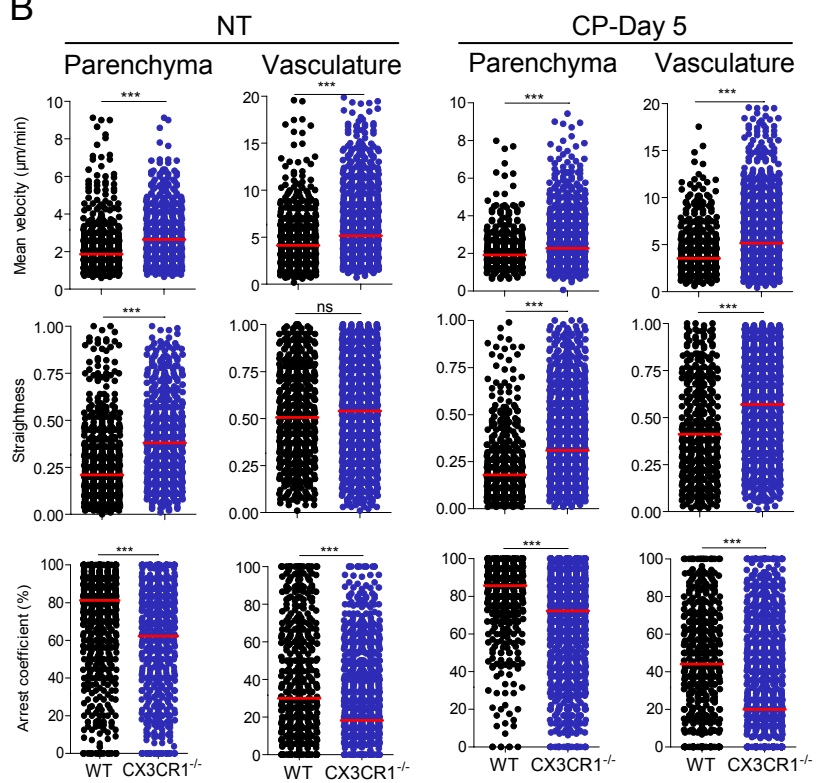
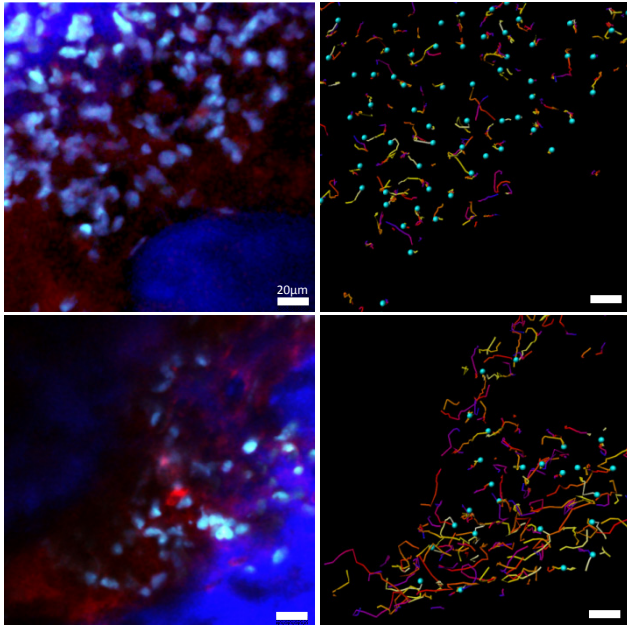


Figure 6. CX3CR1 reduced monocytes motility in the bone marrow

A



B

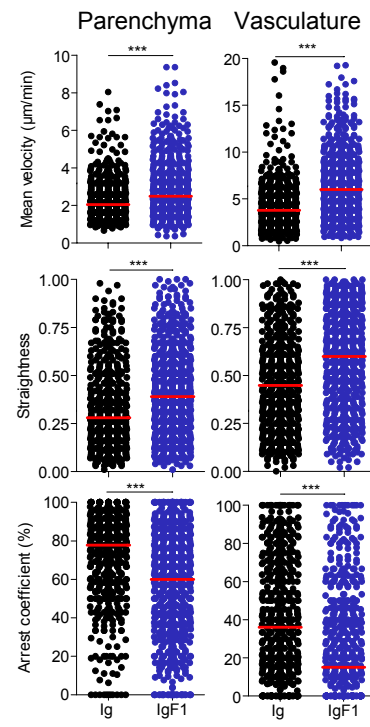


Figure 7. CX3CR1 blockade changed monocyte behavior in the marrow.

Supplementary Informations

Statistical analysis

For multigroup analysis of variances, One-way or two-way anova test was performed followed by Bonferroni post tests to compare Gaussian-like distributions (typically, Flow cytometric analysis of numbers and frequencies of cell populations). Mann-Whitney rank sum tests were performed to compare highly skewed distributions (typically, intravital analysis of cell behavior). Symbols used *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ ***, $p < 0.001$, ns=not significant).

Flow cytometry

The panel of antibodies used is : anti-CD11b (clone M1/70), anti-Ly6C (clone AL-21), anti-Ly6G (clone 1A8), anti-CD45 (clone 30-F11), and anti-CD31 (clone MEC13.3) (Pharmingen, BD Bioscience). Polyclonal IgG1 Goat Anti-rat-Fractalkine (R&D Systems) in combination with polyclonal anti-goat IgG (H+L) alexa 488 (Sigma Aldrich) and Polyclonal IgG1 goat isotype control (R&D Systems).

Calculation of absolute number was performed by adding to each vial a fixed number (10.000) of nonfluorescent 10 μ m polybead@carboxylate microspheres (Polysciences, Niles, IL, USA) according to the formula: Nb of cells = (Nb of acquired cells \times 10.000) / (Nb of acquired beads). Number of cells obtained for each sample was normalized to the whole thigh bone or spleen and per ml of blood.

Multi-photon Imaging

Intravital imaging was performed on mouse calvaria bone tissues. Briefly, mice were anesthetized with Isofluran 2.5% vaporized in a 70/30 mixture of O₂/N₂O. Hair in the neck and scalp were removed and the fronto-parietal skull area was immobilized and exposed using a custom-made stereotactic holder. Mouse temperature was monitored and maintained at 37°C. Parenchymal areas and sinusoids were defined according to vasculature staining using injection of 2x10⁶ MW tetramethylrhodamine-Dextran (Invitrogen) prior to the imaging session.

The Two-Photon Laser Scanning Microscopy (TPLSM) set-up used was a Zeiss LSM 710 NLO multiphoton microscope (Carl Zeiss, Germany) coupled to a Ti:Sapphire Crystal laser (Coherent ChameleonU, 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 in reflection which allow the simultaneous record of three fluorescent channels using a combination of 2 dichroic mirrors (565nm and 690nm) with 565/610, 500/550 bandpass filters and 485 lowpass filter. The excitation wavelength was 870 nm. Cell motility was measured every 30s by 5 consecutive 3 µm z spacing stacks (total 12µm thickness) using a plan apochromat x20 (NA = 1) water immersion objective.

CFP⁺ cells were tracked with time using 3-dimensional automatic tracking with manual correction using Imaris software. Cells that could not be tracked for more than 2 minutes were not considered. Cells localized at the bone surface were not considered. The arrest coefficient is defined as the proportion of time each cell's instantaneous velocity (calculated for every 30 s interval) is lower than 2µm/min. The cell 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. The acquisition and analysis protocols for all experimental conditions to be compared were identical.

In vivo transfection

In vivo transfection was performed as previously described ²⁷. Briefly 10µg of pVRC plasmid encoding the CX3CL1 antagonist Ig-F1 ²⁸ or control plasmid Ig were diluted in 1,7ml isotonic saline NaCl (0.9%) and injected into tail vein over 7 sec. *In vivo* expression of the plasmid was quantified in the serum by ELISA.

ELISA assay

Serum CX3CL1 was dosed using quantikine kit assay (R&D systems) following manufacturer instructions. DO was measured at $\lambda=450\text{nm}$ with a spectrophotometer (FlexStation 3 Molecular Devices). Seric Ig-F1 expression was dosed as described ²⁷. Briefly, serum dilutions (1/10) in PBS-3% milk were incubated 1 hr in 96-well plates (Nunc-Immuno Plates Maxisorp) previously coated with 50µl/well of a 4µg/mL solution of Goat anti-human CX3CL1 antibody (R&D systems, #AF365). After washing, bound chemokine-Fc were revealed with 1/10,000 dilution of horseradish-peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse IgG (Fc specific) antibody (Sigma Aldrich).

Video legends

Video 1. Monocytic cell behavior during the recovery phase in skull bone marrow parenchyma.

Montage of sequential TPLSM movies of skull bone marrow tissue of MacBlue mice at the indicated time points after CP treatment. Monocyte-lineage CFP⁺ cells are in Cyan, bone matrix is visualized by second harmonic generation (blue). 2x10⁶MW rhodamine-dextran is injected before imaging session in order to distinguish bone marrow parenchyma and vasculature (red).

Video 2. Monocytic cell behavior during the recovery phase in skull bone marrow sinusoids.

Montage of sequential TPLSM movies of skull bone marrow tissue of MacBlue mice at the indicated time point after CP treatment. Monocyte-lineage CFP⁺ cells are in Cyan, bone matrix is visualized by second harmonic generation (blue). 2x10⁶MW rhodamine-dextran is injected before imaging session in order to distinguish bone marrow sinusoids (red).

Video 3. Distinct monocytic cells behavior in bone marrow sinusoids.

Montage of TPLSM movies of skull bone marrow tissue of non-treated MacBlue mice. Monocyte-lineage CFP⁺ cells are in Cyan, bone matrix is visualized by second harmonic generation (blue). 2x10⁶MW rhodamine-dextran is injected before imaging session in order to distinguish bone marrow vasculature (red). Representative cell behaviors are named.

Video 4. Transendothelial migration of monocytic cell in skull bone marrow sinusoids.

TPLSM movie of skull bone marrow tissue of MacBlue mice 5 days after CP treatment. Monocyte-lineage CFP⁺ cells are in Cyan, bone matrix is visualized by second harmonic generation (blue). 2x10⁶MW rhodamine-dextran is injected before imaging session in order to distinguish bone marrow vasculature (red).

Video 5. CX3CR1 expression reduces monocyte motility in the bone marrow.

Montage of TPLSM movies of skull bone marrow tissue of MacBlueCX3CR1^{gfp/gfp} mice non-treated and 5 days after CP treatment. CFP⁺ cells are in Cyan, GFP⁺CFP⁻ cells are in green, bone matrix is visualized by second harmonic generation (blue). 2x10⁶MW rhodamine-dextran is injected before imaging session in order to distinguish bone marrow vasculature (red).

Video 6. CX3CR1-blockade increases monocyte motility in the bone marrow.

Montage of TPLSM movies of skull bone marrow tissue of MacBlue mice 5 days after CP treatment and 2 days after *in vivo* transfection with Ig-encoding plasmid (left) and IgF1-encoding plasmid (right). Monocyte-lineage CFP⁺ cells are in Cyan, bone matrix is visualized by second harmonic generation (blue). 2x10⁶MW rhodamine-dextran is injected before imaging session in order to distinguish bone marrow vasculature (red).

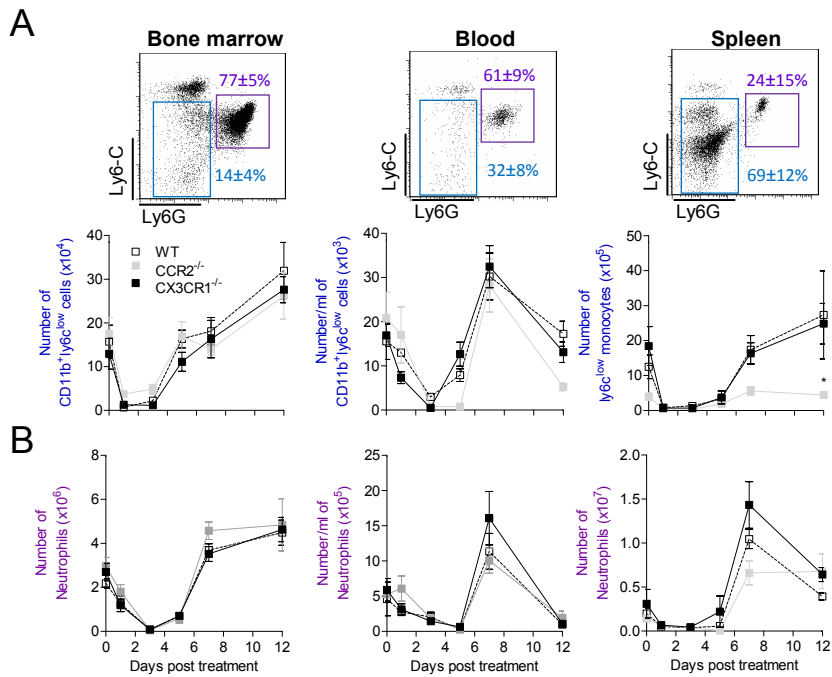


Figure S1. Phenotype and reconstitution of bone marrow myeloid cells populations.

Representative dot plots gated on CD11b⁺ cells indicate the gating strategy for Ly6C^{low}-populations (blue) and neutrophils (purple) (percent±SD of gated subsets from untreated mice are indicated). Graph represents absolute number±SEM of **(A)** CD11b⁺Ly6C^{low}-populations and **(B)** neutrophils after CP treatment in bone marrow blood and spleen. D0 corresponds to untreated mice (n=6 to 15 mice for each time point out of at least three independent experiments. A two way ANOVA with Bonferroni comparison post-test was performed, Statistical significances between WT and knock-out strains are indicated).

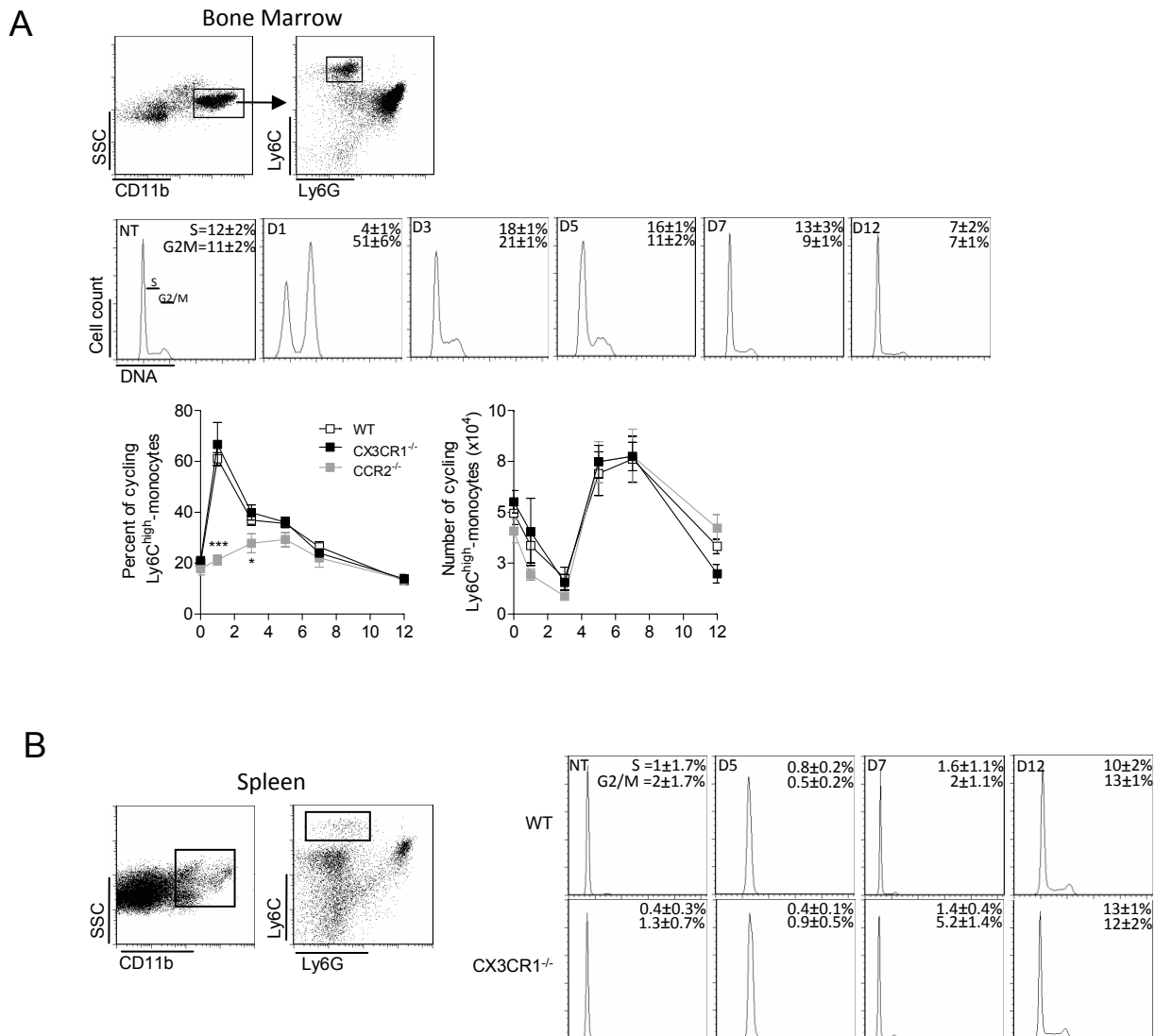


Figure S2. Monocytes cycling was similar in chemokine receptor deficient mice

(A) Representative histogram plots of medullar Ly6C^{high}-monocytes DNA content from Balb/c mouse at different time point after CP treatment. Percentage±SD of cycling cells (S+G2/M) are indicated. Graphs represent Mean percentage±SEM and absolute number±SEM of cycling Ly6C^{high}-monocytes from Balb/c (white), CCR2^{-/-} (grey) and CX3CR1^{-/-} (black) mice (n=9 to 13 mice out of three independent experiments, Two way ANOVA was performed). **(B)** Dot plots represent the gating strategy from untreated mice and DNA content analysis of spleen Ly6C^{high}-monocytes in untreated WT and CX3CR1^{-/-} Balb/c mice 5, 7 and 12 days after CP treatment. Mean percentage±SD of cell in S and G2/M phase are indicated (n=5 mice for each group. Experiment has been repeated twice).

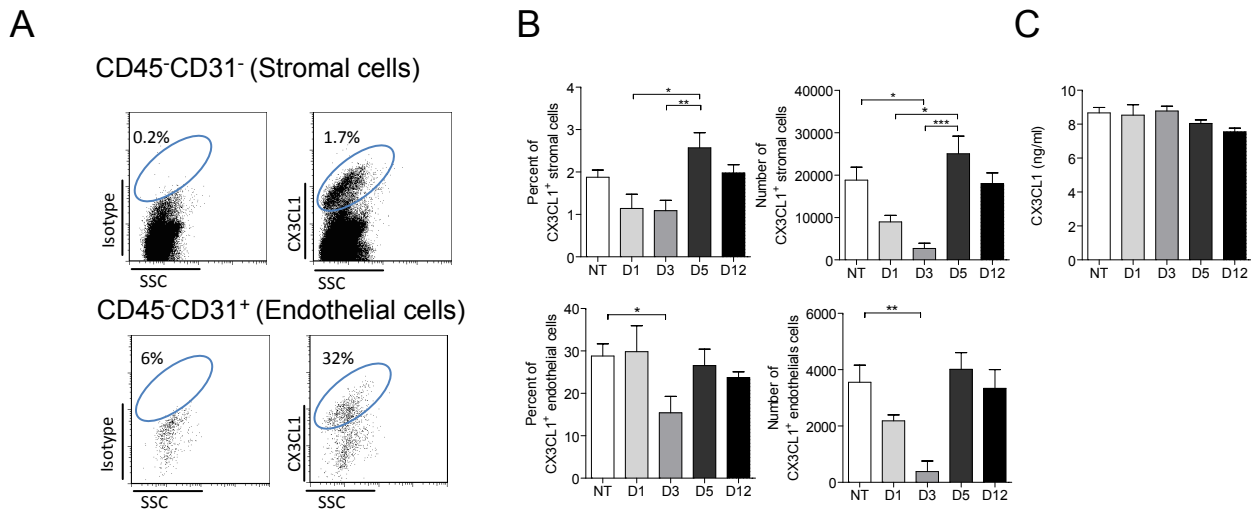


Figure S3. CP treatment affects CX3CL1/CX3CR1 axis in the bone marrow stroma.

(A) Representative dot plots showing CX3CL1 expression gated on bone marrow CD45⁻CD31⁻ (stromal cells) and CD45⁻CD31⁺ (endothelial cells) using a goat poly-IgG1 anti-CX3CL1 specific antibody (right panels) compared to goat poly-IgG1 isotype control (left panels). **(B)** Graphs represent mean percentage \pm SEM (left panels) and numbers \pm SEM (right panels) of CX3CL1⁺ stromal (upper panels) and endothelial cells (lower panels) in the bone marrow of Balb/c mice treated or not with CP (n=4 to 9 mice out of 3 independent experiments, one-way ANOVA with bonferroni comparison post-test was performed). **(C)** Serum quantification of CX3CL1 after CP treatment (n=6 mice per time point out of 2 independent experiments).

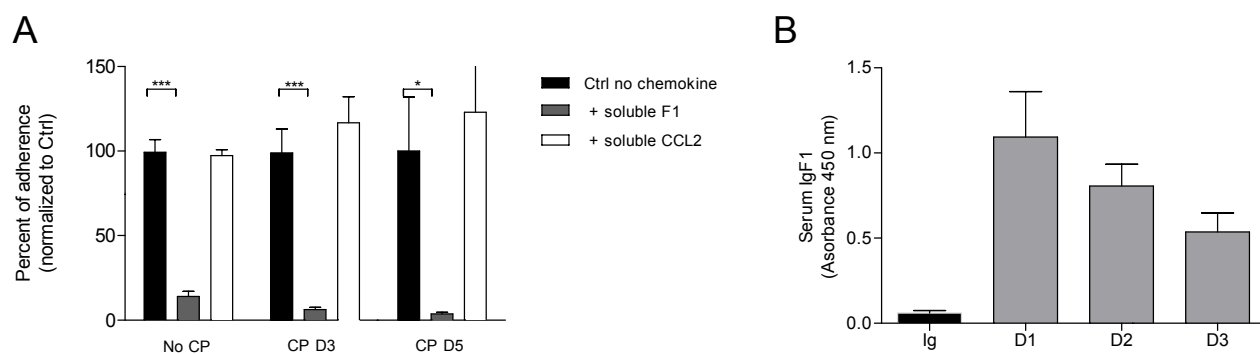


Figure S4. F1-dependent inhibition of *in vitro* cell adhesion and quantification of serum IgF1 after hydrodynamic-based *in vivo* transfection.

(A) Inhibition of CX3CR1-specific *in vitro* adhesion. Experiment was performed as described in **Figure 3D**, before loading, cells were pre-incubated with either 500nM purified CX3CR1 antagonist (F1) or CCL2. Bars represent mean \pm SEM of the percentage of adherent GFP⁺ bone marrow cells normalized to the mean percentage of adherent cells in absence of soluble chemokines (Ctrl) (from **Figure 3D**). Data are collected from triplicate out of 2 independent experiments, one-way ANOVA with bonferroni comparison post-test was performed). **(B)** Graph represents relative serum quantification by ELISA of IgF1 expression at the indicated time point after hydrodynamic-based *in vivo* transfection of Balb/c mice, 3 days after CP treatment. Each bar represents mean \pm SEM (n=3, experiment has been repeated three times).

Discussion

Le microenvironnement tumoral est caractérisé par la présence de nombreuses populations cellulaires d'origine médullaire jouant un rôle important dans le développement de la tumeur. Comme nous l'avons vu, les CKs et leurs récepteurs sont impliqués dans la rétention, la mobilisation et le recrutement de ces cellules dans les différents organes notamment au sein de la tumeur. Le CP favorise la mobilisation cellulaire en perturbant le réseau des molécules d'adhésion (Levesque et al., 2002; Levesque et al., 2001) ainsi que l'équilibre des axes CKs/RCKs (Levesque et al., 2003). Notre travail a contribué à la meilleure compréhension des mécanismes qui régissent la mobilisation des monocytes au cours d'un traitement chimiothérapeutique, en particulier l'implication des RCKs CCR2 et CX3CR1 qui contrôlent l'équilibre entre la sortie et la rétention médullaire des différentes sous populations monocytaires. La nouveauté de cette étude réside en la démonstration de la fonction de l'axe CX3CR1/CX3CL1 dans la rétention médullaire des monocytes Ly6-C^{high}. Nous allons, dans cette dernière partie, confronter nos résultats aux données de la littérature, et discuter des limites de notre travail. Nous verrons également que nos travaux ouvrent différentes perspectives de recherches mais que des questions restent en suspens.

Nous commencerons par discuter du rôle des RCKs (CX3CR1 et CCR2 et de leurs ligands) et du CP dans la mobilisation et la rétention des progéniteurs hématopoïétiques et des monocytes. Nous discuterons ensuite de la différence de cinétique de différenciation et de renouvellement observée entre les monocytes Ly6-C^{high} et Ly6-C^{low} ainsi que du rôle de CCR2 et CX3CR1 dans la mobilisation, le recrutement et l'accumulation de ces 2 sous populations selon les tissus. Nous critiquerons également les résultats qui nous ont permis de montrer le rôle de CX3CR1 dans l'adhérence des monocytes in vivo. Enfin, nous discuterons du rôle du CP et des cellules dérivées des monocytes associées à la tumeur dans la réponse immune anti tumorale.

1) CX3CR1/CX3CL1 et rétention des précurseurs Hématopoïétiques.

Notre travail s'est focalisé sur le rôle de CCR2 et CX3CR1 dans la mobilisation des populations monocytaires. Il est bien connu que certains composés utilisés en chimiothérapie comme le CP favorisent la mobilisation des précurseurs hématopoïétiques. Celle-ci fait l'objet de nombreuses recherches dans divers domaines dont la transplantation.

Nos travaux suggèrent que le CX3CR1 pourrait constituer une cible d'intérêt dans ce contexte. La mobilisation des HSCs et des cellules myéloïdes est connue comme étant reliée au CKS et leurs récepteurs. Les chimiokines contrôlent finement les processus de rétention et de libération des cellules de la moelle vers la circulation. Le CP provoque la mobilisation des HSCs et des cellules myéloïdes via la perturbation de l'équilibre de l'axe CXCR4/CXCL12 (Levesque et al., 2003) et l'augmentation de l'expression de CCL2 (Moschella et al., 2010). Ainsi, l'axe CXCR4/CXCL12 contrôle la rétention des HSCs et des granulocytes (Chow et al., 2011; Levesque et al., 2003), CXCR4 orchestre en concert avec CXCR2 la libération médullaire des granulocytes neutrophiles (Eash et al., 2010). CCR2, contrôle quant à lui, la libération des HSCs et des monocytes Ly6-C^{high} (Karlmark et al., 2009; Serbina and Pamer, 2006; Si et al., 2010). Levesque et al ont montré que la libération des HSCs est aussi induite par la perturbation du réseau des molécules d'adhésion. En effet, l'administration de CP crée un environnement protéolytique dépendant des neutrophiles qui aboutit au clivage de VCAM-1 molécule et favorise la libération des HSCs (Levesque et al., 2002; Levesque et al., 2001). Le traitement au CP induit une perturbation de la fonction de l'axe CX3CL1/CX3CR1 par le biais de l'élimination des cellules stromales et endothéliales qui expriment CX3CL1 ainsi qu'une diminution de l'expression de CX3CR1 par les monocytes. Les macrophages expriment également CX3CR1, de plus, ils participent à la rétention des HSCs par le biais de l'axe CXCL12/CXCR4. En effet, les macrophages produisent localement du CXCL12 et participent à la rétention médullaire des HSCs (Chow et al., 2011). La perturbation de l'axe CX3CR1/CX3CL1 sur ces cellules pourrait avoir deux implications susceptibles de favoriser la mobilisation des HSCs. La première directe par diminution de l'adhésion tissulaire des macrophages diminuant ainsi leur capacité de rétention locale des HSCs et la deuxième par diminution des signaux de survie. En effet, le CX3CL1 est impliqué dans la survie des macrophages (Kim et al., 2011; Landsman et al., 2009). Ainsi, la diminution de transduction du signal CX3CL1/CX3CR1 pourrait induire la mort cellulaire des macrophages et donc promouvoir indirectement la libération des HSCs.

Perspectives

En clinique, la mobilisation des HSCs est aujourd'hui préférée à la ponction médullaire dans le domaine de la transplantation. Celle-ci est, d'une part, moins traumatisante pour le donneur et, d'autre part, facilite la prise de la greffe ainsi qu'une diminution de la morbidité

comparée à la transplantation médullaire (Levesque et al., 2003). Certains protocoles de mobilisation des HSCs consistent en l'injection de l'antagoniste de CXCR4 (AMD 3100) seul (Devine et al., 2008) ou combiné à du G-CSf combiné (Liles et al., 2005). Une des limites majeures des protocoles de mobilisation est qu'il est souvent difficile d'obtenir suffisamment de progéniteurs hématopoïétiques et que le taux varie selon les donneurs. Ainsi, la potentialisation de la mobilisation constitue un challenge technique à visée thérapeutique. Il serait intéressant d'évaluer le niveau de mobilisation des HSCs dans les souris CX3CR1^{-/-} selon un protocole de mobilisation au G-CSf et/ou à l'AMD 3100, afin d'évaluer l'intérêt de l'utilisation potentielle d'un inhibiteur de l'axe CX3CL1/CX3CR1 dans les protocoles cliniques de mobilisation des HSCs.

Comme nous l'avons vu, le traitement au CP perturbe la fonction de l'axe CX3CL1/CX3CR1 en diminuant l'expression de CX3CR1 par les monocytes. Nous n'avons pas évalué au cours de notre étude l'impact du traitement par le CP sur l'expression de CX3CR1 et la mobilisation sanguine des précurseurs myéloïdes communs aux monocytes (MDPs). Afin de savoir si CX3CR1 est impliqué dans la rétention médullaire de ces cellules, Il serait intéressant de vérifier si leur mobilisation est augmentée au sein de souris CX3CR1^{-/-} suite à l'administration de CP.

2) Cinétique de différenciation et renouvellement des sous-populations monocytaires

Comme nous l'avons vu, de nombreuses fonctions physiopathologiques ont été décrites pour les monocytes Ly6-C^{high}. Néanmoins les fonctions des monocytes Ly6-C^{low/-} sont moins connues. Ils ont activité phagocytaire, sont capables d'acquérir un phénotype semblable aux cellules dendritiques et d'acquérir les fonctions de cellule présentatrice d'antigène. Ces monocytes sont également nommés « patrolling » {patrouilleurs} de par leur capacité à parcourir l'endothélium vasculaire contre le flux sanguin par une mobilité (le crawling) qui est dépendante de LFA-1 et CX3CR1 (Auffray et al., 2007). Afin de déterminer avec plus de précision la cinétique de reconstitution des monocytes non classiques (CD11b⁺, Ly6-G⁻, Ly6-C^{low}, CX3CR1^{high}) et de la comparer à la cinétique de reconstitution des monocytes classiques (CD11b⁺, Ly6-G⁻, Ly6-C^{high}, CX3CR1^{low}) nous avons étudié ces deux populations au sein de souris C57BL/6 CX3CR1^{kin/GFP} (Figure 37). Ces souris sont caractérisées par le remplacement au sein de leur génome de l'un des deux allèles codant pour CX3CR1 par un gène codant

pour une protéine fluorescente, la GFP (Jung et al., 2000). L'avantage de ce modèle est qu'il permet de révéler les cellules qui expriment CX3CR1 notamment par cytométrie de flux. Ainsi nous avons pu phénotyper avec précision les deux populations monocytaires. Bien que la cinétique de reconstitution soit légèrement plus rapide au sein des souris de fond génétique C57BL/6 elle suit la même tendance que dans les souris BALB/C. Nous avons observé un renouvellement médullaire rapide des monocytes Ly6-C^{high} qui retrouve le niveau basal trois jours après traitement par le CP. Il s'en suit une accumulation médullaire massive jusqu'au septième jour post traitement pour finalement retrouver la valeur basale 12 jours après traitement. Le compartiment des monocytes Ly6-C^{low} médullaire suit une cinétique de reconstitution plus lente. En effet celle-ci est détectable à partir de J5 mais ne retrouve son niveau basal que tardivement, soit 12 jours après traitement. A la différence des monocytes Ly6-C^{high}, nous n'avons pas observé d'accumulation des monocytes Ly6-C^{low} supérieure au seuil médullaire pré traitement.

Au niveau du compartiment vasculaire, les monocytes Ly6-C^{high} retrouvent leur valeur basale trois jours après traitement et sont fortement mobilisés entre 5 et 7 jours après traitement au CP, plus précocement que les monocytes Ly6-C^{low}. En effet, les monocytes Ly6-C^{low} sanguins retrouvent leur valeur initiale entre cinq et sept jours post traitement avec un pic de mobilisation à j7. Au niveau de la rate, la reconstitution suit la même tendance que celle observée dans le sang pour les deux sous populations monocytaires.

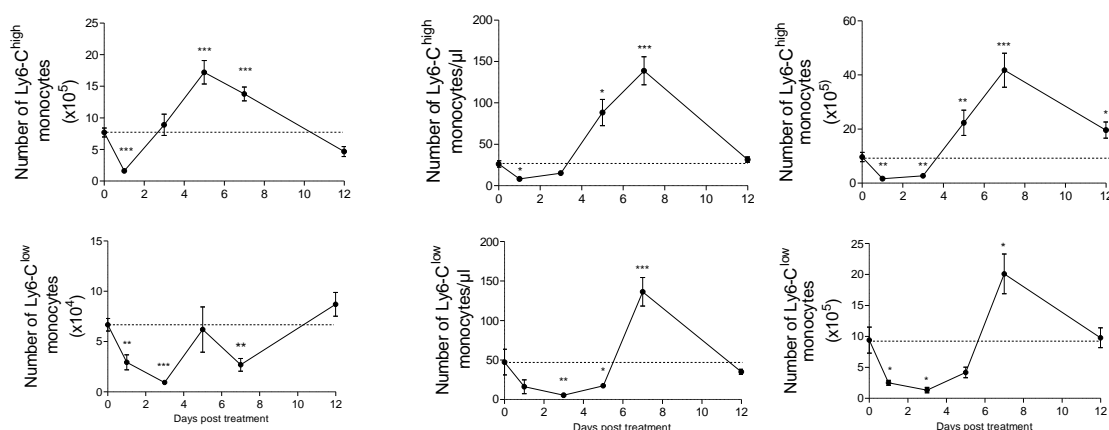


Figure 37 : Différence de cinétique de mobilisation et de recrutement entre les deux sous populations de monocytes.

Les souris sont traitées par injection de CP (i.p 175 mg/kg), elles sont ensuite sacrifiées et le nombre de monocytes Ly6-C^{high} (haut) et Ly6-C^{low} (bas) est évalué dans la moelle osseuse, le sang et la rate par cytométrie de flux aux différents temps indiqués.

La différenciation médullaire des monocytes Ly6-C^{low} semble donc plus longue que celle observée pour les monocytes Ly6-C^{high} et conduit à une cinétique de mobilisation différente entre les deux sous-populations. Comme nous l'avons vu, des travaux préalables suggèrent que les monocytes Ly6-C^{high} pourraient être les précurseurs immatures des monocytes Ly6-C^{low} (Sunderkotter et al., 2004). La forte accumulation des monocytes Ly6-C^{high} durant la phase précoce de reconstitution médullaire déclenchée par le CP pourrait fournir un stock de cellules « vouées » à se différencier et à renouveler les monocytes Ly6-C^{low}. Ceci pourrait ainsi expliquer la différence de taux et de temps de reconstitution médullaire entre les deux populations monocytaires. En effet, les monocytes Ly6-C^{low} suivent une reconstitution médullaire lente et ne retrouvent leur valeur initiale que 12 jours après traitement alors que les compartiments vasculaire et splénique sont reconstitués pleinement et dépassent même leur valeur initiale dès J7 suggérant un approvisionnement médullaire constant de monocytes Ly6-C^{low} vers la périphérie.

Perspectives

Dans le but de vérifier si les monocytes Ly6-C^{low} proviennent de la différenciation des monocytes Ly6-C^{high} ou s'ils ont une origine différente, nous pourrions évaluer le taux de prolifération des monocytes Ly6-C^{low} durant leur cinétique de renouvellement.

3) Rôle de CCR2 et CX3CR1 dans la mobilisation, le recrutement et l'accumulation des monocytes tissulaires

Comme nous l'avons vu, nos résultats montrent que le processus de mobilisation est différent entre les deux populations monocytaires. D'autres facteurs peuvent expliquer les différences observées dans la cinétique de mobilisation et de recrutement des monocytes. En effet, à la différence des monocytes Ly6-C^{high}, les monocytes Ly6-C^{low} n'expriment pas le CCR2. L'administration de cyclophosphamide déclenche la production de CCL2 au niveau médullaire (Salem et al., 2010) et CCR2 est essentiel à la libération des monocytes Ly6-C^{high} médullaires vers le sang ainsi qu'à leur recrutement vers un site inflammatoire (Tsou et al., 2007). L'expression de CCR2 par les monocytes favorise donc le recrutement des monocytes Ly6-C^{high} par rapport aux monocytes Ly6-C^{low} suite à l'administration de CP.

CX3CR1, quant à lui, joue un rôle dans le recrutement des monocytes en périphérie. En effet, Il a été démontré par le groupe du Dr Geissmann et al que CX3CR1 est impliqué dans le recrutement des monocytes au sein de la rate après irradiation dans un modèle de transfert adoptif compétitif de monocytes (CX3CR1^{+/+} et CX3CR1^{-/-}) au cours d'une infection bactérienne (*Listeria Monocytogenes*) (Auffray et al., 2009a). Les résultats de cette étude suggèrent que CX3CR1 permet le recrutement des monocytes au niveau de la rate. Néanmoins bien que l'absence d'expression de CX3CR1^{-/-} affecte le recrutement des monocytes CX3CR1^{-/-} au sein de la rate, elle n'est pas suffisante pour le supprimer totalement. Ces résultats suggèrent donc que d'autres acteurs sont impliqués dans ce processus. Dans notre étude, la proportion et le nombre de monocytes Ly6-C^{high} recrutés dans la rate est supérieure dans la souris CX3CR1 KO comparée aux souris sauvages. Bien qu'en apparence contradiction avec les travaux de l'équipe de Geissmann, cette différence peut s'expliquer par la différence du modèle d'étude. Dans le cadre de nos expériences, nous avons utilisé le CP, ce qui élimine les monocytes médullaires, sanguins et spléniques. Il s'en suit une prolifération médullaire importante suivie d'une libération massive des monocytes vers les tissus périphériques. La forte mobilisation sanguine des monocytes Ly6-C^{high} CX3CR1^{-/-} et l'absence de compétition entre les monocytes CX3CR1^{-/-} et CX3CR1^{+/+} peuvent expliquer un recrutement monocyttaire plus important vers la rate au sein des souris CX3CR1^{-/-} comparé aux souris CX3CR1^{+/+}. De plus, nos expériences de transfert adoptif durant la phase de mobilisation des monocytes ont confirmé que les taux de recrutement dans la moelle et dans la rate des cellules transférées CX3CR1⁺ ou CX3CR1⁻ sont identiques. Ces résultats montrent, d'une part, que l'augmentation du recrutement dans la rate n'est liée qu'à l'augmentation de mobilisation dans le sang et, d'autre part, que les conditions inflammatoires au niveau de la rate après traitement au CP ne sont pas comparables à une irradiation ou à une infection par *Listeria Monocytogenes*.

Nous suggérons que, durant la phase tardive de la reconstitution (J7 après traitement au CP) une partie des monocytes Ly6-C^{high} qui s'accumulent dans la rate provient de la prolifération locale de ces cellules. En effet, à la différence du modèle de transfert adoptif utilisé par le groupe de Geissmann, nous avons observé une prolifération significative des monocytes Ly6-C^{high} spléniques faisant suite à l'administration de CP. De plus, nous avons constaté une prolifération accrue des monocytes Ly6-C^{high} spléniques au sein des souris CX3CR1^{-/-} comparé

aux souris sauvages sept jours après administration de CP. Si ce taux de prolifération est inférieur au taux médullaire, il représente néanmoins une source importante de monocytes Ly6-C^{high}. Ainsi, en accord avec les études du groupe de Nahrendorf (Cortez-Retamozo et al., 2012; Leuschner et al., 2012; Swirski et al., 2009), nous avons observé qu'après reconstitution monocyttaire la rate représente une source conséquente de monocytes Ly6-C^{high}.

En revanche, à la différence des monocytes Ly6-C^{high}, nous n'avons pas observé de différence d'accumulation des monocytes Ly6-C^{low} dans la rate des souris CX3CR1^{-/-} par rapport au souris CX3CR1^{+/+}. Il est connu que les monocytes Ly6-C^{low} ont un défaut de survie conduisant à une diminution de leur représentation dans le sang au sein des souris CX3CR1 et CX3CL1 KO (Kim et al., 2011; Landsman et al., 2009). Il a récemment été montré que la survie des monocytes Ly6-C^{low} au sein des souris CX3CL1^{-/-} peut être corrigée par induction d'expression de CX3CL1. Le groupe du Dr Stephen Jung a développé une souris mutée sur le gène de CX3CL1, codant uniquement pour la forme soluble de CX3CL1 (CX3CL1^{105Δ}) ou pour la forme membranaire (CX3CL1^{395Δ}) (Kim et al., 2011). Ils ont, à l'aide de ces souris, analysé in vivo la structure, l'expression ainsi que les fonctions des formes solubles et membranaires du CX3CL1. Les auteurs ont croisé des souris CX3CL1^{-/-} avec les souris CX3CL1^{105Δ} et CX3CL1^{395Δ} afin de déterminer la capacité de chacune des formes de CX3CL1 à corriger les défauts de fonction et de survie des monocytes et macrophages. Ils ont identifié des fonctions distinctes pour les deux formes de CX3CL1. Ainsi le mutant CX3CL1^{105Δ} codant une forme soluble obligatoire de CX3CL1 rétablit la formation de dendrites trans-épithéliales sur les macrophages intestinaux CX3CR1+. D'autre part, seul le mutant CX3CL1^{395Δ} codant pour une forme exclusivement membranaire de CX3CL1 peut rétablir la survie des monocytes Ly6-C^{low} CX3CR1^{high} sanguins. Nous suggérons que la différence de mobilisation sanguine et de recrutement splénique entre les deux populations monocytaires suite à l'administration de CP au sein de souris CX3CR1 KO s'explique par le défaut de survie des monocytes Ly6-C^{low}. Ce défaut de survie pourrait ainsi conduire à une diminution du recrutement et de l'accumulation sanguine et splénique de cette population.

Perspectives

L'utilisation des souris transgéniques développées par le Dr Jung pourrait nous permettre d'évaluer la contribution relative de la forme soluble et de la forme membranaire de CX3CL1 dans la mobilisation des monocytes Ly6-C^{high}. Bien que nous n'ayons pas déterminé l'isoforme de CX3CL1 plus particulièrement mis en jeu dans notre étude, nous avons identifié des éléments indicateurs. En effet, nous avons constaté une diminution de l'expression de la forme membranaire de CX3CL1 par cytométrie en flux sur les cellules endothéliales et stromales de la moelle osseuse. Nous avons déterminé la concentration de CX3CL1 soluble dans le sérum des souris par dosage ELISA. Nous n'avons pas constaté de variation de la concentration de CX3CL1 soluble tout au long de la cinétique de reconstitution suggérant que la forme soluble responsable de la fonction de chimiotactisme de l'axe CX3CL1/CX3CR1 n'est pas mise en jeu dans le processus de mobilisation accrue des monocytes Ly6-C^{high}. Ces résultats ne sont pas surprenant au regard de la mobilisation accrue des monocytes Ly6-C^{high} au sein des souris CX3CR1^{-/-} qui, par définition, sont insensibles à CX3CL1. Ainsi, nos résultats suggèrent que la forme membranaire du CX3CL1 responsable de la fonction d'adhésion joue un rôle dans le processus de rétention médullaire des monocytes Ly6-C^{high} qui, en l'absence de CX3CR1, conduit à une libération augmentée de ces cellules à la suite d'un traitement au CP.

CX3CR1 favorise l'accumulation des monocytes Ly6-C^{low} au sein des tissus (poumons, sang, rate et cerveau) (Geissmann et al., 2003). Si l'expression médullaire de CX3CL1 favorise la rétention des cellules qui expriment CX3CR1, le plus faible niveau d'expression de CX3CR1 sur les monocytes Ly6-C^{high} pourrait expliquer la libération préférentielle par rapport aux monocytes Ly6-C^{low/-}. De même, la forte expression de CX3CR1 par les macrophages et les ostéoclastes pourrait être responsable de leur rétention tissulaire. Il serait intéressant de moduler l'expression de CX3CR1 sur ces populations afin de vérifier cette hypothèse.

4) Analyse des monocytes in vivo

Au regard du rôle de CX3CR1 dans la rétention et la mobilisation des monocytes Ly6-C^{high}, nous avons étudié la dynamique de ces cellules in vivo. L'imagerie in vivo par microscopie biphotonique nous a procuré une vision nouvelle du comportement des monocytes Ly6-C^{high}. Des études antérieures de l'environnement médullaire de l'os calvarien ont été réalisées par

l'intermédiaire de souris CX3CR1-eGFP afin d'étudier la migration des précurseurs ostéoclastiques au cours du processus de remodelage osseux (Ishii et al., 2009; Ishii et al., 2010). Nous nous sommes inspirés de cette technique afin d'étudier la mobilisation des cellules monocytaires à la suite d'un traitement au CP. Nous avons cependant préféré l'utilisation d'une autre lignée murine transgénique fluorescente, la souris Csf1R-CFP+ (Hume, 2011). La construction transgénique mise au point pour la création de ce modèle murin induit une fluorescence Cyan amplifiée ainsi qu'une diminution du signal émise par les granulocytes. Cependant, la souris transgénique Csf1R-CFP⁺, bien que représentative en microscopie des lignées monocytaires, présente une limite de spécificité concernant les monocytes Ly6-C^{high}. En effet, nous avons déterminé phénotypiquement que, dans l'os calvarien de ces souris, 65% des cellules CFP+ correspondent au phénotype des monocytes Ly6-C^{high} pour une souris non traitée et 60% pour une souris 5 jours après traitement au CP (conditions dans lesquelles ont été faites les expériences en présence de l'antagoniste). En ce qui concerne la souris CX3CR1^{KIN/GFP} 57% des cellules GFP⁺ correspondent au phénotype des monocytes Ly6-C^{high} pour une souris non traitée et 50% pour une souris 5 jours après traitement au CP. L'intensité de fluorescence de la GFP exprimée par les monocytes est plus faible et hétérogène dans les souris CX3CR1^{KIN/GFP} que l'intensité de la CFP au sein de la souris Csf1R-CFP+ facilitant la détection de ces cellules (CFP+) en microscopie biphotonique. L'exploration in vivo des différents compartiments médullaires par l'intermédiaire de souris Csf1R-CFP a donc été préféré à l'utilisation de souris CX3CR1^{KIN/GFP} et nous a permis d'étudier et de décrire la cinétique de reconstitution et le comportement des cellules monocytaires suite à l'administration de CP.

Dans notre étude, les zones vasculaires sont déterminées par l'injection de dextran couplé à la rhodamine et le parenchyme est localisé par contraste par rapport au marquage vasculaire ainsi que par le signal de seconde harmonique révélatrice du collagène du tissu conjonctif osseux. Le parenchyme est ainsi caractérisé comme une zone sombre entourée de collagène contenant des cellules monocytaires CFP+ peu mobiles. En revanche, les cellules ont une mobilité plus élevée dans les sinusoides. Différents types de comportements cellulaires peuvent être observés dans la vascularisation. Nous avons caractérisé quatre types de comportement en fonction des paramètres d'étude de mobilité : vitesse et ratio de confinement en accord avec les observations de la mobilité des monocytes sur

l'endothélium vasculaire par le groupe de Geissmann (Auffray et al., 2007). Nous avons obtenu (par croisement des souches $Csf1R$ -CFP+ et $CX3CR1^{-/-}$) une lignée de souris $Csf1R$ -CFP+ déficiente pour le CX3CR1 qui nous a permis d'étudier in vivo le rôle de CX3CR1 dans le comportement des cellules monocytaires au sein de la moelle osseuse. Nous avons ainsi montré que l'absence d'expression de CX3CR1 augmente la mobilité dans le parenchyme et le réseau des sinusoides médullaires, suggérant une diminution de l'adhérence des monocytes aux cellules qui expriment le ligand et confirmant le rôle de CX3CR1 dans le trafic monocytaire dans la moelle.

Nos résultats, en accord avec les résultats du Dr Geissmann (Auffray et al., 2007), montrent que CX3CR1 jouent un rôle important dans le crawling des monocytes. Nous avons cependant obtenu des différences dans nos analyses du comportement in vivo des monocytes par rapport au groupe de Geissmann. En effet, les vitesses moyennes observées des monocytes dans les capillaires sinusoides sont plus faibles que celles observées dans les veines et artères mésentériques par Geissmann et al (Auffray et al., 2007). Ces différences peuvent s'expliquer par la différence des réseaux vasculaires dans lesquels les monocytes ont été observés. En effet, le flux sanguin dans les veines et artères mésentériques est plus important que celui dans le réseau des sinus médullaires.

De plus, notre analyse comporte un biais par rapport aux analyses du groupe de Geissmann, conduisant à une sous estimation de la vitesse globale des cellules suivies et à l'identification de certaines populations cellulaires du flux vasculaire. Pour réaliser nos expériences in vivo, nous avons défini des conditions expérimentales qui ne permettent pas d'identifier précisément et de suivre les cellules les plus rapides. En effet, nous avons défini un temps de 30 secondes entre deux images. Dans ces conditions expérimentales certaines cellules rapides sont peu ou pas visibles et donc difficilement traçables. Nous pourrions corriger ce biais en travaillant avec une plus grande résolution temporelle (de l'ordre de 2- à 3 secondes comme réalisé par le groupe du Dr Geissmann). Cependant, nos interprétations portent sur les populations situées dans parenchyme et à proximité des parois vasculaires pour lesquelles une haute résolution temporelle serait inutile.

Perspectives

Pour approfondir notre étude, il serait utile de réaliser une étude *in vivo* des interactions entre les monocytes et les cellules CX3CL1⁺. En effet, nous avons montré que l'expression de la forme membranaire de CX3CL1 est diminuée sur les cellules stromales et endothéliales médullaires suite à l'administration de CP. Ce phénomène pourrait provoquer la diminution du nombre et du temps d'interaction entre les cellules exprimant CX3CL1 et les monocytes et confirmer le rôle de l'axe CX3CL1 / CX3CR1 dans la rétention médullaire des monocytes par adhérence cellulaire.

5) Inhibition de CX3CR1 et mobilisation monocytaire

Afin de vérifier si le comportement des cellules monocytaires au sein de souris Csf1R-CFP⁺ et CX3CR1^{-/-} n'est pas inhérent à la souris KO, nous avons évalué l'efficacité d'un antagoniste de CX3CR1 à reproduire le comportement des monocytes déficients pour CX3CR1 *in vivo*. L'inhibiteur de CX3CR1 (Ig-F1) est produit par expression d'un plasmide codant pour le variant de chimiokine couplé à un fragment Fc d'immunoglobuline muté dans les régions FCy2a qui lie C1q et le site de liaison au FcyR1. Ces mutations dans le domaine Ig ont pour but de produire une forme d'Ig-F1 non cytolytique plus stable *in vivo* que la protéine F1 seule. *In vitro*, il a été montré que l'IgF1 inhibe l'internalisation du CX3CR1, inhibe l'adhésion, inhibe la libération de Ca²⁺, ainsi que le chimiotactisme induit par CX3CL1 (Dorgham et al., 2009). L'induction *in vivo* de l'expression d'IgF1 au sein de souris CX3CR1^{+/+} a permis de reconstituer le comportement des cellules monocytaires médullaires observé dans la souris CX3CR1^{-/-} démontrant ainsi son efficacité d'action sur le récepteur *in vivo*.

Cependant, nous n'avons pas pu reproduire le phénotype des souris CX3CR1^{-/-} au cours de la cinétique de mobilisation induite par le CP au sein de souris CX3CR1^{+/+}, ni par l'induction d'expression d'IgF1 ni par l'administration de F1 purifié. Ceci peut s'expliquer par le fait que nous ne contrôlons pas le taux d'expression de l'inhibiteur du CX3CR1 ainsi que son efficacité *in vivo*. Ainsi, son expression ou son efficacité pourrait être insuffisante pour déclencher une mobilisation significative de monocytes Ly6-C^{high} dans le sang. De plus, la durée de vie de la molécule IgF1 n'est peut-être pas assez longue pour obtenir un blocage durable du récepteur. Bien que l'inhibiteur ait démontré sa potentialité d'antagoniste sur les cellules monocytaires, il est possible que l'IgF1 ne bloque pas toutes les fonctions dépendantes de

CX3CR1 in vivo. De plus, son affinité est inférieure à celle du ligand naturel. Ainsi sa compétition avec celui-ci pourrait agir en sa défaveur et diminuer son efficacité d'action.

Perspectives

Il serait intéressant de travailler à la mise au point d'un antagoniste susceptible de reproduire le phénotype de mobilisation monocyttaire observé au sein des souris CX3CR1^{-/-}. Le développement d'antagonistes pharmacologiques des RCKs fait l'objet de nombreuses recherches et doit être encore optimisé. En effet, le plus souvent les antagonistes n'inhibent pas totalement la signalisation d'un RCK et par conséquent inhibe peut être partiellement les fonctions d'un RCK. Les études in silico permettent de modéliser les dynamiques d'interactions ligand-récepteur. La meilleure compréhension de ces interactions devrait permettre le développement de molécules chimiques inhibitrices ou activatrices plus spécifiques de fonctions données et améliorer ainsi le potentiel d'action des molécules ciblant les RCKs.

6) Chimiothérapie et cellules dérivées des monocytes associées à la tumeur

Les monocytes recrutés au sein d'une tumeur se différencient en TAMs comprenant des macrophages et DCs. Comme nous l'avons vu, ces deux populations au sein de la tumeur sont difficiles à distinguer. Les cellules d'origines myéloïdes (CD11b⁺, Ly6-G⁻) qui infiltrent la tumeur expriment également le CD11c et le F4/80 suggérant un chevauchement phénotypique entre ces 2 populations. Une étude récente effectuée par Engelhardt et al a distingué au sein de souris transgénique développant spontanément un cancer du sein (PYMT-ChOVA) croisées avec des souris transgénique CD11c-YFP 2 sous populations de cellules myéloïdes (CD11b⁺ Ly6-G⁻) (Engelhardt et al., 2012). Les auteurs ont défini ainsi une population myéloïde YFP⁺ nommé TuDCs et une population YFP⁻ nommée TAMs. Le phénotypage étendu de ces populations a montré que les TuDCs ont un phénotype CD11c^{high}, F4/80^{high}, Ly6-C^{low}, IAb⁺ et que les TAMs sont caractérisés par une expression plus faible du CD11c, des molécules de classe II (IAb) et sont constitués de macrophages Ly6-C^{low} et Ly6-C^{high} (de Bruijn et al., 1994; Sunderkotter et al., 2004). Nous avons montré que le compartiment des TAMs augmente à la suite de l'administration de CP tandis que le nombre de TuDCs ne semble pas affecté dans un modèle de fibrosarcome MCA-OVA. Néanmoins, nous avons observé une légère différence dans l'expression de Ly6-C et de F4/80 par les

TuDCs chez les souris traitées par le CP par rapport aux souris contrôles non traitées suggérant un renouvellement rapide des TuDCs dépendant des monocytes Ly6-C^{high}.

Nous avons également montré que le recrutement des monocytes Ly6-C^{high} au sein d'une tumeur et l'effet anti tumoral du CP sont dépendants de CCR2. Ces résultats suggèrent que l'efficacité chimiothérapeutique du CP passe par la mobilisation des monocytes Ly6-C^{high} médullaire et suggère donc un rôle anti-tumoral de cette population.

Bien que le recrutement des monocytes Ly6-C^{high} au sein de la tumeur soit associé à l'effet primaire anti tumoral déclenché par le CP, nous avons montré que le rebond monocyttaire aboutit au renouvellement des TAMs et des TuDCs qui piègent les LTs spécifiques des antigènes tumoraux, limitent leur infiltration dans la tumeur et peuvent exercer des fonctions immunosuppressives. Nous suggérons que les TuDCs limitent par cette fonction l'action anti tumorale des LTs spécifiques de la tumeur et reproduisent en partie l'effet transitoire de réactivation du système immunitaire dans la réponse anti-tumorale à la suite de l'administration de CP.

Perspectives

Nous avons montré que CX3CR1 est un récepteur important lors de la mobilisation des monocytes Ly6-C^{high} à la suite d'un traitement chimio thérapeutique par le CP. Comme nous l'avons vu, les cellules myéloïdes et DCs expriment CX3CR1. Il serait intéressant d'évaluer l'effet anti tumoral déclenché par le CP au sein d'un souris CX3CR1^{-/-}. Cette expérience permettrait, d'une part, d'évaluer si le recrutement des monocytes Ly6-C^{high} est augmenté au sein de la tumeur par rapport à une souris CX3CR1^{+/+} et, d'autre part, d'évaluer si l'effet anti-tumoral déclenché par le CP est plus important. Les résultats préliminaires montrent que l'effet du CP est conservé dans les souris CX3CR1^{-/-}.

En conclusion, nous pensons que la modulation du taux de mobilisation cellulaire au cours de la reconstitution induite par CP et/ou le ciblage de CX3CR1 pourrait contribuer à l'amélioration des réponses cellulaires à la suite de lésion tissulaire ou du dysfonctionnement des défenses immunitaires par augmentation du pool de cellules myéloïdes leucocytaires d'un hôte ou encore trouver des applications dans le domaine de la greffe de HSCs.

Conclusions

Les approches d'immuno-thérapie anti tumorales sont souvent associées à l'utilisation de chimiothérapie. En effet, l'immunothérapie a pris de l'essor à la suite de la découverte de la capacité immunostimulante de certains composés chimiothérapeutiques (Zitvogel et al., 2008). Le paradoxe lié à la capacité de ces composés à combiner des fonctions immuno-suppressives et immunostimulantes selon le contexte pathologique et les doses utilisées a suscité un fort intérêt et de l'espoir dans la cancérologie. Si l'immunothérapie est une approche thérapeutique potentiellement efficace et a démontré qu'elle pouvait augmenter la survie des patients atteints de cancer dans certains contextes, celle-ci ne permet pas encore de contrôler pleinement la maladie et doit donc encore évoluer. L'optimisation de l'immunothérapie sera sûrement dépendante de la compréhension des mécanismes de recrutement cellulaire au sein du microenvironnement tumoral et de la stimulation efficace et persistante des cellules du système immunitaire lors de la réponse anti tumorale. Les CKs sont impliqués dans ces deux fonctions. Elles constituent ainsi un élément d'approche thérapeutique pouvant contribuer à l'amélioration des traitements anti-tumoraux. Le ciblage des RCKs est cependant limité par la redondance d'expression d'un même récepteur sur différentes populations cellulaires. Les applications thérapeutiques par l'intermédiaire de molécules chimiques spécifiques d'un récepteur pourraient donc être limitées dans des pathologies comme le cancer impliquant de nombreuses cellules aux fonctions différentes. Nous avons montré que la modulation du recrutement des sous populations de monocytes au sein d'une tumeur par le ciblage des RCKS est possible et que ces cellules peuvent influencer la croissance tumorale et/ou la réponse immune anti tumorale. Le rôle des monocytes et de leurs descendants, de par leur forte représentation au sein de la plupart des tumeurs, doit être mieux compris. En effet, ces cellules ont la capacité de destruction et de réparation tissulaire selon leur polarisation. Les tumeurs solides caractérisent un tissu de structure et à développement anormal. S'il est clair que la stimulation du système immunitaire est un challenge d'importance dans le contrôle de la croissance tumorale, Il est fort probable que les mécanismes de réparation tissulaire soient également liés à la résolution de la maladie. Ces fonctions communes aux macrophages souvent mises en opposition par l'appellation M1 et M2 sont des fonctions complémentaires dans l'orchestration de la défense immunitaire et la réparation d'un tissu lésé. Le contrôle de

l'activation et de l'équilibre entre les deux formes polarisées de macrophages M1 et M2 ainsi que le contrôle de leur répartition au sein de la tumeur tout au long d'un protocole immuno-thérapeutique pourrait permettre de rétablir la réponse immune anti-tumorale et potentialiser la réparation des tissus lésés. Le micro environnement tumoral est caractérisé par la présence de nombreux acteurs. En effet, des cellules stromales participent également à la croissance tumorale. La caractérisation phénotypique et fonctionnelle de ces cellules (ex : fibroblastes et cellules mésenchymateuses) apportera des éléments complémentaires à la compréhension des tumeurs et à la potentialisation des traitements anti cancéreux. Il semble donc déterminant de comprendre les causes et les conséquences de la présence des nombreuses populations cellulaires constituant le micro-environnement. De même, il est important de déterminer les fonctions et les interactions de ces cellules avec la tumeur en vue d'élucider des mécanismes d'action spécifiques impliqués dans la croissance tumorale et la réponse anti tumorale qui pourraient permettre d'adapter de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Bibliographie

- Aalinkeel, R., M.P. Nair, G. Sufrin, S.D. Mahajan, K.C. Chadha, R.P. Chawda, and S.A. Schwartz. 2004. Gene expression of angiogenic factors correlates with metastatic potential of prostate cancer cells. *Cancer Res.* 64:5311-21.
- Aiuti, A., I.J. Webb, C. Bleul, T. Springer, and J.C. Gutierrez-Ramos. 1997. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J Exp Med.* 185:111-20.
- Ancuta, P., R. Rao, A. Moses, A. Mehle, S.K. Shaw, F.W. Luscinskas, and D. Gabuzda. 2003. Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. *J Exp Med.* 197:1701-7.
- Andre, F., N. Cabioglu, H. Assi, J.C. Sabourin, S. Delaloge, A. Sahin, K. Broglio, J.P. Spano, C. Combadiere, C. Bucana, J.C. Soria, and M. Cristofanilli. 2006. Expression of chemokine receptors predicts the site of metastatic relapse in patients with axillary node positive primary breast cancer. *Ann Oncol.* 17:945-51.
- Antonarakis, E.S., and M.A. Carducci. 2010. Combining low-dose cyclophosphamide with GM-CSF-secreting prostate cancer immunotherapy enhances antitumor immune effects. *Expert Opin Investig Drugs.* 19:311-4.
- Apetoh, L., F. Ghiringhelli, A. Tesniere, A. Criollo, C. Ortiz, R. Lidereau, C. Mariette, N. Chaput, J.P. Mira, S. Delaloge, F. Andre, T. Tursz, G. Kroemer, and L. Zitvogel. 2007. The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Immunol Rev.* 220:47-59.
- Appay, V., and S.L. Rowland-Jones. 2001. RANTES: a versatile and controversial chemokine. *Trends Immunol.* 22:83-7.
- Arenberg, D.A., M.P. Keane, B. DiGiovine, S.L. Kunkel, S.B. Morris, Y.Y. Xue, M.D. Burdick, M.C. Glass, M.D. Iannettoni, and R.M. Strieter. 1998. Epithelial-neutrophil activating peptide (ENA-78) is an important angiogenic factor in non-small cell lung cancer. *J Clin Invest.* 102:465-72.
- Arenberg, D.A., S.L. Kunkel, P.J. Polverini, S.B. Morris, M.D. Burdick, M.C. Glass, D.T. Taub, M.D. Iannettoni, R.I. Whyte, and R.M. Strieter. 1996. Interferon-gamma-inducible protein 10 (IP-10) is an angiostatic factor that inhibits human non-small cell lung cancer (NSCLC) tumorigenesis and spontaneous metastases. *J Exp Med.* 184:981-92.
- Auffray, C., D. Fogg, M. Garfa, G. Elain, O. Join-Lambert, S. Kayal, S. Sarnacki, A. Cumano, G. Lauvau, and F. Geissmann. 2007. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science.* 317:666-70.
- Auffray, C., D.K. Fogg, E. Narni-Mancinelli, B. Senechal, C. Trouillet, N. Saederup, J. Leemput, K. Bigot, L. Campisi, M. Abitbol, T. Molina, I. Charo, D.A. Hume, A. Cumano, G. Lauvau, and F. Geissmann. 2009a. CX3CR1+ CD115+ CD135+ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation. *J Exp Med.* 206:595-606.
- Auffray, C., M.H. Sieweke, and F. Geissmann. 2009b. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 27:669-92.
- Baggiolini, M., and P. Loetscher. 2000. Chemokines in inflammation and immunity. *Immunol Today.* 21:418-20.
- Baggiolini, M., and B. Moser. 1997. Blocking chemokine receptors. *J Exp Med.* 186:1189-91.

- Bais, C., B. Santomaso, O. Coso, L. Arvanitakis, E.G. Raaka, J.S. Gutkind, A.S. Asch, E. Cesarman, M.C. Gershengorn, and E.A. Mesri. 1998. G-protein-coupled receptor of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is a viral oncogene and angiogenesis activator. *Nature*. 391:86-9.
- Balentien, E., B.E. Mufson, R.L. Shattuck, R. Derynck, and A. Richmond. 1991. Effects of MGSA/GRO alpha on melanocyte transformation. *Oncogene*. 6:1115-24.
- Balkwill, F. 2004a. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer*. 4:540-50.
- Balkwill, F. 2004b. The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. *Semin Cancer Biol*. 14:171-9.
- Banchereau, J., and R.M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 392:245-52.
- Barbero, S., R. Bonavia, A. Bajetto, C. Porcile, P. Pirani, J.L. Ravetti, G.L. Zona, R. Spaziante, T. Florio, and G. Schettini. 2003. Stromal cell-derived factor 1alpha stimulates human glioblastoma cell growth through the activation of both extracellular signal-regulated kinases 1/2 and Akt. *Cancer Res*. 63:1969-74.
- Barlic, J., J.M. Sechler, and P.M. Murphy. 2003. IL-15 and IL-2 oppositely regulate expression of the chemokine receptor CX3CR1. *Blood*. 102:3494-503.
- Bazan, J.F., K.B. Bacon, G. Hardiman, W. Wang, K. Soo, D. Rossi, D.R. Greaves, A. Zlotnik, and T.J. Schall. 1997. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature*. 385:640-4.
- Belge, K.U., F. Dayyani, A. Horelt, M. Siedlar, M. Frankenberger, B. Frankenberger, T. Espevik, and L. Ziegler-Heitbrock. 2002. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol*. 168:3536-42.
- Belperio, J.A., M.P. Keane, D.A. Arenberg, C.L. Addison, J.E. Ehlert, M.D. Burdick, and R.M. Strieter. 2000. CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol*. 68:1-8.
- Benoy, I.H., R. Salgado, P. Van Dam, K. Geboers, E. Van Marck, S. Scharpe, P.B. Vermeulen, and L.Y. Dirix. 2004. Increased serum interleukin-8 in patients with early and metastatic breast cancer correlates with early dissemination and survival. *Clin Cancer Res*. 10:7157-62.
- Bergers, G., and L.E. Benjamin. 2003. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*. 3:401-10.
- Berraondo, P., C. Nouze, X. Preville, D. Ladant, and C. Leclerc. 2007. Eradication of large tumors in mice by a tritherapy targeting the innate, adaptive, and regulatory components of the immune system. *Cancer Res*. 67:8847-55.
- Berx, G., and F. van Roy. 2009. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 1:a003129.
- Bian, X.W., S.X. Yang, J.H. Chen, Y.F. Ping, X.D. Zhou, Q.L. Wang, X.F. Jiang, W. Gong, H.L. Xiao, L.L. Du, Z.Q. Chen, W. Zhao, J.Q. Shi, and J.M. Wang. 2007. Preferential expression of chemokine receptor CXCR4 by highly malignant human gliomas and its association with poor patient survival. *Neurosurgery*. 61:570-8; discussion 578-9.
- Bikfalvi, A. 2004. Platelet factor 4: an inhibitor of angiogenesis. *Semin Thromb Hemost*. 30:379-85.
- Biswas, P., G. Tambussi, and A. Lazzarin. 2007. Access denied? The status of co-receptor inhibition to counter HIV entry. *Expert Opin Pharmacother*. 8:923-33.
- Biswas, S.K., and A. Mantovani. 2010. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol*. 11:889-96.

- Blasco, M.A. 2005. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet.* 6:611-22.
- Bluestone, J.A., and A.K. Abbas. 2003. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol.* 3:253-7.
- Boissonnas, A., A. Scholer-Dahirel, V. Simon-Blancal, L. Pace, F. Valet, A. Kissenpfennig, T. Sparwasser, B. Malissen, L. Fetler, and S. Amigorena. 2010. Foxp3+ T cells induce perforin-dependent dendritic cell death in tumor-draining lymph nodes. *Immunity.* 32:266-78.
- Bondue, A., S.C. Jao, C. Blanpain, M. Parmentier, and P.J. LiWang. 2002. Characterization of the role of the N-loop of MIP-1 beta in CCR5 binding. *Biochemistry.* 41:13548-55.
- Bordoni, R., R. Fine, D. Murray, and A. Richmond. 1990. Characterization of the role of melanoma growth stimulatory activity (MGSA) in the growth of normal melanocytes, nevocytes, and malignant melanocytes. *J Cell Biochem.* 44:207-19.
- Boring, L., J. Gosling, M. Cleary, and I.F. Charo. 1998. Decreased lesion formation in CCR2-/- mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature.* 394:894-7.
- Bosco, M.C., G. Reffo, M. Puppo, and L. Varesio. 2004. Hypoxia inhibits the expression of the CCR5 chemokine receptor in macrophages. *Cell Immunol.* 228:1-7.
- Bromberg, J. 2002. Stat proteins and oncogenesis. *J Clin Invest.* 109:1139-42.
- Bromwich, E.J., P.A. McArdle, K. Canna, D.C. McMillan, A.M. McNicol, M. Brown, and M. Aitchison. 2003. The relationship between T-lymphocyte infiltration, stage, tumour grade and survival in patients undergoing curative surgery for renal cell cancer. *Br J Cancer.* 89:1906-8.
- Bronte, V., and P. Zanovello. 2005. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol.* 5:641-54.
- Brys, L., A. Beschin, G. Raes, G.H. Ghassebeh, W. Noel, J. Brandt, F. Brombacher, and P. De Baetselier. 2005. Reactive oxygen species and 12/15-lipoxygenase contribute to the antiproliferative capacity of alternatively activated myeloid cells elicited during helminth infection. *J Immunol.* 174:6095-104.
- Burger, M., J.A. Burger, R.C. Hoch, Z. Oades, H. Takamori, and I.U. Schraufstatter. 1999. Point mutation causing constitutive signaling of CXCR2 leads to transforming activity similar to Kaposi's sarcoma herpesvirus-G protein-coupled receptor. *J Immunol.* 163:2017-22.
- Burnet, F.M. 1970. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res.* 13:1-27.
- Burnet, M. 1957. Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *Br Med J.* 1:779-86.
- Cao, X., S.F. Cai, T.A. Fehniger, J. Song, L.I. Collins, D.R. Piwnica-Worms, and T.J. Ley. 2007. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity.* 27:635-46.
- Cavallaro, U., and G. Christofori. 2004. Multitasking in tumor progression: signaling functions of cell adhesion molecules. *Ann N Y Acad Sci.* 1014:58-66.
- Cecchini, M.G., M.G. Dominguez, S. Mocci, A. Wetterwald, R. Felix, H. Fleisch, O. Chisholm, W. Hofstetter, J.W. Pollard, and E.R. Stanley. 1994. Role of colony stimulating factor-1 in the establishment and regulation of tissue macrophages during postnatal development of the mouse. *Development.* 120:1357-72.
- Chabre, M., P. Deterre, and B. Antonny. 2009. The apparent cooperativity of some GPCRs does not necessarily imply dimerization. *Trends Pharmacol Sci.* 30:182-7.

- Chan, J.R., S.J. Hyduk, and M.I. Cybulsky. 2001. Chemoattractants induce a rapid and transient upregulation of monocyte alpha4 integrin affinity for vascular cell adhesion molecule 1 which mediates arrest: an early step in the process of emigration. *J Exp Med.* 193:1149-58.
- Charo, I.F., and M.B. Taubman. 2004. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ Res.* 95:858-66.
- Chong, H., Y. Vodovotz, G.W. Cox, and M.H. Barcellos-Hoff. 1999. Immunocytochemical localization of latent transforming growth factor-beta1 activation by stimulated macrophages. *J Cell Physiol.* 178:275-83.
- Chow, A., D. Lucas, A. Hidalgo, S. Mendez-Ferrer, D. Hashimoto, C. Scheiermann, M. Battista, M. Leboeuf, C. Prophete, N. van Rooijen, M. Tanaka, M. Merad, and P.S. Frenette. 2011. Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. *J Exp Med.* 208:261-71.
- Cinamon, G., V. Shinder, and R. Alon. 2001. Shear forces promote lymphocyte migration across vascular endothelium bearing apical chemokines. *Nat Immunol.* 2:515-22.
- Clark-Lewis, I., K.S. Kim, K. Rajarathnam, J.H. Gong, B. Dewald, B. Moser, M. Baggiolini, and B.D. Sykes. 1995. Structure-activity relationships of chemokines. *J Leukoc Biol.* 57:703-11.
- Clark, W.H., Jr., D.E. Elder, D.t. Guerry, L.E. Braitman, B.J. Trock, D. Schultz, M. Synnestvedt, and A.C. Halpern. 1989. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst.* 81:1893-904.
- Clore, G.M., E. Appella, M. Yamada, K. Matsushima, and A.M. Gronenborn. 1990. Three-dimensional structure of interleukin 8 in solution. *Biochemistry.* 29:1689-96.
- Clore, G.M., and A.M. Gronenborn. 1995. Three-dimensional structures of alpha and beta chemokines. *FASEB J.* 9:57-62.
- Cocchi, F., A.L. DeVico, A. Garzino-Demo, S.K. Arya, R.C. Gallo, and P. Lusso. 1995. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science.* 270:1811-5.
- Colotta, F., P. Allavena, A. Sica, C. Garlanda, and A. Mantovani. 2009. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis.* 30:1073-81.
- Combadiere, C., S. Potteaux, M. Rodero, T. Simon, A. Pezard, B. Esposito, R. Merval, A. Proudfoot, A. Tedgui, and Z. Mallat. 2008. Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytosis and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation.* 117:1649-57.
- Combadiere, C., K. Salzwedel, E.D. Smith, H.L. Tiffany, E.A. Berger, and P.M. Murphy. 1998. Identification of CX3CR1. A chemotactic receptor for the human CX3C chemokine fractalkine and a fusion coreceptor for HIV-1. *J Biol Chem.* 273:23799-804.
- Condeelis, J., and J.W. Pollard. 2006. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell.* 124:263-6.
- Cortez-Retamozo, V., M. Etzrodt, A. Newton, P.J. Rauch, A. Chudnovskiy, C. Berger, R.J. Ryan, Y. Iwamoto, B. Marinelli, R. Gorbato, R. Forghani, T.I. Novobrantseva, V. Kotliansky, J.L. Figueiredo, J.W. Chen, D.G. Anderson, M. Nahrendorf, F.K. Swirski, R. Weissleder, and M.J. Pittet. 2012. Origins of tumor-associated macrophages and neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109:2491-6.

- Cros, J., N. Cagnard, K. Woollard, N. Patey, S.Y. Zhang, B. Senechal, A. Puel, S.K. Biswas, D. Moshous, C. Picard, J.P. Jais, D. D'Cruz, J.L. Casanova, C. Trouillet, and F. Geissmann. 2010. Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity*. 33:375-86.
- Curiel, T.J., G. Coukos, L. Zou, X. Alvarez, P. Cheng, P. Mottram, M. Evdemon-Hogan, J.R. Conejo-Garcia, L. Zhang, M. Burow, Y. Zhu, S. Wei, I. Kryczek, B. Daniel, A. Gordon, L. Myers, A. Lackner, M.L. Disis, K.L. Knutson, L. Chen, and W. Zou. 2004. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*. 10:942-9.
- Curto, M., B.K. Cole, D. Lallemand, C.H. Liu, and A.I. McClatchey. 2007. Contact-dependent inhibition of EGFR signaling by Nf2/Merlin. *J Cell Biol*. 177:893-903.
- Dai, X.M., G.R. Ryan, A.J. Hapel, M.G. Dominguez, R.G. Russell, S. Kapp, V. Sylvestre, and E.R. Stanley. 2002. Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood*. 99:111-20.
- de Bruijn, M.F., W.A. Slieker, J.C. van der Loo, J.S. Voerman, W. van Ewijk, and P.J. Leenen. 1994. Distinct mouse bone marrow macrophage precursors identified by differential expression of ER-MP12 and ER-MP20 antigens. *Eur J Immunol*. 24:2279-84.
- Dell'Agnola, C., and A. Biragyn. 2007. Clinical utilization of chemokines to combat cancer: the double-edged sword. *Expert Rev Vaccines*. 6:267-83.
- Devine, S.M., R. Vij, M. Rettig, L. Todt, K. McGlauchlen, N. Fisher, H. Devine, D.C. Link, G. Calandra, G. Bridger, P. Westervelt, and J.F. DiPersio. 2008. Rapid mobilization of functional donor hematopoietic cells without G-CSF using AMD3100, an antagonist of the CXCR4/SDF-1 interaction. *Blood*. 112:990-8.
- Dighe, A.S., E. Richards, L.J. Old, and R.D. Schreiber. 1994. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity*. 1:447-56.
- Dorgham, K., A. Ghadiri, P. Hermand, M. Rodero, L. Poupel, M. Iga, O. Hartley, G. Gorochov, C. Combadiere, and P. Deterre. 2009. An engineered CX3CR1 antagonist endowed with anti-inflammatory activity. *J Leukoc Biol*. 86:903-11.
- Dudley, M.E., J.R. Wunderlich, P.F. Robbins, J.C. Yang, P. Hwu, D.J. Schwartzentruber, S.L. Topalian, R. Sherry, N.P. Restifo, A.M. Hubicki, M.R. Robinson, M. Raffeld, P. Duray, C.A. Seipp, L. Rogers-Freezer, K.E. Morton, S.A. Mavroukakis, D.E. White, and S.A. Rosenberg. 2002. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science*. 298:850-4.
- Dunay, I.R., R.A. Damatta, B. Fux, R. Presti, S. Greco, M. Colonna, and L.D. Sibley. 2008. Gr1(+) inflammatory monocytes are required for mucosal resistance to the pathogen *Toxoplasma gondii*. *Immunity*. 29:306-17.
- Dunn, G.P., A.T. Bruce, H. Ikeda, L.J. Old, and R.D. Schreiber. 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 3:991-8.
- Dunn, G.P., A.T. Bruce, K.C. Sheehan, V. Shankaran, R. Uppaluri, J.D. Bui, M.S. Diamond, C.M. Koebel, C. Arthur, J.M. White, and R.D. Schreiber. 2005. A critical function for type I interferons in cancer immunoediting. *Nat Immunol*. 6:722-9.
- Dunn, G.P., C.M. Koebel, and R.D. Schreiber. 2006. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol*. 6:836-48.
- DuPage, M., C. Mazumdar, L.M. Schmidt, A.F. Cheung, and T. Jacks. 2012. Expression of tumour-specific antigens underlies cancer immunoediting. *Nature*. 482:405-9.

- Eash, K.J., A.M. Greenbaum, P.K. Gopalan, and D.C. Link. 2010. CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *J Clin Invest*. 120:2423-31.
- Engelhardt, B., and H. Wolburg. 2004. Mini-review: Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house? *Eur J Immunol*. 34:2955-63.
- Engelhardt, J.J., B. Boldajipour, P. Beemiller, P. Pandurangi, C. Sorensen, Z. Werb, M. Egeblad, and M.F. Krummel. 2012. Marginating dendritic cells of the tumor microenvironment cross-present tumor antigens and stably engage tumor-specific T cells. *Cancer Cell*. 21:402-17.
- Fagete, S., U. Ravn, F. Gueneau, G. Magistrelli, M.H. Kosco-Vilbois, and N. Fischer. 2009. Specificity tuning of antibody fragments to neutralize two human chemokines with a single agent. *MAbs*. 1:288-96.
- Fallarino, F., U. Grohmann, K.W. Hwang, C. Orabona, C. Vacca, R. Bianchi, M.L. Belladonna, M.C. Fioretti, M.L. Alegre, and P. Puccetti. 2003. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol*. 4:1206-12.
- Feng, D., J.A. Nagy, K. Pyne, H.F. Dvorak, and A.M. Dvorak. 1998. Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP. *J Exp Med*. 187:903-15.
- Ferguson, S.S. 2001. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev*. 53:1-24.
- Fernandez, E.J., and E. Lolis. 2002. Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 42:469-99.
- Ferretti, E., M. Bertolotto, S. Deaglio, C. Tripodo, D. Ribatti, V. Audrito, F. Blengio, S. Matis, S. Zupo, D. Rossi, L. Ottonello, G. Gaidano, F. Malavasi, V. Pistoia, and A. Corcione. 2011. A novel role of the CX3CR1/CX3CL1 system in the cross-talk between chronic lymphocytic leukemia cells and tumor microenvironment. *Leukemia*. 25:1268-77.
- Fife, B.T., G.B. Huffnagle, W.A. Kuziel, and W.J. Karpus. 2000. CC chemokine receptor 2 is critical for induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*. 192:899-905.
- Fingerle-Rowson, G., J. Auers, E. Kreuzer, P. Fraunberger, M. Blumenstein, and L.H. Ziegler-Heitbrock. 1998. Expansion of CD14+CD16+ monocytes in critically ill cardiac surgery patients. *Inflammation*. 22:367-79.
- Fong, A.M., S.M. Alam, T. Imai, B. Haribabu, and D.D. Patel. 2002a. CX3CR1 tyrosine sulfation enhances fractalkine-induced cell adhesion. *J Biol Chem*. 277:19418-23.
- Fong, A.M., R.T. Premont, R.M. Richardson, Y.R. Yu, R.J. Lefkowitz, and D.D. Patel. 2002b. Defective lymphocyte chemotaxis in beta-arrestin2- and GRK6-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:7478-83.
- Fong, A.M., L.A. Robinson, D.A. Steeber, T.F. Tedder, O. Yoshie, T. Imai, and D.D. Patel. 1998. Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow. *J Exp Med*. 188:1413-9.
- Gabrilovich, D.I., and S. Nagaraj. 2009. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 9:162-74.
- Galluzzi, L., L. Senovilla, L. Zitvogel, and G. Kroemer. 2012. The secret ally: immunostimulation by anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 11:215-33.
- Garton, K.J., P.J. Gough, C.P. Blobel, G. Murphy, D.R. Greaves, P.J. Dempsey, and E.W. Raines. 2001. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1). *J Biol Chem*. 276:37993-8001.

- Geissmann, F., S. Jung, and D.R. Littman. 2003. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*. 19:71-82.
- Geissmann, F., M.G. Manz, S. Jung, M.H. Sieweke, M. Merad, and K. Ley. 2010. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*. 327:656-61.
- Geissmann, F., C. Prost, J.P. Monnet, M. Dy, N. Brousse, and O. Hermine. 1998. Transforming growth factor beta1, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells. *J Exp Med*. 187:961-6.
- Ghiringhelli, F., C. Menard, P.E. Puig, S. Ladoire, S. Roux, F. Martin, E. Solary, A. Le Cesne, L. Zitvogel, and B. Chauffert. 2007. 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*. 56:641-8.
- Giagulli, C., L. Ottoboni, E. Cavegion, B. Rossi, C. Lowell, G. Constantin, C. Laudanna, and G. Berton. 2006. The Src family kinases Hck and Fgr are dispensable for inside-out, chemoattractant-induced signaling regulating beta 2 integrin affinity and valency in neutrophils, but are required for beta 2 integrin-mediated outside-in signaling involved in sustained adhesion. *J Immunol*. 177:604-11.
- Ginhoux, F., F. Tacke, V. Angeli, M. Bogunovic, M. Loubreau, X.M. Dai, E.R. Stanley, G.J. Randolph, and M. Merad. 2006. Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nat Immunol*. 7:265-73.
- Glinksi, O.V., V.H. Huxley, G.V. Glinksi, K.J. Pienta, A. Raz, and V.V. Glinksi. 2005. Mechanical entrapment is insufficient and intercellular adhesion is essential for metastatic cell arrest in distant organs. *Neoplasia*. 7:522-7.
- Gobert, M., I. Treilleux, N. Bendriss-Vermare, T. Bachelot, S. Goddard-Leon, V. Arfi, C. Biota, A.C. Doffin, I. Durand, D. Olive, S. Perez, N. Pasqual, C. Faure, I. Ray-Coquard, A. Puisieux, C. Caux, J.Y. Blay, and C. Menetrier-Caux. 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*. 69:2000-9.
- Goda, S., T. Imai, O. Yoshie, O. Yoneda, H. Inoue, Y. Nagano, T. Okazaki, H. Imai, E.T. Bloom, N. Domae, and H. Umehara. 2000. CX3C-chemokine, fractalkine-enhanced adhesion of THP-1 cells to endothelial cells through integrin-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol*. 164:4313-20.
- Gondek, D.C., L.F. Lu, S.A. Quezada, S. Sakaguchi, and R.J. Noelle. 2005. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol*. 174:1783-6.
- Gordon, S. 2003. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*. 3:23-35.
- Gordon, S., and P.R. Taylor. 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 5:953-64.
- Grage-Griebenow, E., H.D. Flad, and M. Ernst. 2001. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J Leukoc Biol*. 69:11-20.
- Greaves, D.R., T. Hakkinen, A.D. Lucas, K. Liddiard, E. Jones, C.M. Quinn, J. Senaratne, F.R. Green, K. Tyson, J. Boyle, C. Shanahan, P.L. Weissberg, S. Gordon, and S. Yla-Herttuala. 2001. Linked chromosome 16q13 chemokines, macrophage-derived chemokine, fractalkine, and thymus- and activation-regulated chemokine, are expressed in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 21:923-9.

- Greenberg, P.D., D.E. Kern, and M.A. Cheever. 1985. Therapy of disseminated murine leukemia with cyclophosphamide and immune Lyt-1+,2- T cells. Tumor eradication does not require participation of cytotoxic T cells. *J Exp Med*. 161:1122-34.
- Groh, V., R. Rhinehart, H. Secrist, S. Bauer, K.H. Grabstein, and T. Spies. 1999. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:6879-84.
- Hanahan, D., and L.M. Coussens. 2012. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*. 21:309-22.
- Hanahan, D., and J. Folkman. 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 86:353-64.
- Hanahan, D., and R.A. Weinberg. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*. 100:57-70.
- Hanahan, D., and R.A. Weinberg. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144:646-74.
- Hanspal, M., and J.S. Hanspal. 1994. The association of erythroblasts with macrophages promotes erythroid proliferation and maturation: a 30-kD heparin-binding protein is involved in this contact. *Blood*. 84:3494-504.
- Harrison, J.K., Y. Jiang, S. Chen, Y. Xia, D. Maciejewski, R.K. McNamara, W.J. Streit, M.N. Salafranca, S. Adhikari, D.A. Thompson, P. Botti, K.B. Bacon, and L. Feng. 1998. Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:10896-901.
- Harvey, J.R., P. Mellor, H. Eldaly, T.W. Lennard, J.A. Kirby, and S. Ali. 2007. Inhibition of CXCR4-mediated breast cancer metastasis: a potential role for heparinoids? *Clin Cancer Res*. 13:1562-70.
- Hickman, H.D., L. Li, G.V. Reynoso, E.J. Rubin, C.N. Skon, J.W. Mays, J. Gibbs, O. Schwartz, J.R. Bennink, and J.W. Yewdell. 2011. Chemokines control naive CD8+ T cell selection of optimal lymph node antigen presenting cells. *J Exp Med*. 208:2511-24.
- Hideshima, T., D. Chauhan, T. Hayashi, K. Podar, M. Akiyama, D. Gupta, P. Richardson, N. Munshi, and K.C. Anderson. 2002. The biological sequelae of stromal cell-derived factor-1alpha in multiple myeloma. *Mol Cancer Ther*. 1:539-44.
- Hoogewerf, A.J., G.S. Kuschert, A.E. Proudfoot, F. Borlat, I. Clark-Lewis, C.A. Power, and T.N. Wells. 1997. Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines. *Biochemistry*. 36:13570-8.
- Horelt, A., K.U. Belge, B. Steppich, J. Prinz, and L. Ziegler-Heitbrock. 2002. The CD14+CD16+ monocytes in erysipelas are expanded and show reduced cytokine production. *Eur J Immunol*. 32:1319-27.
- Horuk, R. 2003. Development and evaluation of pharmacological agents targeting chemokine receptors. *Methods*. 29:369-75.
- Huang, S., M. Van Arsdall, S. Tedjarati, M. McCarty, W. Wu, R. Langley, and I.J. Fidler. 2002. Contributions of stromal metalloproteinase-9 to angiogenesis and growth of human ovarian carcinoma in mice. *J Natl Cancer Inst*. 94:1134-42.
- Hume, D.A. 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. *J Leukoc Biol*. 89:525-38.
- Huo, Y., A. Hafezi-Moghadam, and K. Ley. 2000. Role of vascular cell adhesion molecule-1 and fibronectin connecting segment-1 in monocyte rolling and adhesion on early atherosclerotic lesions. *Circ Res*. 87:153-9.

- Ibe, S., Z. Qin, T. Schuler, S. Preiss, and T. Blankenstein. 2001. Tumor rejection by disturbing tumor stroma cell interactions. *J Exp Med.* 194:1549-59.
- Imai, T., K. Hieshima, C. Haskell, M. Baba, M. Nagira, M. Nishimura, M. Kakizaki, S. Takagi, H. Nomiyama, T.J. Schall, and O. Yoshie. 1997. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell.* 91:521-30.
- Inoue, K., J.W. Slaton, B.Y. Eve, S.J. Kim, P. Perrotte, M.D. Balbay, S. Yano, M. Bar-Eli, R. Radinsky, C.A. Pettaway, and C.P. Dinney. 2000. Interleukin 8 expression regulates tumorigenicity and metastases in androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 6:2104-19.
- Ishida, Y., J.L. Gao, and P.M. Murphy. 2008. Chemokine receptor CX3CR1 mediates skin wound healing by promoting macrophage and fibroblast accumulation and function. *J Immunol.* 180:569-79.
- Ishii, M., J.G. Egen, F. Klauschen, M. Meier-Schellersheim, Y. Saeki, J. Vacher, R.L. Proia, and R.N. Germain. 2009. Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature.* 458:524-8.
- Ishii, M., J. Kikuta, Y. Shimazu, M. Meier-Schellersheim, and R.N. Germain. 2010. Chemorepulsion by blood S1P regulates osteoclast precursor mobilization and bone remodeling in vivo. *J Exp Med.* 207:2793-8.
- Jakob Busch-Petersen, Y.W. 2008. Phenol-containing antagonists of the CXCR2 receptor. *Expert Opin Ther Pat.* 18:629-637.
- Jamieson-Gladney, W.L., Y. Zhang, A.M. Fong, O. Meucci, and A. Fatatis. 2011. The chemokine receptor CX3CR1 is directly involved in the arrest of breast cancer cells to the skeleton. *Breast Cancer Res.* 13:R91.
- Johrer, K., L. Pleyer, A. Olivier, E. Maizner, C. Zelle-Rieser, and R. Greil. 2008. Tumour-immune cell interactions modulated by chemokines. *Expert Opin Biol Ther.* 8:269-90.
- Jones, E., M. Dahm-Vicker, A.K. Simon, A. Green, F. Powrie, V. Cerundolo, and A. Gallimore. 2002. Depletion of CD25+ regulatory cells results in suppression of melanoma growth and induction of autoreactivity in mice. *Cancer Immun.* 2:1.
- Joyce, J.A., and J.W. Pollard. 2009. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer.* 9:239-52.
- Jung, S., J. Aliberti, P. Graemmel, M.J. Sunshine, G.W. Kreutzberg, A. Sher, and D.R. Littman. 2000. Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol.* 20:4106-14.
- Kabashima, K., T.A. Banks, K.M. Ansel, T.T. Lu, C.F. Ware, and J.G. Cyster. 2005. Intrinsic lymphotoxin-beta receptor requirement for homeostasis of lymphoid tissue dendritic cells. *Immunity.* 22:439-50.
- Kakinuma, T., and S.T. Hwang. 2006. Chemokines, chemokine receptors, and cancer metastasis. *J Leukoc Biol.* 79:639-51.
- Kaplan, D.H., V. Shankaran, A.S. Dighe, E. Stockert, M. Aguet, L.J. Old, and R.D. Schreiber. 1998. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:7556-61.
- Karlmark, K.R., R. Weiskirchen, H.W. Zimmermann, N. Gassler, F. Ginhoux, C. Weber, M. Merad, T. Luedde, C. Trautwein, and F. Tacke. 2009. Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1+ monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis. *Hepatology.* 50:261-74.

- Kawasaki, E.S., M.B. Ladner, A.M. Wang, J. Van Arsdell, M.K. Warren, M.Y. Coyne, V.L. Schweickart, M.T. Lee, K.J. Wilson, A. Boosman, and et al. 1985. Molecular cloning of a complementary DNA encoding human macrophage-specific colony-stimulating factor (CSF-1). *Science*. 230:291-6.
- Keane, M.P., J.A. Belperio, Y.Y. Xue, M.D. Burdick, and R.M. Strieter. 2004. Depletion of CXCR2 inhibits tumor growth and angiogenesis in a murine model of lung cancer. *J Immunol*. 172:2853-60.
- Kessenbrock, K., V. Plaks, and Z. Werb. 2010. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*. 141:52-67.
- Kijima, T., G. Maulik, P.C. Ma, E.V. Tibaldi, R.E. Turner, B. Rollins, M. Sattler, B.E. Johnson, and R. Salgia. 2002. Regulation of cellular proliferation, cytoskeletal function, and signal transduction through CXCR4 and c-Kit in small cell lung cancer cells. *Cancer Res*. 62:6304-11.
- Kim, K.W., A. Vallon-Eberhard, E. Zigmond, J. Farache, E. Shezen, G. Shakhar, A. Ludwig, S.A. Lira, and S. Jung. 2011. In vivo structure/function and expression analysis of the CX3C chemokine fractalkine. *Blood*. 118:e156-67.
- Klymkowsky, M.W., and P. Savagner. 2009. Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe. *Am J Pathol*. 174:1588-93.
- Koch, A.E., P.J. Polverini, S.L. Kunkel, L.A. Harlow, L.A. DiPietro, V.M. Elner, S.G. Elner, and R.M. Strieter. 1992. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science*. 258:1798-801.
- Kraft, K., H. Olbrich, I. Majoul, M. Mack, A. Proudfoot, and M. Oppermann. 2001. Characterization of sequence determinants within the carboxyl-terminal domain of chemokine receptor CCR5 that regulate signaling and receptor internalization. *J Biol Chem*. 276:34408-18.
- Kunkel, S.L. 1999. Through the looking glass: the diverse in vivo activities of chemokines. *J Clin Invest*. 104:1333-4.
- Kunz, M., A. Toksoy, M. Goebeler, E. Engelhardt, E. Brouck, and R. Gillitzer. 1999. Strong expression of the lymphoattractant C-X-C chemokine Mig is associated with heavy infiltration of T cells in human malignant melanoma. *J Pathol*. 189:552-8.
- Kusmartsev, S., and D.I. Gabrilovich. 2005. STAT1 signaling regulates tumor-associated macrophage-mediated T cell deletion. *J Immunol*. 174:4880-91.
- Kusmartsev, S., Y. Nefedova, D. Yoder, and D.I. Gabrilovich. 2004. Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species. *J Immunol*. 172:989-99.
- Landsman, L., L. Bar-On, A. Zernecke, K.W. Kim, R. Krauthgamer, E. Shagdarsuren, S.A. Lira, I.L. Weissman, C. Weber, and S. Jung. 2009. CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. *Blood*. 113:963-72.
- Lapid, K., Y. Vagima, O. Kollet, and T. Lapidot. 2008. Egress and mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells.
- Lavergne, E., B. Combadiere, O. Bonduelle, M. Iga, J.L. Gao, M. Maho, A. Boissonnas, P.M. Murphy, P. Debre, and C. Combadiere. 2003. Fractalkine mediates natural killer-dependent antitumor responses in vivo. *Cancer Res*. 63:7468-74.
- Lazennec, G., and A. Richmond. 2010. Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation. *Trends Mol Med*. 16:133-44.
- Lehr, J.E., and K.J. Pienta. 1998. Preferential adhesion of prostate cancer cells to a human bone marrow endothelial cell line. *J Natl Cancer Inst*. 90:118-23.

- Leuschner, F., P. Dutta, R. Gorbato, T.I. Novobrantseva, J.S. Donahoe, G. Courties, K.M. Lee, J.I. Kim, J.F. Markmann, B. Marinelli, P. Panizzi, W.W. Lee, Y. Iwamoto, S. Milstein, H. Epstein-Barash, W. Cantley, J. Wong, V. Cortez-Retamozo, A. Newton, K. Love, P. Libby, M.J. Pittet, F.K. Swirski, V. Kotliansky, R. Langer, R. Weissleder, D.G. Anderson, and M. Nahrendorf. 2011. Therapeutic siRNA silencing in inflammatory monocytes in mice. *Nat Biotechnol.* 29:1005-10.
- Leuschner, F., P.J. Rauch, T. Ueno, R. Gorbato, B. Marinelli, W.W. Lee, P. Dutta, Y. Wei, C. Robbins, Y. Iwamoto, B. Sena, A. Chudnovskiy, P. Panizzi, E. Keliher, J.M. Higgins, P. Libby, M.A. Moskowitz, M.J. Pittet, F.K. Swirski, R. Weissleder, and M. Nahrendorf. 2012. Rapid monocyte kinetics in acute myocardial infarction are sustained by extramedullary monocytopoiesis. *J Exp Med.* 209:123-37.
- Levesque, J.P., J. Hendy, Y. Takamatsu, P.J. Simmons, and L.J. Bendall. 2003. Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by GCSF or cyclophosphamide. *J Clin Invest.* 111:187-96.
- Levesque, J.P., J. Hendy, Y. Takamatsu, B. Williams, I.G. Winkler, and P.J. Simmons. 2002. Mobilization by either cyclophosphamide or granulocyte colony-stimulating factor transforms the bone marrow into a highly proteolytic environment. *Exp Hematol.* 30:440-9.
- Levesque, J.P., Y. Takamatsu, S.K. Nilsson, D.N. Haylock, and P.J. Simmons. 2001. Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood.* 98:1289-97.
- Lewis, C.E., and J.W. Pollard. 2006. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res.* 66:605-12.
- Lewis, J.S., R.J. Landers, J.C. Underwood, A.L. Harris, and C.E. Lewis. 2000. Expression of vascular endothelial growth factor by macrophages is up-regulated in poorly vascularized areas of breast carcinomas. *J Pathol.* 192:150-8.
- Ley, K., C. Laudanna, M.I. Cybulsky, and S. Nourshargh. 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* 7:678-89.
- Liles, W.C., E. Rodger, H.E. Broxmeyer, C. Dehner, K. Badel, G. Calandra, J. Christensen, B. Wood, T.H. Price, and D.C. Dale. 2005. Augmented mobilization and collection of CD34+ hematopoietic cells from normal human volunteers stimulated with granulocyte-colony-stimulating factor by single-dose administration of AMD3100, a CXCR4 antagonist. *Transfusion.* 45:295-300.
- Lin, E.Y., A.V. Nguyen, R.G. Russell, and J.W. Pollard. 2001. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med.* 193:727-40.
- Lin, H., E. Lee, K. Hestir, C. Leo, M. Huang, E. Bosch, R. Halenbeck, G. Wu, A. Zhou, D. Behrens, D. Hollenbaugh, T. Linnemann, M. Qin, J. Wong, K. Chu, S.K. Doberstein, and L.T. Williams. 2008. Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome. *Science.* 320:807-11.
- Lo Celso, C., H.E. Fleming, J.W. Wu, C.X. Zhao, S. Miake-Lye, J. Fujisaki, D. Cote, D.W. Rowe, C.P. Lin, and D.T. Scadden. 2009. Live-animal tracking of individual haematopoietic stem/progenitor cells in their niche. *Nature.* 457:92-6.
- Lodi, P.J., D.S. Garrett, J. Kuszewski, M.L. Tsang, J.A. Weatherbee, W.J. Leonard, A.M. Gronenborn, and G.M. Clore. 1994. High-resolution solution structure of the beta chemokine hMIP-1 beta by multidimensional NMR. *Science.* 263:1762-7.

- Lodowski, D.T., and K. Palczewski. 2009. Chemokine receptors and other G protein-coupled receptors. *Curr Opin HIV AIDS*. 4:88-95.
- Loetscher, P., B. Moser, and M. Baggiolini. 2000. Chemokines and their receptors in lymphocyte traffic and HIV infection. *Adv Immunol*. 74:127-80.
- Luboshits, G., S. Shina, O. Kaplan, S. Engelberg, D. Nass, B. Lifshitz-Mercer, S. Chaitchik, I. Keydar, and A. Ben-Baruch. 1999. Elevated expression of the CC chemokine regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) in advanced breast carcinoma. *Cancer Res*. 59:4681-7.
- Luca, M., S. Huang, J.E. Gershenwald, R.K. Singh, R. Reich, and M. Bar-Eli. 1997. Expression of interleukin-8 by human melanoma cells up-regulates MMP-2 activity and increases tumor growth and metastasis. *Am J Pathol*. 151:1105-13.
- Lucas, A.D., N. Chadwick, B.F. Warren, D.P. Jewell, S. Gordon, F. Powrie, and D.R. Greaves. 2001. The transmembrane form of the CX3CL1 chemokine fractalkine is expressed predominantly by epithelial cells in vivo. *Am J Pathol*. 158:855-66.
- Ludwig, A., T. Berkhout, K. Moores, P. Groot, and G. Chapman. 2002. Fractalkine is expressed by smooth muscle cells in response to IFN-gamma and TNF-alpha and is modulated by metalloproteinase activity. *J Immunol*. 168:604-12.
- Luster, A.D. 1998. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med*. 338:436-45.
- Lutgens, E., B. Faber, K. Schapira, C.T. Evelo, R. van Haaften, S. Heeneman, K.B. Cleutjens, A.P. Bijnens, L. Beckers, J.G. Porter, C.R. Mackay, P. Rennert, V. Bailly, M. Jarpe, B. Dolinski, V. Koteliansky, T. de Fougerolles, and M.J. Daemen. 2005. Gene profiling in atherosclerosis reveals a key role for small inducible cytokines: validation using a novel monocyte chemoattractant protein monoclonal antibody. *Circulation*. 111:3443-52.
- Lutsiak, M.E., R.T. Semnani, R. De Pascalis, S.V. Kashmiri, J. Schlom, and H. Sabzevari. 2005. Inhibition of CD4(+)25+ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide. *Blood*. 105:2862-8.
- Luznik, L., R.J. Jones, and E.J. Fuchs. 2010. High-dose cyclophosphamide for graft-versus-host disease prevention. *Curr Opin Hematol*. 17:493-9.
- Lyszkiewicz, M., K. Witzlau, J. Pommerencke, and A. Krueger. 2011. Chemokine receptor CX3CR1 promotes dendritic cell development under steady-state conditions. *Eur J Immunol*. 41:1256-65.
- Ma, Q., D. Jones, P.R. Borghesani, R.A. Segal, T. Nagasawa, T. Kishimoto, R.T. Bronson, and T.A. Springer. 1998. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:9448-53.
- MacDonald, K.P., V. Rowe, H.M. Bofinger, R. Thomas, T. Sasmono, D.A. Hume, and G.R. Hill. 2005. The colony-stimulating factor 1 receptor is expressed on dendritic cells during differentiation and regulates their expansion. *J Immunol*. 175:1399-405.
- Mack, M., B. Luckow, P.J. Nelson, J. Cihak, G. Simmons, P.R. Clapham, N. Signoret, M. Marsh, M. Stangassinger, F. Borlat, T.N. Wells, D. Schlondorff, and A.E. Proudfoot. 1998. Aminooxypentane-RANTES induces CCR5 internalization but inhibits recycling: a novel inhibitory mechanism of HIV infectivity. *J Exp Med*. 187:1215-24.
- Mantovani, A., P. Allavena, and A. Sica. 2004a. Tumour-associated macrophages as a prototypic type II polarised phagocyte population: role in tumour progression. *Eur J Cancer*. 40:1660-7.

- Mantovani, A., R. Bonecchi, and M. Locati. 2006. Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more. *Nat Rev Immunol.* 6:907-18.
- Mantovani, A., M. Locati, A. Vecchi, S. Sozzani, and P. Allavena. 2001. Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines. *Trends Immunol.* 22:328-36.
- Mantovani, A., A. Sica, and M. Locati. 2007. New vistas on macrophage differentiation and activation. *Eur J Immunol.* 37:14-6.
- Mantovani, A., A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi, and M. Locati. 2004b. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25:677-86.
- Mantovani, A., S. Sozzani, M. Locati, P. Allavena, and A. Sica. 2002. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 23:549-55.
- Marchesi, F., M. Locatelli, G. Solinas, M. Erreni, P. Allavena, and A. Mantovani. 2010. Role of CX3CR1/CX3CL1 axis in primary and secondary involvement of the nervous system by cancer. *J Neuroimmunol.* 224:39-44.
- Martinez, F.O., L. Helming, and S. Gordon. 2009. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol.* 27:451-83.
- Martins, I., M. Michaud, A.Q. Sukkurwala, S. Adjemian, Y. Ma, S. Shen, O. Kepp, L. Menger, E. Vacchelli, L. Galluzzi, L. Zitvogel, and G. Kroemer. Premortem autophagy determines the immunogenicity of chemotherapy-induced cancer cell death. *Autophagy.* 8.
- Matar, P., V.R. Rozados, S.I. Gervasoni, and G.O. Scharovsky. 2002. Th2/Th1 switch induced by a single low dose of cyclophosphamide in a rat metastatic lymphoma model. *Cancer Immunol Immunother.* 50:588-96.
- Matloubian, M., A. David, S. Engel, J.E. Ryan, and J.G. Cyster. 2000. A transmembrane CXC chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo. *Nat Immunol.* 1:298-304.
- Mazo, I.B., J.C. Gutierrez-Ramos, P.S. Frenette, R.O. Hynes, D.D. Wagner, and U.H. von Andrian. 1998. Hematopoietic progenitor cell rolling in bone marrow microvessels: parallel contributions by endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule 1. *J Exp Med.* 188:465-74.
- McKenna, H.J., K.L. Stocking, R.E. Miller, K. Brasel, T. De Smedt, E. Maraskovsky, C.R. Maliszewski, D.H. Lynch, J. Smith, B. Pulendran, E.R. Roux, M. Teepe, S.D. Lyman, and J.J. Peschon. 2000. Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood.* 95:3489-97.
- Medina-Echeverz, J., and P. Berraondo. 2012. Colon cancer eradication after chemoimmunotherapy is associated with intratumoral emergence of proinflammatory myeloid cells. *Oncoimmunology.* 1:118-120.
- Medina-Echeverz, J., J. Fioravanti, M. Zabala, N. Ardaiz, J. Prieto, and P. Berraondo. 2011. Successful colon cancer eradication after chemoimmunotherapy is associated with profound phenotypic change of intratumoral myeloid cells. *J Immunol.* 186:807-15.
- Melcher, A., S. Todryk, N. Hardwick, M. Ford, M. Jacobson, and R.G. Vile. 1998. Tumor immunogenicity is determined by the mechanism of cell death via induction of heat shock protein expression. *Nat Med.* 4:581-7.
- Mestas, J., M.D. Burdick, K. Reckamp, A. Pantuck, R.A. Figlin, and R.M. Strieter. 2005. The role of CXCR2/CXCR2 ligand biological axis in renal cell carcinoma. *J Immunol.* 175:5351-7.

- Mildner, A., H. Schmidt, M. Nitsche, D. Merkler, U.K. Hanisch, M. Mack, M. Heikenwalder, W. Bruck, J. Priller, and M. Prinz. 2007. Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions. *Nat Neurosci.* 10:1544-53.
- Mitchell, M.S. 2003. Combinations of anticancer drugs and immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 52:686-92.
- Mizoue, L.S., J.F. Bazan, E.C. Johnson, and T.M. Handel. 1999. Solution structure and dynamics of the CX3C chemokine domain of fractalkine and its interaction with an N-terminal fragment of CX3CR1. *Biochemistry.* 38:1402-14.
- Mizuno, K., T. Toma, H. Tsukiji, H. Okamoto, H. Yamazaki, K. Ohta, Y. Kasahara, S. Koizumi, and A. Yachie. 2005. Selective expansion of CD16highCCR2- subpopulation of circulating monocytes with preferential production of haem oxygenase (HO)-1 in response to acute inflammation. *Clin Exp Immunol.* 142:461-70.
- Montecarlo, F.S., H. Arai, and I.F. Charo. 1997. Molecular approaches to identifying ligand binding and signaling domains of C-C chemokine receptors. *Methods Enzymol.* 288:70-84.
- Moore, C.A., S.K. Milano, and J.L. Benovic. 2007. Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu Rev Physiol.* 69:451-82.
- Moretta, A., C. Bottino, M. Vitale, D. Pende, C. Cantoni, M.C. Mingari, R. Biassoni, and L. Moretta. 2001. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol.* 19:197-223.
- Moretta, L., R. Biassoni, C. Bottino, M.C. Mingari, and A. Moretta. 2000. Human NK-cell receptors. *Immunol Today.* 21:420-2.
- Moschella, F., M. Valentini, E. Arico, I. Macchia, P. Sestili, M.T. D'Urso, C. Alessandri, F. Belardelli, and E. Proietti. 2010. Unraveling cancer chemoimmunotherapy mechanisms by gene and protein expression profiling of responses to cyclophosphamide. *Cancer Res.* 71:3528-39.
- Movahedi, K., D. Laoui, C. Gysemans, M. Baeten, G. Stange, J. Van den Bossche, M. Mack, D. Pipeleers, P. In't Veld, P. De Baetselier, and J.A. Van Ginderachter. 2010. Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes. *Cancer Res.* 70:5728-39.
- Mrowietz, U., U. Schwenk, S. Maune, J. Bartels, M. Kupper, I. Fichtner, J.M. Schroder, and D. Schadendorf. 1999. The chemokine RANTES is secreted by human melanoma cells and is associated with enhanced tumour formation in nude mice. *Br J Cancer.* 79:1025-31.
- Muehlhoefer, A., L.J. Saubermann, X. Gu, K. Luedtke-Heckenkamp, R. Xavier, R.S. Blumberg, D.K. Podolsky, R.P. MacDermott, and H.C. Reinecker. 2000. Fractalkine is an epithelial and endothelial cell-derived chemoattractant for intraepithelial lymphocytes in the small intestinal mucosa. *J Immunol.* 164:3368-76.
- Muller, A., B. Homey, H. Soto, N. Ge, D. Catron, M.E. Buchanan, T. McClanahan, E. Murphy, W. Yuan, S.N. Wagner, J.L. Barrera, A. Mohar, E. Verastegui, and A. Zlotnik. 2001. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature.* 410:50-6.
- Muller, W.A. 2002. Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. *Lab Invest.* 82:521-33.
- Mullins, I.M., C.L. Slingluff, J.K. Lee, C.F. Garbee, J. Shu, S.G. Anderson, M.E. Mayer, W.A. Knaus, and D.W. Mullins. 2004. CXCR3 chemokine receptor 3 expression by activated CD8+ T cells is associated with survival in melanoma patients with stage III disease. *Cancer Res.* 64:7697-701.

- Murdoch, C., and A. Finn. 2000. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood*. 95:3032-43.
- Murphy, P.M. 2001. Chemokines and the molecular basis of cancer metastasis. *N Engl J Med*. 345:833-5.
- Murphy, P.M. 2002. International Union of Pharmacology. XXX. Update on chemokine receptor nomenclature. *Pharmacol Rev*. 54:227-9.
- Murphy, P.M., M. Baggiolini, I.F. Charo, C.A. Hebert, R. Horuk, K. Matsushima, L.H. Miller, J.J. Oppenheim, and C.A. Power. 2000. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev*. 52:145-76.
- Nahrendorf, M., F.K. Swirski, E. Aikawa, L. Stangenberg, T. Wurdinger, J.L. Figueiredo, P. Libby, R. Weissleder, and M.J. Pittet. 2007. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med*. 204:3037-47.
- Nakahara, T., H. Uchi, A.M. Lesokhin, F. Avogadri, G.A. Rizzuto, D. Hirschhorn-Cymerman, K.S. Panageas, T. Merghoub, J.D. Wolchok, and A.N. Houghton. 2010. Cyclophosphamide enhances immunity by modulating the balance of dendritic cell subsets in lymphoid organs. *Blood*. 115:4384-92.
- Nakamura, K., A. Kitani, and W. Strober. 2001. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med*. 194:629-44.
- Nakamura, Y., H. Yasuoka, M. Tsujimoto, K. Yoshidome, M. Nakahara, K. Nakao, M. Nakamura, and K. Kakudo. 2006. Nitric oxide in breast cancer: induction of vascular endothelial growth factor-C and correlation with metastasis and poor prognosis. *Clin Cancer Res*. 12:1201-7.
- Nakano, O., M. Sato, Y. Naito, K. Suzuki, S. Orikasa, M. Aizawa, Y. Suzuki, I. Shintaku, H. Nagura, and H. Ohtani. 2001. Proliferative activity of intratumoral CD8(+) T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity. *Cancer Res*. 61:5132-6.
- Neel, N.F., E. Schutyser, J. Sai, G.H. Fan, and A. Richmond. 2005. Chemokine receptor internalization and intracellular trafficking. *Cytokine Growth Factor Rev*. 16:637-58.
- Nevo, I., O. Sagi-Assif, T. Meshel, A. Ben-Baruch, K. Johrer, R. Greil, L.E. Trejo, O. Kharenko, M. Feinmesser, I. Yron, and I.P. Witz. 2009. The involvement of the fractalkine receptor in the transmigration of neuroblastoma cells through bone-marrow endothelial cells. *Cancer Lett*. 273:127-39.
- Nishiyori, A., M. Minami, Y. Ohtani, S. Takami, J. Yamamoto, N. Kawaguchi, T. Kume, A. Akaike, and M. Satoh. 1998. Localization of fractalkine and CX3CR1 mRNAs in rat brain: does fractalkine play a role in signaling from neuron to microglia? *FEBS Lett*. 429:167-72.
- Norrby, K. 1997. Angiogenesis: new aspects relating to its initiation and control. *APMIS*. 105:417-37.
- North, R.J. 1982. Cyclophosphamide-facilitated adoptive immunotherapy of an established tumor depends on elimination of tumor-induced suppressor T cells. *J Exp Med*. 155:1063-74.
- O'Hayre, M., C.L. Salanga, T.M. Handel, and S.J. Allen. 2008. Chemokines and cancer: migration, intracellular signalling and intercellular communication in the microenvironment. *Biochem J*. 409:635-49.

- O'Sullivan, T., R. Saddawi-Konefka, W. Vermi, C.M. Koebel, C. Arthur, J.M. White, R. Uppaluri, D.M. Andrews, S.F. Ngiew, M.W. Teng, M.J. Smyth, R.D. Schreiber, and J.D. Bui. 2012. Cancer immunoediting by the innate immune system in the absence of adaptive immunity. *J Exp Med*. 209:1869-82.
- Obeid, M., A. Tesniere, F. Ghiringhelli, G.M. Fimia, L. Apetoh, J.L. Perfettini, M. Castedo, G. Mignot, T. Panaretakis, N. Casares, D. Metivier, N. Larochette, P. van Endert, F. Ciccocanti, M. Piacentini, L. Zitvogel, and G. Kroemer. 2007. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med*. 13:54-61.
- Ogilvie, P., G. Bardi, I. Clark-Lewis, M. Baggiolini, and M. Uguccioni. 2001. Eotaxin is a natural antagonist for CCR2 and an agonist for CCR5. *Blood*. 97:1920-4.
- Okada, T., M. Lopez-Lago, and F.G. Giancotti. 2005. Merlin/NF-2 mediates contact inhibition of growth by suppressing recruitment of Rac to the plasma membrane. *J Cell Biol*. 171:361-71.
- Old, L.J., and E.A. Boyse. 1964. Immunology of Experimental Tumors. *Annu Rev Med*. 15:167-86.
- Olson, W.C., and J.M. Jacobson. 2009. CCR5 monoclonal antibodies for HIV-1 therapy. *Curr Opin HIV AIDS*. 4:104-11.
- Olson, W.C., G.E. Rabut, K.A. Nagashima, D.N. Tran, D.J. Anselma, S.P. Monard, J.P. Segal, D.A. Thompson, F. Kajumo, Y. Guo, J.P. Moore, P.J. Maddon, and T. Dragic. 1999. Differential inhibition of human immunodeficiency virus type 1 fusion, gp120 binding, and CC-chemokine activity by monoclonal antibodies to CCR5. *J Virol*. 73:4145-55.
- Onizuka, S., I. Tawara, J. Shimizu, S. Sakaguchi, T. Fujita, and E. Nakayama. 1999. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res*. 59:3128-33.
- Onuffer, J.J., and R. Horuk. 2002. Chemokines, chemokine receptors and small-molecule antagonists: recent developments. *Trends Pharmacol Sci*. 23:459-67.
- Ovchinnikov, D.A., W.J. van Zuylen, C.E. DeBats, K.A. Alexander, S. Kellie, and D.A. Hume. 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*. 83:430-3.
- Owen, J.D., R. Strieter, M. Burdick, H. Haghnegahdar, L. Nanne, R. Shattuck-Brandt, and A. Richmond. 1997. Enhanced tumor-forming capacity for immortalized melanocytes expressing melanoma growth stimulatory activity/growth-regulated cytokine beta and gamma proteins. *Int J Cancer*. 73:94-103.
- Panaretakis, T., N. Joza, N. Modjtahedi, A. Tesniere, I. Vitale, M. Durchschlag, G.M. Fimia, O. Kepp, M. Piacentini, K.U. Froehlich, P. van Endert, L. Zitvogel, F. Madeo, and G. Kroemer. 2008. The co-translocation of ERp57 and calreticulin determines the immunogenicity of cell death. *Cell Death Differ*. 15:1499-509.
- Pandiyani, P., L. Zheng, S. Ishihara, J. Reed, and M.J. Lenardo. 2007. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol*. 8:1353-62.
- Pantel, K., and R.H. Brakenhoff. 2004. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer*. 4:448-56.
- Papadopoulos, E.J., C. Sasseti, H. Saeki, N. Yamada, T. Kawamura, D.J. Fitzhugh, M.A. Saraf, T. Schall, A. Blauvelt, S.D. Rosen, and S.T. Hwang. 1999. Fractalkine, a CX3C chemokine, is expressed by dendritic cells and is up-regulated upon dendritic cell maturation. *Eur J Immunol*. 29:2551-9.

- Pease, J.E., and R. Horuk. 2009a. Chemokine receptor antagonists: Part 1. *Expert Opin Ther Pat.* 19:39-58.
- Pease, J.E., and R. Horuk. 2009b. Chemokine receptor antagonists: part 2. *Expert Opin Ther Pat.* 19:199-221.
- Pivarcsi, A., A. Muller, A. Hippe, J. Rieker, A. van Lierop, M. Steinhoff, S. Seeliger, R. Kubitza, U. Pippirs, S. Meller, P.A. Gerber, R. Liersch, E. Buenemann, E. Sonkoly, U. Wiesner, T.K. Hoffmann, L. Schneider, R. Piekorz, E. Enderlein, J. Reifemberger, U.P. Rohr, R. Haas, P. Boukamp, I. Haase, B. Nurnberg, T. Ruzicka, A. Zlotnik, and B. Homey. 2007. Tumor immune escape by the loss of homeostatic chemokine expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:19055-60.
- Pollard, J.W. 2004. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer.* 4:71-8.
- Pollard, J.W. 2009. Trophic macrophages in development and disease. *Nat Rev Immunol.* 9:259-70.
- Polyak, K., and R.A. Weinberg. 2009. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer.* 9:265-73.
- Priceman, S.J., J.L. Sung, Z. Shaposhnik, J.B. Burton, A.X. Torres-Collado, D.L. Moughon, M. Johnson, A.J. Lusic, D.A. Cohen, M.L. Iruela-Arispe, and L. Wu. 2010. Targeting distinct tumor-infiltrating myeloid cells by inhibiting CSF-1 receptor: combating tumor evasion of antiangiogenic therapy. *Blood.* 115:1461-71.
- Proudfoot, A.E., T.M. Handel, Z. Johnson, E.K. Lau, P. LiWang, I. Clark-Lewis, F. Borlat, T.N. Wells, and M.H. Kosco-Vilbois. 2003. Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:1885-90.
- Qian, B., Y. Deng, J.H. Im, R.J. Muschel, Y. Zou, J. Li, R.A. Lang, and J.W. Pollard. 2009. A distinct macrophage population mediates metastatic breast cancer cell extravasation, establishment and growth. *PLoS One.* 4:e6562.
- Qian, B.Z., J. Li, H. Zhang, T. Kitamura, J. Zhang, L.R. Campion, E.A. Kaiser, L.A. Snyder, and J.W. Pollard. 2011. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature.* 475:222-5.
- Quatromoni, J.G., and E. Eruslanov. 2012. Tumor-associated macrophages: function, phenotype, and link to prognosis in human lung cancer. *Am J Transl Res.* 4:376-89.
- Rajagopal, S., K. Rajagopal, and R.J. Lefkowitz. 2010. Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Drug Discov.* 9:373-86.
- Read, S., V. Malmstrom, and F. Powrie. 2000. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med.* 192:295-302.
- Reed, J.R., M.D. Stone, T.C. Beadnell, Y. Ryu, T.J. Griffin, and K.L. Schwertfeger. 2012. Fibroblast Growth Factor Receptor 1 Activation in Mammary Tumor Cells Promotes Macrophage Recruitment in a CX3CL1-Dependent Manner. *PLoS One.* 7:e45877.
- Ren, T., Q. Chen, Z. Tian, and H. Wei. 2007. Down-regulation of surface fractalkine by RNA interference in B16 melanoma reduced tumor growth in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 364:978-84.
- Rhodes, D.R., J. Yu, K. Shanker, N. Deshpande, R. Varambally, D. Ghosh, T. Barrette, A. Pandey, and A.M. Chinnaiyan. 2004. ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform. *Neoplasia.* 6:1-6.

- Richmond, A., and H.G. Thomas. 1986. Purification of melanoma growth stimulatory activity. *J Cell Physiol.* 129:375-84.
- Richmond, A., and H.G. Thomas. 1988. Melanoma growth stimulatory activity: isolation from human melanoma tumors and characterization of tissue distribution. *J Cell Biochem.* 36:185-98.
- Robben, P.M., M. LaRegina, W.A. Kuziel, and L.D. Sibley. 2005. Recruitment of Gr-1+ monocytes is essential for control of acute toxoplasmosis. *J Exp Med.* 201:1761-9.
- Robbins, C.S., A. Chudnovskiy, P.J. Rauch, J.L. Figueiredo, Y. Iwamoto, R. Gorbato, M. Etzrodt, G.F. Weber, T. Ueno, N. van Rooijen, M.J. Mulligan-Kehoe, P. Libby, M. Nahrendorf, M.J. Pittet, R. Weissleder, and F.K. Swirski. 2012. Extramedullary hematopoiesis generates Ly-6C(high) monocytes that infiltrate atherosclerotic lesions. *Circulation.* 125:364-74.
- Robledo, M.M., R.A. Bartolome, N. Longo, J.M. Rodriguez-Frade, M. Mellado, I. Longo, G.N. van Muijen, P. Sanchez-Mateos, and J. Teixido. 2001. Expression of functional chemokine receptors CXCR3 and CXCR4 on human melanoma cells. *J Biol Chem.* 276:45098-105.
- Rodriguez, P.C., and A.C. Ochoa. 2008. Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunol Rev.* 222:180-91.
- Rollins, B.J. 1997. Chemokines. *Blood.* 90:909-28.
- Romagnani, P., F. Annunziato, L. Lasagni, E. Lazzeri, C. Beltrame, M. Francalanci, M. Ugucioni, G. Galli, L. Cosmi, L. Maurenzig, M. Baggiolini, E. Maggi, S. Romagnani, and M. Serio. 2001. Cell cycle-dependent expression of CXC chemokine receptor 3 by endothelial cells mediates angiostatic activity. *J Clin Invest.* 107:53-63.
- Romagnani, P., L. Lasagni, F. Annunziato, M. Serio, and S. Romagnani. 2004. CXC chemokines: the regulatory link between inflammation and angiogenesis. *Trends Immunol.* 25:201-9.
- Romagnani, P., L. Maggi, B. Mazzinghi, L. Cosmi, L. Lasagni, F. Liotta, E. Lazzeri, R. Angeli, M. Rotondi, L. Fili, P. Parronchi, M. Serio, E. Maggi, S. Romagnani, and F. Annunziato. 2005. CXCR3-mediated opposite effects of CXCL10 and CXCL4 on TH1 or TH2 cytokine production. *J Allergy Clin Immunol.* 116:1372-9.
- Rossi, D., and A. Zlotnik. 2000. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol.* 18:217-42.
- Ryan, G.R., X.M. Dai, M.G. Dominguez, W. Tong, F. Chuan, O. Chisholm, R.G. Russell, J.W. Pollard, and E.R. Stanley. 2001. Rescue of the colony-stimulating factor 1 (CSF-1)-nullizygous mouse (Csf1(op)/Csf1(op)) phenotype with a CSF-1 transgene and identification of sites of local CSF-1 synthesis. *Blood.* 98:74-84.
- Sadir, R., A. Imbert, F. Baleux, and H. Lortat-Jacob. 2004. Heparan sulfate/heparin oligosaccharides protect stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCL12 against proteolysis induced by CD26/dipeptidyl peptidase IV. *J Biol Chem.* 279:43854-60.
- Saji, H., M. Koike, T. Yamori, S. Saji, M. Seiki, K. Matsushima, and M. Toi. 2001. Significant correlation of monocyte chemoattractant protein-1 expression with neovascularization and progression of breast carcinoma. *Cancer.* 92:1085-91.
- Salcedo, R., K. Wasserman, H.A. Young, M.C. Grimm, O.M. Howard, M.R. Anver, H.K. Kleinman, W.J. Murphy, and J.J. Oppenheim. 1999. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human

- endothelial cells: In vivo neovascularization induced by stromal-derived factor-1alpha. *Am J Pathol.* 154:1125-35.
- Salem, M.L., A.A. Al-Khami, S.A. El-Naggar, C.M. Diaz-Montero, Y. Chen, and D.J. Cole. 2010. Cyclophosphamide induces dynamic alterations in the host microenvironments resulting in a Flt3 ligand-dependent expansion of dendritic cells. *J Immunol.* 184:1737-47.
- Salem, M.L., C.M. Diaz-Montero, A.A. Al-Khami, S.A. El-Naggar, O. Naga, A.J. Montero, A. Khafagy, and D.J. Cole. 2009. Recovery from cyclophosphamide-induced lymphopenia results in expansion of immature dendritic cells which can mediate enhanced prime-boost vaccination antitumor responses in vivo when stimulated with the TLR3 agonist poly(I:C). *J Immunol.* 182:2030-40.
- Salem, M.L., A.N. Kadima, S.A. El-Naggar, M.P. Rubinstein, Y. Chen, W.E. Gillanders, and D.J. Cole. 2007. Defining the ability of cyclophosphamide preconditioning to enhance the antigen-specific CD8+ T-cell response to peptide vaccination: creation of a beneficial host microenvironment involving type I IFNs and myeloid cells. *J Immunother.* 30:40-53.
- Sallusto, F., and A. Lanzavecchia. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med.* 179:1109-18.
- Sasmono, R.T., D. Oceandy, J.W. Pollard, W. Tong, P. Pavli, B.J. Wainwright, M.C. Ostrowski, S.R. Himes, and D.A. Hume. 2003. A macrophage colony-stimulating factor receptor-green fluorescent protein transgene is expressed throughout the mononuclear phagocyte system of the mouse. *Blood.* 101:1155-63.
- Sawanobori, Y., S. Ueha, M. Kurachi, T. Shimaoka, J.E. Talmadge, J. Abe, Y. Shono, M. Kitabatake, K. Kakimi, N. Mukaida, and K. Matsushima. 2008. Chemokine-mediated rapid turnover of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Blood.* 111:5457-66.
- Scalley-Kim, M.L., B.W. Hess, R.L. Kelly, A.R. Krostag, K.H. Lustig, J.S. Marken, P.J. Ovendale, A.R. Posey, P.J. Smolak, J.D. Taylor, C.L. Wood, D.L. Bienvenue, P. Probst, R.A. Salmon, D.S. Allison, T.M. Foy, and C.J. Raport. 2012. A novel highly potent therapeutic antibody neutralizes multiple human chemokines and mimics viral immune modulation. *PLoS One.* 7:e43332.
- Schenkel, A.R., Z. Mamdouh, and W.A. Muller. 2004. Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation. *Nat Immunol.* 5:393-400.
- Schiavoni, G., F. Mattei, T. Di Pucchio, S.M. Santini, L. Bracci, F. Belardelli, and E. Proietti. 2000. Cyclophosphamide induces type I interferon and augments the number of CD44(hi) T lymphocytes in mice: implications for strategies of chemoimmunotherapy of cancer. *Blood.* 95:2024-30.
- Schiavoni, G., A. Sistigu, M. Valentini, F. Mattei, P. Sestili, F. Spadaro, M. Sanchez, S. Lorenzi, M.T. D'Urso, F. Belardelli, L. Gabriele, E. Proietti, and L. Bracci. 2011. Cyclophosphamide synergizes with type I interferons through systemic dendritic cell reactivation and induction of immunogenic tumor apoptosis. *Cancer Res.* 71:768-78.
- Schioppa, T., B. Uranchimeg, A. Sacconi, S.K. Biswas, A. Doni, A. Rapisarda, S. Bernasconi, S. Sacconi, M. Nebuloni, L. Vago, A. Mantovani, G. Melillo, and A. Sica. 2003. Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia. *J Exp Med.* 198:1391-402.

- Schlyer, S., and R. Horuk. 2006. I want a new drug: G-protein-coupled receptors in drug development. *Drug Discov Today*. 11:481-93.
- Scott, L.J., N.W. Clarke, N.J. George, J.H. Shanks, N.G. Testa, and S.H. Lang. 2001. Interactions of human prostatic epithelial cells with bone marrow endothelium: binding and invasion. *Br J Cancer*. 84:1417-23.
- Sechler, J.M., J. Barlic, J.C. Grivel, and P.M. Murphy. 2004. IL-15 alters expression and function of the chemokine receptor CX3CR1 in human NK cells. *Cell Immunol*. 230:99-108.
- Serbina, N.V., T. Jia, T.M. Hohl, and E.G. Pamer. 2008. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol*. 26:421-52.
- Serbina, N.V., and E.G. Pamer. 2006. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol*. 7:311-7.
- Sgadari, C., A.L. Angiolillo, B.W. Cherney, S.E. Pike, J.M. Farber, L.G. Koniaris, P. Vanguri, P.R. Burd, N. Sheikh, G. Gupta, J. Teruya-Feldstein, and G. Tosato. 1996a. Interferon-inducible protein-10 identified as a mediator of tumor necrosis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:13791-6.
- Sgadari, C., A.L. Angiolillo, and G. Tosato. 1996b. Inhibition of angiogenesis by interleukin-12 is mediated by the interferon-inducible protein 10. *Blood*. 87:3877-82.
- Sgadari, C., J.M. Farber, A.L. Angiolillo, F. Liao, J. Teruya-Feldstein, P.R. Burd, L. Yao, G. Gupta, C. Kanegane, and G. Tosato. 1997. Mig, the monokine induced by interferon-gamma, promotes tumor necrosis in vivo. *Blood*. 89:2635-43.
- Shattil, S.J. 2005. Integrins and Src: dynamic duo of adhesion signaling. *Trends Cell Biol*. 15:399-403.
- Shechter, R., A. London, C. Varol, C. Raposo, M. Cusimano, G. Yovel, A. Rolls, M. Mack, S. Pluchino, G. Martino, S. Jung, and M. Schwartz. 2009. Infiltrating blood-derived macrophages are vital cells playing an anti-inflammatory role in recovery from spinal cord injury in mice. *PLoS Med*. 6:e1000113.
- Shi, C., T. Jia, S. Mendez-Ferrer, T.M. Hohl, N.V. Serbina, L. Lipuma, I. Leiner, M.O. Li, P.S. Frenette, and E.G. Pamer. 2011. Bone marrow mesenchymal stem and progenitor cells induce monocyte emigration in response to circulating toll-like receptor ligands. *Immunity*. 34:590-601.
- Shi, C., and E.G. Pamer. 2011. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 11:762-74.
- Shimizu, J., S. Yamazaki, and S. Sakaguchi. 1999. Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol*. 163:5211-8.
- Shulby, S.A., N.G. Dolloff, M.E. Stearns, O. Meucci, and A. Fatatis. 2004. CX3CR1-fractalkine expression regulates cellular mechanisms involved in adhesion, migration, and survival of human prostate cancer cells. *Cancer Res*. 64:4693-8.
- Si, Y., C.L. Tsou, K. Croft, and I.F. Charo. 2010. CCR2 mediates hematopoietic stem and progenitor cell trafficking to sites of inflammation in mice. *J Clin Invest*. 120:1192-203.
- Singh, S., A. Sadanandam, and R.K. Singh. 2007. Chemokines in tumor angiogenesis and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 26:453-67.

- Sipkins, D.A., X. Wei, J.W. Wu, J.M. Runnels, D. Cote, T.K. Means, A.D. Luster, D.T. Scadden, and C.P. Lin. 2005. In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment. *Nature*. 435:969-73.
- Skelton, N.J., F. Aspiras, J. Ogez, and T.J. Schall. 1995. Proton NMR assignments and solution conformation of RANTES, a chemokine of the C-C type. *Biochemistry*. 34:5329-42.
- Skrzeczynska-Moncznik, J., M. Bzowska, S. Loseke, E. Grage-Griebenow, M. Zembala, and J. Pryjma. 2008. Peripheral blood CD14^{high} CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10. *Scand J Immunol*. 67:152-9.
- Smith, D.R., P.J. Polverini, S.L. Kunkel, M.B. Orringer, R.I. Whyte, M.D. Burdick, C.A. Wilke, and R.M. Strieter. 1994. Inhibition of interleukin 8 attenuates angiogenesis in bronchogenic carcinoma. *J Exp Med*. 179:1409-15.
- Solinas, G., G. Germano, A. Mantovani, and P. Allavena. 2009. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol*. 86:1065-73.
- Soni, S., S. Bala, B. Gwynn, K.E. Sahr, L.L. Peters, and M. Hanspal. 2006. Absence of erythroblast macrophage protein (Emp) leads to failure of erythroblast nuclear extrusion. *J Biol Chem*. 281:20181-9.
- Srivastava, P. 2002. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2:185-94.
- Stievano, L., E. Piovan, and A. Amadori. 2004. C and CX3C chemokines: cell sources and physiopathological implications. *Crit Rev Immunol*. 24:205-28.
- Street, S.E., E. Cretney, and M.J. Smyth. 2001. Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood*. 97:192-7.
- Street, S.E., J.A. Trapani, D. MacGregor, and M.J. Smyth. 2002. Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma. *J Exp Med*. 196:129-34.
- Strieter, R.M., J.A. Belperio, R.J. Phillips, and M.P. Keane. 2004. CXC chemokines in angiogenesis of cancer. *Semin Cancer Biol*. 14:195-200.
- Strieter, R.M., P.J. Polverini, D.A. Arenberg, and S.L. Kunkel. 1995a. The role of CXC chemokines as regulators of angiogenesis. *Shock*. 4:155-60.
- Strieter, R.M., P.J. Polverini, S.L. Kunkel, D.A. Arenberg, M.D. Burdick, J. Kasper, J. Dzuiba, J. Van Damme, A. Walz, D. Marriott, and et al. 1995b. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem*. 270:27348-57.
- Stutman, O. 1974. Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science*. 183:534-6.
- Stutman, O. 1979. Chemical carcinogenesis in nude mice: comparison between nude mice from homozygous matings and heterozygous matings and effect of age and carcinogen dose. *J Natl Cancer Inst*. 62:353-8.
- Sun, Y.X., J. Wang, C.E. Shelburne, D.E. Lopatin, A.M. Chinnaiyan, M.A. Rubin, K.J. Pienta, and R.S. Taichman. 2003. Expression of CXCR4 and CXCL12 (SDF-1) in human prostate cancers (PCa) in vivo. *J Cell Biochem*. 89:462-73.
- Sunderkotter, C., T. Nikolic, M.J. Dillon, N. Van Rooijen, M. Stehling, D.A. Drevets, and P.J. Leenen. 2004. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol*. 172:4410-7.
- Sutmuller, R.P., L.M. van Duivenvoorde, A. van Elsas, T.N. Schumacher, M.E. Wildenberg, J.P. Allison, R.E. Toes, R. Offringa, and C.J. Melief. 2001. Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells

- in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med*. 194:823-32.
- Swaminathan, G.J., D.E. Holloway, R.A. Colvin, G.K. Campanella, A.C. Papageorgiou, A.D. Luster, and K.R. Acharya. 2003. Crystal structures of oligomeric forms of the IP-10/CXCL10 chemokine. *Structure*. 11:521-32.
- Swirski, F.K., M. Nahrendorf, M. Etzrodt, M. Wildgruber, V. Cortez-Retamozo, P. Panizzi, J.L. Figueiredo, R.H. Kohler, A. Chudnovskiy, P. Waterman, E. Aikawa, T.R. Mempel, P. Libby, R. Weissleder, and M.J. Pittet. 2009. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science*. 325:612-6.
- Tachibana, K., S. Hirota, H. Iizasa, H. Yoshida, K. Kawabata, Y. Kataoka, Y. Kitamura, K. Matsushima, N. Yoshida, S. Nishikawa, T. Kishimoto, and T. Nagasawa. 1998. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature*. 393:591-4.
- Taub, D.D., J.R. Ortaldo, S.M. Turcovski-Corrales, M.L. Key, D.L. Longo, and W.J. Murphy. 1996. Beta chemokines costimulate lymphocyte cytolysis, proliferation, and lymphokine production. *J Leukoc Biol*. 59:81-9.
- Teitelbaum, S.L. 2000. Bone resorption by osteoclasts. *Science*. 289:1504-8.
- Thelen, M. 2001. Dancing to the tune of chemokines. *Nat Immunol*. 2:129-34.
- Thiery, J.P., H. Acloque, R.Y. Huang, and M.A. Nieto. 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 139:871-90.
- Tsou, C.L., C.A. Haskell, and I.F. Charo. 2001. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme mediates the inducible cleavage of fractalkine. *J Biol Chem*. 276:44622-6.
- Tsou, C.L., W. Peters, Y. Si, S. Slaymaker, A.M. Aslanian, S.P. Weisberg, M. Mack, and I.F. Charo. 2007. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest*. 117:902-9.
- Ueno, T., M. Toi, H. Saji, M. Muta, H. Bando, K. Kuroi, M. Koike, H. Inadera, and K. Matsushima. 2000. Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer. *Clin Cancer Res*. 6:3282-9.
- Umehara, H., E.T. Bloom, T. Okazaki, Y. Nagano, O. Yoshie, and T. Imai. 2004. Fractalkine in vascular biology: from basic research to clinical disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 24:34-40.
- Vacchelli, E., L. Galluzzi, W.H. Fridman, J. Galon, C. Sautes-Fridman, E. Tartour, and G. Kroemer. 2012. Trial watch: Chemotherapy with immunogenic cell death inducers. *Oncoimmunology*. 1:179-188.
- Vaidehi, N., S. Schlyer, R.J. Trabanino, W.B. Floriano, R. Abrol, S. Sharma, M. Kochanny, S. Koovakat, L. Dunning, M. Liang, J.M. Fox, F.L. de Mendonca, J.E. Pease, W.A. Goddard, 3rd, and R. Horuk. 2006. Predictions of CCR1 chemokine receptor structure and BX 471 antagonist binding followed by experimental validation. *J Biol Chem*. 281:27613-20.
- Valkovic, T., K. Lucin, M. Krstulja, R. Dobi-Babic, and N. Jonjic. 1998. Expression of monocyte chemotactic protein-1 in human invasive ductal breast cancer. *Pathol Res Pract*. 194:335-40.
- van den Broek, M.E., D. Kagi, F. Ossendorp, R. Toes, S. Vamvakas, W.K. Lutz, C.J. Melief, R.M. Zinkernagel, and H. Hengartner. 1996. Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J Exp Med*. 184:1781-90.

- Vandercappellen, J., J. Van Damme, and S. Struyf. 2008. The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. *Cancer Lett.* 267:226-44.
- Varol, C., A. Vallon-Eberhard, E. Elinav, T. Aychek, Y. Shapira, H. Lucche, H.J. Fehling, W.D. Hardt, G. Shakhar, and S. Jung. 2009. Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions. *Immunity.* 31:502-12.
- Veltri, R.W., M.C. Miller, G. Zhao, A. Ng, G.M. Marley, G.L. Wright, Jr., R.L. Vessella, and D. Ralph. 1999. Interleukin-8 serum levels in patients with benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Urology.* 53:139-47.
- Verreck, F.A., T. de Boer, D.M. Langenberg, M.A. Hoeve, M. Kramer, E. Vaisberg, R. Kastelein, A. Kolk, R. de Waal-Malefyt, and T.H. Ottenhoff. 2004. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:4560-5.
- Vesely, M.D., M.H. Kershaw, R.D. Schreiber, and M.J. Smyth. 2011. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol.* 29:235-71.
- Vetter, C.S., V. Groh, P. Thor Straten, T. Spies, E.B. Brocker, and J.C. Becker. 2002. Expression of stress-induced MHC class I related chain molecules on human melanoma. *J Invest Dermatol.* 118:600-5.
- Viaud, S., C. Flament, M. Zoubir, P. Pautier, A. LeCesne, V. Ribrag, J.C. Soria, V. Marty, P. Vielh, C. Robert, N. Chaput, and L. Zitvogel. 2011. Cyclophosphamide induces differentiation of Th17 cells in cancer patients. *Cancer Res.* 71:661-5.
- Vicari, A.P., and C. Caux. 2002. Chemokines in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13:143-54.
- Viola, A., and A.D. Luster. 2008. Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 48:171-97.
- Vivier, E., and N. Anfossi. 2004. Inhibitory NK-cell receptors on T cells: witness of the past, actors of the future. *Nat Rev Immunol.* 4:190-8.
- Wang, D., W. Yang, J. Du, M.N. Devalaraja, P. Liang, K. Matsumoto, K. Tsubakimoto, T. Endo, and A. Richmond. 2000. MGSA/GRO-mediated melanocyte transformation involves induction of Ras expression. *Oncogene.* 19:4647-59.
- Waskow, C., K. Liu, G. Darrasse-Jeze, P. Guernonprez, F. Ginhoux, M. Merad, T. Shengelia, K. Yao, and M. Nussenzweig. 2008. The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues. *Nat Immunol.* 9:676-83.
- Weber, C., K.U. Belge, P. von Hundelshausen, G. Draude, B. Steppich, M. Mack, M. Frankenberger, K.S. Weber, and H.W. Ziegler-Heitbrock. 2000. Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. *J Leukoc Biol.* 67:699-704.
- Weber, K.S., L.B. Klickstein, and C. Weber. 1999. Specific activation of leukocyte beta2 integrins lymphocyte function-associated antigen-1 and Mac-1 by chemokines mediated by distinct pathways via the alpha subunit cytoplasmic domains. *Mol Biol Cell.* 10:861-73.
- Weiner, H.L., and J.A. Cohen. 2002. Treatment of multiple sclerosis with cyclophosphamide: critical review of clinical and immunologic effects. *Mult Scler.* 8:142-54.
- Wells, T.N., C.A. Power, J.P. Shaw, and A.E. Proudfoot. 2006. Chemokine blockers--therapeutics in the making? *Trends Pharmacol Sci.* 27:41-7.
- Whiteside, T.L., and R.B. Herberman. 1994. Role of human natural killer cells in health and disease. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1:125-33.

- Whiteside, T.L., and R.B. Herberman. 1995. The role of natural killer cells in immune surveillance of cancer. *Curr Opin Immunol.* 7:704-10.
- Wiktor-Jedrzejczak, W., and S. Gordon. 1996. Cytokine regulation of the macrophage (M phi) system studied using the colony stimulating factor-1-deficient op/op mouse. *Physiol Rev.* 76:927-47.
- Wilson, J.L., J. Burchell, and M.J. Grimshaw. 2006. Endothelins induce CCR7 expression by breast tumor cells via endothelin receptor A and hypoxia-inducible factor-1. *Cancer Res.* 66:11802-7.
- Witsch, E., M. Sela, and Y. Yarden. 2010. Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology (Bethesda).* 25:85-101.
- Wu, B., E.Y. Chien, C.D. Mol, G. Fenalti, W. Liu, V. Katritch, R. Abagyan, A. Brooun, P. Wells, F.C. Bi, D.J. Hamel, P. Kuhn, T.M. Handel, V. Cherezov, and R.C. Stevens. 2010. Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science.* 330:1066-71.
- Wu, L., W.A. Paxton, N. Kassam, N. Ruffing, J.B. Rottman, N. Sullivan, H. Choe, J. Sodroski, W. Newman, R.A. Koup, and C.R. Mackay. 1997. CCR5 levels and expression pattern correlate with infectability by macrophage-tropic HIV-1, in vitro. *J Exp Med.* 185:1681-91.
- Yang, T.Y., S.C. Chen, M.W. Leach, D. Manfra, B. Homey, M. Wiekowski, L. Sullivan, C.H. Jenh, S.K. Narula, S.W. Chensue, and S.A. Lira. 2000. Transgenic expression of the chemokine receptor encoded by human herpesvirus 8 induces an angioproliferative disease resembling Kaposi's sarcoma. *J Exp Med.* 191:445-54.
- Yokoyama, W.M., and B.F. Plougastel. 2003. Immune functions encoded by the natural killer gene complex. *Nat Rev Immunol.* 3:304-16.
- Yoneda, J., H. Kuniyasu, M.A. Crispens, J.E. Price, C.D. Bucana, and I.J. Fidler. 1998. Expression of angiogenesis-related genes and progression of human ovarian carcinomas in nude mice. *J Natl Cancer Inst.* 90:447-54.
- Yoshie, O., T. Imai, and H. Nomiyama. 2001. Chemokines in immunity. *Adv Immunol.* 78:57-110.
- Yoshimura, T., K. Matsushima, S. Tanaka, E.A. Robinson, E. Appella, J.J. Oppenheim, and E.J. Leonard. 1987. Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84:9233-7.
- Yoshimura, T., E.A. Robinson, S. Tanaka, E. Appella, and E.J. Leonard. 1989a. Purification and amino acid analysis of two human monocyte chemoattractants produced by phytohemagglutinin-stimulated human blood mononuclear leukocytes. *J Immunol.* 142:1956-62.
- Yoshimura, T., N. Yuhki, S.K. Moore, E. Appella, M.I. Lerman, and E.J. Leonard. 1989b. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE. *FEBS Lett.* 244:487-93.
- Yu, P., Y. Lee, W. Liu, T. Krausz, A. Chong, H. Schreiber, and Y.X. Fu. 2005. Intratumor depletion of CD4+ cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumors. *J Exp Med.* 201:779-91.
- Zeelenberg, I.S., M. Ostrowski, S. Krumeich, A. Bobrie, C. Jancic, A. Boissonnas, A. Delcayre, J.B. Le Pecq, B. Combadiere, S. Amigorena, and C. Thery. 2008. Targeting tumor

- antigens to secreted membrane vesicles in vivo induces efficient antitumor immune responses. *Cancer Res.* 68:1228-35.
- Zhang, L., J.R. Conejo-Garcia, D. Katsaros, P.A. Gimotty, M. Massobrio, G. Regnani, A. Makrigiannakis, H. Gray, K. Schlienger, M.N. Liebman, S.C. Rubin, and G. Coukos. 2003. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med.* 348:203-13.
- Zhou, Y., P.H. Larsen, C. Hao, and V.W. Yong. 2002. CXCR4 is a major chemokine receptor on glioma cells and mediates their survival. *J Biol Chem.* 277:49481-7.
- Zhu, Y.M., and P.J. Woll. 2005. Mitogenic effects of interleukin-8/CXCL8 on cancer cells. *Future Oncol.* 1:699-704.
- Ziegler-Heitbrock, H.W. 2000. Definition of human blood monocytes. *J Leukoc Biol.* 67:603-6.
- Ziegler-Heitbrock, H.W., M. Stobel, D. Kieper, G. Fingerle, T. Schlunck, I. Petersmann, J. Ellwart, M. Blumenstein, and J.G. Haas. 1992. Differential expression of cytokines in human blood monocyte subpopulations. *Blood.* 79:503-11.
- Zipin-Roitman, A., T. Meshel, O. Sagi-Assif, B. Shalmon, C. Avivi, R.M. Pfeffer, I.P. Witz, and A. Ben-Baruch. 2007. CXCL10 promotes invasion-related properties in human colorectal carcinoma cells. *Cancer Res.* 67:3396-405.
- Zitvogel, L., L. Apetoh, F. Ghiringhelli, and G. Kroemer. 2008. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol.* 8:59-73.
- Zlotnik, A., and O. Yoshie. 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity.* 12:121-7.
- Zou, W. 2005. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer.* 5:263-74.
- Zou, W. 2006. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 6:295-307.
- Zou, Y.R., A.H. Kottmann, M. Kuroda, I. Taniuchi, and D.R. Littman. 1998. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature.* 393:595-9.