



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Philippe Gui

le lundi 1 décembre 2014

Titre :

Caractérisation de la migration trans-tissulaire des macrophages

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Biologie cellulaire

Unité de recherche :

Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale / CNRS UMR5089

Directeur(s) de Thèse :

Dr. Véronique LE CABEC

Jury :

Dr. Emmanuel DONNADIEU, Directeur de recherche, CNRS, Paris

Pr. Jo VAN GINDERACHTER, Professeur des Universités, Bruxelles

Pr. Catherine SOULA, Professeur des Universités, Toulouse

Dr. Véronique LE CABEC, Chargée de recherche, CNRS, Toulouse

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier l'ensemble des membres de mon jury de soutenance pour l'intérêt qu'ils ont porté à ces travaux. Je remercie le Dr Emmanuel Donnadiou et le Pr Jo Van Ginderachter d'avoir accepté d'examiner mon manuscrit et je les remercie de s'être déplacés à l'occasion de ma soutenance. Je remercie également le Dr Jean-Marc Barret d'être venu assister à ma soutenance et le Pr Cathy Soula d'avoir présidé ce jury.

Je remercie Isabelle de m'avoir accueilli dans son laboratoire, ainsi que pour ses conseils et sa disponibilité. Un grand merci à toute l'équipe pour leur bonne humeur et leurs nombreuses aides au cours de ces trois années, ce qui a permis de créer une ambiance idéale de travail ! Merci donc à Amsha, Anaïs, Anna, Annie, Arnaud, Bibi, Céline, Christel, Claire, Karine, Renaud et Shanti... je ne pouvais pas demander de meilleurs collègues/tortues ninjas !

Je réserve bien sûr un merci tout particulier à Véro. Merci de m'avoir ouvert cette première porte vers le monde de la recherche. Merci de m'avoir permis d'apprendre. Merci de m'avoir fait confiance tout au long de notre collaboration que j'ai beaucoup appréciée et dont je suis très fier. Merci d'avoir toujours été présente même si ces trois dernières années n'ont pas toujours été faciles. Ne lâche rien et je suis convaincu que dans peu de temps tu seras une pro des souris !

Je remercie ceux et celles que j'ai rencontrés à l'IPBS avec qui j'ai souvent passé de très bons moments dans et en dehors du labo : Alan, Ania, Antonio, Elisabeth, GC, Joanna, Kanjana, Sandro, Uta...

Je remercie les gens avec qui j'ai eu le plaisir de travailler par le biais de collaborations ou à travers les plateformes pendant ces trois années : Elisabeth Bellard, Muriel Golzio, Talal Al Saati, Florence Capilla, Pascal Swider, Sébastien Libert, Sophie Allart et Arnaud Besson.

Je remercie le Pr Pierre-Emmanuel Gleizes et le Pr Eric Espinosa d'avoir accepté et pris le temps de faire partie de mon comité de thèse.

Je remercie également le personnel administratif de l'IPBS et de l'université Paul Sabatier. Merci notamment à Mme Catherine Stasiulis pour toute l'aide qu'elle a apportée par rapport à mon droit de séjour en France.

Pour finir, un très grand merci mes proches. Ma famille qui n'a pas toujours compris dans quoi je m'étais embarqué : Maman, Papa, Patrick et Sarah, ainsi que mes deux grand-mères. Vous me manquez tous les jours et peu importe ma prochaine destination j'espère pouvoir vous rendre visite plus souvent. Merci à mon cousin Boris qui a toujours été là pour moi et qui ne cesse de me surprendre par sa générosité. Je remercie également ma deuxième famille qui m'a chaleureusement accueilli parmi eux dès mon arrivée en France et qui a fait de ce pays ma seconde maison (même si techniquement il s'agit de ma troisième !) : Daniel, Gilda, Christophe, Anne-Françoise, Stéphane, Laure, Sylvie, Marinette et les loulous.

Je vais terminer en remerciant celle qui a fait toute cette aventure avec moi. Après toutes répétitions que nous avons fait ensemble depuis la M1 jusqu'à la soutenance, je pense que tu mérites cette thèse autant que moi ! Merci Karine pour ton soutien constant, surtout pendant ces trois dernières années, et d'être tous les jours une source de réconfort. La fin de cette thèse annonce une nouvelle étape à la fois pour toi et pour moi, et j'ai hâte de découvrir ce qui nous attend !

Merci à tous !

Philippe (Phiphi)

Table des matières

Résumé	7
Abstract	9
Liste des abréviations.....	11
Liste des tableaux	13
Liste des figures	14
Introduction bibliographique.....	17
Chapitre 1 Le rôle des macrophages dans la réponse immunitaire	19
1 Les monocytes/macrophages.....	20
1.1 L'hétérogénéité des monocytes	23
1.2 Les macrophages tissulaires résidents	26
1.2.1 Leur caractérisation et leurs fonctions	26
1.2.2 Leur ontogenèse	28
1.2.3 Leur homéostasie.....	30
1.3 L'activation et la polarisation des macrophages	31
2 L'inflammation et la réponse des macrophages	34
2.1 Phase I : la détection de la perturbation par les macrophages résidents	34
2.2 Phase II : le recrutement des monocytes	35
2.2.1 Le roulement et l'adhérence	38
2.2.2 La diapédèse	40
2.2.3 La migration trans-tissulaire.....	41
2.3 Phase III : l'élimination de l'élément perturbateur et la résolution de l'inflammation.....	41
Chapitre 2 Le rôle des macrophages dans le développement de pathologies	47

1 Le rôle des macrophages dans les maladies inflammatoires, auto-immunes et infectieuses	47
1.1 Les maladies inflammatoires et auto-immunes	48
1.1.1 L'athérosclérose	48
1.1.2 L'obésité.....	49
1.1.3 L'asthme allergique.....	50
1.1.4 Les maladies auto-immunes	50
1.2 Les maladies infectieuses	52
1.2.1 Le SIDA	52
1.2.2 La tuberculose	52
2 Le rôle des macrophages dans le cancer	54
2.1 Les liens entre cancer et inflammation.....	54
2.2 Les macrophages associés aux tumeurs (TAMs)	55
2.2.1 Les macrophages et le cancer.....	55
2.2.2 Les origines des TAMs	59
2.2.3 Les fonctions des TAMs	61
2.3 Les thérapies ciblant les TAMs.....	64
2.3.1 La déplétion des monocytes/macrophages.....	65
2.3.2 Le ciblage d'antigènes de surface spécifiques des TAMs.....	66
2.3.3 La reprogrammation thérapeutique des TAMs	67
2.3.4 La stimulation de la phagocytose	68
2.3.5 Le ciblage du recrutement des monocytes	68
Chapitre 3 Les mécanismes moléculaires et cellulaires de la migration	71
1 La migration cellulaire en 2D.....	72
1.1 La polarisation cellulaire	73
1.2 La protrusion et la polymérisation de l'actine.....	74
1.3 L'adhérence et les intégrines.....	77
1.4 La translocation du corps cellulaire et la rétraction de l'arrière.....	80

2 La migration cellulaire en 3D ou trans-tissulaire	82
2.1 Les modèles d'étude en 3D	82
2.1.1 Le modèle d'invasion avec <i>Transwell</i>	83
2.1.2 Le modèle de sphéroïdes multicellulaires	85
2.1.3 Les explants tissulaires <i>ex vivo</i>	85
2.1.4 La microscopie intravitale	86
2.2 Les modes de migration 3D	87
2.2.1 La migration mésenchymateuse	87
2.2.2 La migration amiboïde	91
2.2.3 Les transitions entre la migration mésenchymateuse et amiboïde	93
2.2.4 La migration collective.....	93
2.3 L'influence de la matrice extracellulaire sur la migration 3D cellulaire.....	95
2.3.1 La matrice extracellulaire.....	96
2.3.2 La densité et la porosité.....	97
2.3.3 La rigidité	98
2.3.4 L'architecture et l'orientation.....	98
2.3.5 La composition.....	99
2.3.6 Les modifications pathologiques de la matrice extracellulaire	100
2.4 La migration 3D <i>in vitro</i> des macrophages	101
2.4.1 Les modes migratoires utilisés par les macrophages	102
2.4.2 Les capacités migratoires selon la polarisation des macrophages.....	104
2.4.3 Les podosomes	105
Bilan bibliographique et projets de thèse.....	111
Résultats	113
Chapitre 1 Identification de p27^{kip1} comme nouvel effecteur de la migration mésenchymateuse des macrophages	115
1 Introduction	115
2 Résultats	117

3 Discussion et perspectives.....	119
Chapitre 2 Caractérisation de la migration trans-tissulaire des macrophages.....	125
1 Introduction	125
2 Résultats	127
3 Discussion et perspectives.....	129
Chapitre 3 Résultats supplémentaires.....	139
1 Observation de migration orientée par microscopie intravitale	139
2 Mesures de la perméabilité des explants tissulaires	144
Discussion générale et perspectives	151
Références	159

Résumé

Caractérisation de la migration trans-tissulaire des macrophages

A lors que l'infiltration de lymphocytes dans les tumeurs est associée à un pronostic favorable, celle des macrophages participe à la croissance tumorale, l'angiogenèse et la formation de métastases. Le contrôle spécifique de leur migration tissulaire représente donc un enjeu thérapeutique important.

Ma thèse a consisté à mieux comprendre les mécanismes impliqués dans cette migration. Des travaux antérieurs de l'équipe ont démontré que, *in vitro*, parmi les leucocytes, les macrophages ont la particularité de pouvoir adopter deux modes migratoires distincts en 3D selon les propriétés de la matrice extracellulaire (MEC) : ils utilisent la migration amiboïde pour infiltrer des MEC poreuses (pores de diamètre $> 1\mu\text{m}$) et la migration mésenchymateuse pour migrer à travers les MEC denses (pores de diamètre $< 1\mu\text{m}$) (Van Goethem, Poincloux, Gauffre, Maridonneau-Parini, & Le Cabec, 2010).

Au cours de ma thèse, j'ai montré *in vitro* que l'inhibition de la voie Rho/ROCK par l'inhibiteur de kinase cycline-dépendante $p27^{\text{kip1}}$ participe à l'activation de la migration mésenchymateuse des macrophages dans les MEC denses. Ce travail est publié dans the Journal of Cell Science (Gui et al., 2014). L'objectif principal de ma thèse a toutefois été de montrer l'existence de la migration mésenchymateuse des macrophages au cours de la migration trans-tissulaire *in vivo*. Pour cela, j'ai choisi un modèle de tumeur, tissu dense largement infiltré par les macrophages. Ces tumeurs ont été induites dans des chambres dorsales installées sur des souris dont les macrophages sont fluorescents, les souris MacBlue provenant du laboratoire de David Hume (Ovchinnikov et al., 2008). Grâce à une approche de microscopie intravitale, je montre que, comme dans les MEC *in vitro*, les macrophages adoptent *in vivo* un mode de migration distinct selon le tissu observé. Dans un fibrosarcome, ils adoptent un comportement caractéristique de la migration mésenchymateuse (morphologie

allongée et protrusive des cellules et migration dépendante de l'activité des protéases), tandis que dans le derme sain adjacent, ils adoptent une migration de type amiboïde (morphologie arrondie des cellules et migration indépendante de l'activité des protéases). De plus, j'ai développé une approche d'explants tissulaires *ex vivo*. J'ai d'abord déterminé un protocole garantissant la survie des explants de tumeur pendant la durée des expériences de co-culture avec des macrophages différenciés *in vitro*. Les premières expériences sur des coupes de fibrosarcomes confirment que les macrophages utilisent une migration répondant aux caractéristiques du mode mésenchymateux.

En conclusion, mes travaux ont permis d'avancer dans la connaissance de la migration trans-tissulaire des macrophages et démontrent pour la première fois que les macrophages utilisent la migration mésenchymateuse *in vivo*, en particulier dans les tumeurs. En montrant que ce mode migratoire est pertinent dans cette pathologie, il pourra devenir une cible thérapeutique prometteuse.

Abstract

Characterization of the trans-tissular migration of macrophages

While lymphocyte infiltration inside tumors is associated with a favorable prognosis, macrophage infiltration participates in tumor growth, angiogenesis and metastatic formation. Therefore, the specific control of their tissue migration represents an important therapeutic challenge.

The objective of my thesis has been to better understand the mechanisms involved in this migration. The team's previous work showed that, *in vitro*, amongst leukocytes, macrophages are unique in that they are able to adopt two distinct migration modes in 3D, depending on the properties of the extracellular matrix (ECM): they use the amoeboid migration in order to infiltrate porous ECMs (pore diameter > 1 μm) and the mesenchymal migration to migrate through dense ECMs (pore diameter < 1 μm) (Van Goethem, Poincloux, Gauffre, Maridonneau-Parini, & Le Cabec, 2010).

During my thesis, I showed *in vitro* that inhibition of the Rho/ROCK pathway by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{kip1} participates in the activation of the mesenchymal migration of macrophages inside dense ECMs. This study has been published in the Journal of Cell Science (Gui et al., 2014). However, the main objective of my doctorate has been to show the existence of the mesenchymal migration of macrophages in the course of their trans-tissular migration *in vivo*. To achieve this, I chose a tumor model due to it being a dense tissue highly infiltrated by macrophages. These tumors were induced inside dorsal window chambers surgically implanted onto mice expressing fluorescent macrophages: MacBlue mice from the laboratory of D. Hume (Ovchinnikov et al., 2008). Using an intravital microscopy approach, I was able to show that, similarly to *in vitro* ECMs, macrophages adopt a distinct migration mode *in vivo* depending on the observed tissue. In a fibrosarcoma, they adopt a migration which is characteristic of the mesenchymal migration (elongated cell morphology

and protease-dependent migration), whereas in the healthy neighboring derma, they adopt an amoeboid-like migration (round cell morphology and protease-independent migration). Moreover, I developed an *ex vivo* approach using tumor explants. I first determined the protocol ensuring survival of the tumor explants throughout the course of co-culture experiments with *in vitro* differentiated macrophages. Experiments conducted with fibrosarcoma slices confirm that macrophages employ a migration with the characteristics of the mesenchymal mode.

In conclusion, my work has enabled us to further our knowledge of the trans-tissular migration of macrophages and shows for the very first time that macrophages use the mesenchymal migration *in vivo*, particularly in tumors. By showing that this migration mode is relevant in this pathology, it could become a promising therapeutic target.

Liste des abréviations

ATM	adipose tissue macrophage
TNF-α	tumor necrosis factor α
2D	deux dimensions
3D	trois dimensions
CD	cluster of differentiation
Cdc42	cell division control protein 42
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
DAMP	damage-associated molecular pattern
EGF	epithelial growth factor
EMAPII	endothelial monocyte-activating polypeptide II
EMR1	EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1
FAK	focal adhesion kinase
Flt3	fms-like tyrosine kinase 3
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GPI	glycosylphosphatidylinositol
Hck	Hematopoietic cell kinase
HIF	hypoxia-inducible factor
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell
ICAM1	intercellular adhesion molecule 1
IFN-γ	interféron- γ
IL	interleukine
iNOS	inducible nitric oxide synthase
LDL	lipoprotéines de basse densité
LER	low-expression region
LFA1	lymphocyte function-associated antigen 1
LLC	Lewis lung carcinoma
LPS	lipopolysaccharide
MAC1	macrophage receptor 1
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
micro-CT	micro computer tomography
MLC	myosin light-chain
MLC2	myosin II light-chain
MLCP	myosin light-chain phosphatase
MMP	métallo-protéases matricielles
MRCK	myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase
Mtb	Mycobacterium tuberculosis
MT-MMP	membrane-type-MMP

NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK	natural killers
NO	oxyde nitrique
PAK	p21 activated kinase
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PAPA	pyogenic sterile arthritis, pyoderma gangrenosum, and acne
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PDGF	platelet-derived growth factor
PG	prostaglandine
PKB	protein kinase B
PNAd	peripheral node addressin
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand 1
PyMT	polyoma middle T
RCPG	récepteurs couplés aux protéines G
ROCK	Rho-kinase
ROS	reactive oxygen species
sdAb	single domain antibody
SIDA	syndrome d'immunodéficience acquise
SIRPα	signal regulatory protein α
SPM	système des phagocytes mononucléés
STAT1	signal transducers and activators of transcription 1
TAM	tumor associated-macrophage
TEM	Tie2-expressing macrophage
TGF-β1	transforming growth factor- β 1
TLR	Toll-like receptor
TOCA	transducer of Cdc42-dependent actin assembly
Treg	cellule T régulatrice
VAP-1	vascular adhesion protein 1
VCAM1	vascular cell adhesion molecule 1
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFA	vascular endothelial growth factor A
VIH-1	virus de l'immunodéficience humaine
VLA4	very late antigen 4
WASP	Wiskott–Aldrich syndrome protein
WAVE	WASP-family verprolin-homologous protein
WIP	WASP interacting protein

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les grandes sous-populations de monocytes murins et humains	23
Tableau 2 : Les molécules impliquées dans le recrutement des monocytes et neutrophiles	37
Tableau 3 : Liens entre cancer et inflammation.....	55
Tableau 4 : Corrélation entre pronostic et un nombre élevé de macrophages dans les cancers	56
Tableau 5 : Les récepteurs intégrines et leurs ligands	80

Liste des figures

Figure 1 : L'hématopoïèse	20
Figure 2 : Le développement des cellules du système des phagocytes mononucléés	22
Figure 3 : L'hétérogénéité des monocytes murins.....	24
Figure 4 : Les macrophages tissulaires résidents et leurs fonctions	28
Figure 5 : Le développement embryonnaire des macrophages.....	30
Figure 6 : La polarisation M1/M2 des macrophages	32
Figure 7 : Le spectre de la polarisation des macrophages	33
Figure 8 : Les différentes étapes du recrutement des leucocytes.....	38
Figure 9 : Le recrutement des macrophages et des neutrophiles au cours de l'inflammation ..	39
Figure 10 : La réponse inflammatoire et la réparation tissulaire des macrophages	42
Figure 11 : Les étapes de la phagocytose.....	43
Figure 12 : Les macrophages au cours du développement de l'athérosclérose	49
Figure 13 : Les macrophages au cours d'une infection avec <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	53
Figure 14 : La polarisation des macrophages pendant la progression tumorale	59
Figure 15 : Les fonctions des macrophages associés aux tumeurs	61
Figure 16 : Les stratégies anti-cancéreuses ciblant les macrophages	65
Figure 17 : Les différentes étapes de la migration 2D	73
Figure 18 : La polarisation au cours de la migration cellulaire	74
Figure 19 : La formation du lamellipode et des filopodes et la polymérisation de l'actine.....	76
Figure 20 : Les adhérences et les intégrines	78
Figure 21 : La rétractation de l'arrière au cours de la migration cellulaire	81

Figure 22 : Une comparaison des modèles 3D et des techniques de microscopie optique en relation avec leur pertinence	83
Figure 23 : Les modèles de migration 3D <i>in vitro</i>	84
Figure 24 : Les modes de migration 3D mésenchymateux et amiboïde	88
Figure 25 : Les modes de protéolyse 3D dans les tissus	91
Figure 26 : Les migrations individuelle et collective.....	94
Figure 27 : Les différentes structures <i>in vivo</i> de la matrice extracellulaire et les facteurs modulant le choix du mode migratoire dans les tissus.....	97
Figure 28 : La migration 3D <i>in vitro</i> des macrophages	103
Figure 29 : La formation des invadosomes et la structure des podosomes.....	107
Figure 30 : Les podosomes 2D et 3D des macrophages	108
Figure 31 : Protocol expérimental des analyses de transcriptomique des macrophages au cours de la migration 2D et 3D	122
Figure 32 : Régulation de l'expression des gènes au cours de la migration 2D et 3D	123
Figure 33 : Migration des macrophages le long des fibres de collagène	141
Figure 34 : Migration des macrophages le long des vaisseaux sanguins.....	142
Figure 35 : Migration d'un macrophage le long d'une cellule tumorale	144
Figure 36 : La loi de Darcy et le dispositif expérimental de mesure de perméabilité	146
Figure 37 : Résultats expérimentaux de mesure de perméabilité de la tumeur LLC	148
Figure 38 : Résultats expérimentaux de mesure de perméabilité du Matrigel™, du collagène gélatineux et de la tumeur LLC.....	149

Introduction bibliographique

Chapitre 1

Le rôle des macrophages dans la réponse immunitaire

Les globules blancs ou leucocytes forment un groupe très diversifié de types cellulaires dont la fonction est de mettre en place la réponse immunitaire. Ces cellules circulent dans le sang et le système lymphatique et sont recrutées vers les sites de dommages tissulaires et d'infection. Bien que les différentes sous-populations de leucocytes possèdent chacune des caractéristiques fonctionnelles et physiques spécifiques, elles peuvent partager dans certains cas une origine commune que sont les cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse, des cellules pluripotentes qui, par le processus de l'hématopoïèse, se différencient en leucocytes ([figure 1](#)). Parmi les leucocytes on distingue deux grandes lignées : la lignée lymphoïde, comprenant les lymphocytes B, lymphocytes T, cellules NK (*Natural Killers*) et les lymphocytes T-NK ; et la lignée myéloïde, à l'origine de monocytes, macrophages, cellules dendritiques, neutrophiles, basophiles, éosinophiles, mastocytes, mégacaryocytes, érythrocytes.

Les macrophages sont au cœur de mes travaux de thèse. Ce sont des cellules extrêmement hétérogènes à la fois du point de vue de leurs origines et de leurs fonctions. En effet, pouvant avoir des origines hématopoïétiques mais également des origines embryonnaires comme découvert récemment, ce sont des cellules clés de la réponse immunitaire innée de la réaction inflammatoire, de la surveillance de l'organisme, de la réparation tissulaire et de l'activation de la réponse immunitaire adaptative. Au-delà de ces fonctions bénéfiques, ils ont également été impliqués dans de nombreuses pathologies dans

lesquelles ils jouent un rôle délétère, ce qui en fait une cible thérapeutique d'intérêt. Dans cette introduction bibliographique, je vais tenter de faire le point sur « le macrophage », décrire comment une seule et même cellule peut remplir tant de fonctions aussi diverses, et expliquer en quoi il est important de mieux comprendre la migration tissulaire des macrophages pour mieux la contrôler.

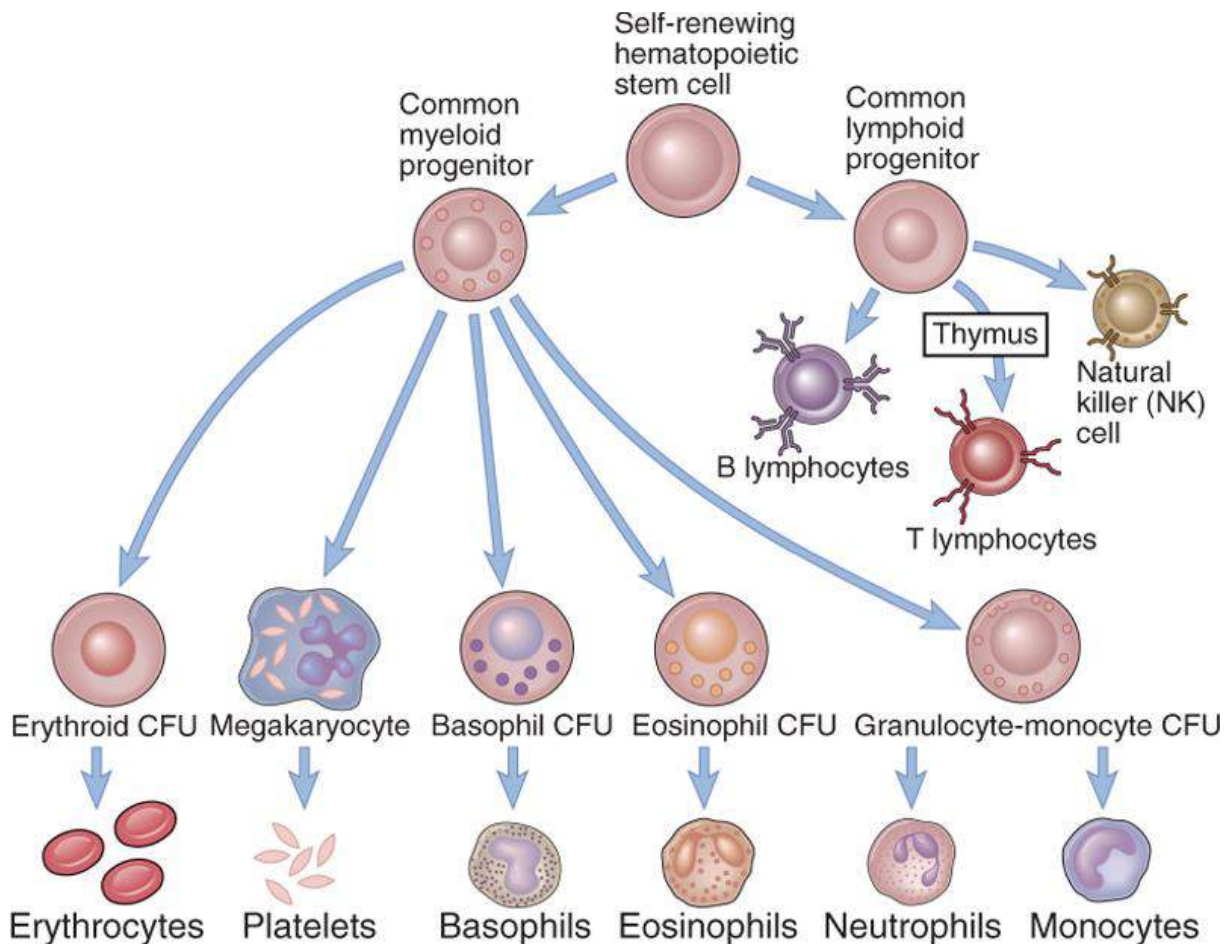


Figure 1 : L'hématopoïèse (extrait de Abbas et al. Cellular and Molecular Immunology 6^e)

1 Les monocytes/macrophages

Les macrophages, identifiés par Elie Metchnikoff en 1882 grâce à leur activité phagocytaire, sont des cellules essentielles de l'immunité innée qui jouent un rôle central au cours de l'inflammation et la défense de l'hôte. Ils sont présents dans tous les tissus, où ils présentent une grande diversité à la fois anatomique et fonctionnelle, ainsi que dans la circulation sanguine sous forme de précurseurs : les monocytes. Ceux-ci composent 4 à 10%

des leucocytes et environ 20% de la fraction de cellules mononuclées du sang périphérique (*peripheral blood mononuclear cell* ou PBMC).

Les macrophages ont longtemps été considérés comme une population cellulaire homogène, mais on s'aperçoit qu'il n'est plus possible de parler du macrophage en général. Ils furent originellement classés dans le système réticuloendothélial comprenant les cellules phagocytaires et les cellules endothéliales puisqu'il était proposé qu'elles prenaient toutes leurs origines dans un tissu commun. Toutefois, l'émergence d'études mettant en évidence les différences morphologiques et fonctionnelles entre les macrophages et les cellules endothéliales a finalement mené à l'abandon de cette classification, et il a fallu attendre les années 1960 pour enfin déterminer avec certitude que les macrophages inflammatoires et tissulaires provenaient de monocytes circulants, eux-mêmes provenant en grande majorité de progéniteurs de la moelle osseuse. Le concept de système des phagocytes mononuclées (SPM) fut ainsi promu par van Furth, Cohn et collègues vers la fin de la décennie (**figure 2**). La définition de ce système englobait une famille de cellules qui comprenait les précurseurs de la moelle osseuse, les monocytes sanguins circulants et les macrophages tissulaires présents dans tous les organes du corps. Les cellules engagées dans la lignée mononuclée phagocytaire progressent à travers une série d'étapes de différenciation cellulaire bien définies et morphologiquement distinctes les unes des autres. Un progéniteur myéloïde commun, obtenu à partir d'une cellule souche hématopoïétique, se différencie d'abord en monoblaste, puis en promonocyte. Lors de la dernière étape de différenciation, celui-ci va évoluer en monocyte, capable de quitter la moelle osseuse, d'entrer dans la circulation sanguine et de migrer vers les tissus (Hume, 2000).

La production de phagocytes mononuclées à partir de cellules progénitrices est dirigée par des facteurs de stimulation de colonies, le plus souvent spécifiques à une lignée cellulaire. Parmi ces facteurs, le *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF ou CSF-1), le *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) et le *fms-like tyrosine kinase 3 ligand* (Flt3-ligand) sont les mieux connus. Ces facteurs de croissance indiquent au progéniteur myéloïde commun de s'engager dans la voie de différenciation qui mène au macrophage (Stanley, 2009). Des mutations spontanées dans le gène *Csf1* ont mis en évidence que le M-CSF était indispensable pour la production d'un nombre important de sous-populations de macrophages tissulaires chez la souris (mutant *op/op*) et le rat (mutant *tl/tl*), et soulignent également l'importance des macrophages tissulaires dans plusieurs aspects du

développement (J. W. Pollard, 2009). A l'opposé, une injection de M-CSF dans la souris a pour effet d'accroître les populations de monocytes sanguins et de macrophages tissulaires.

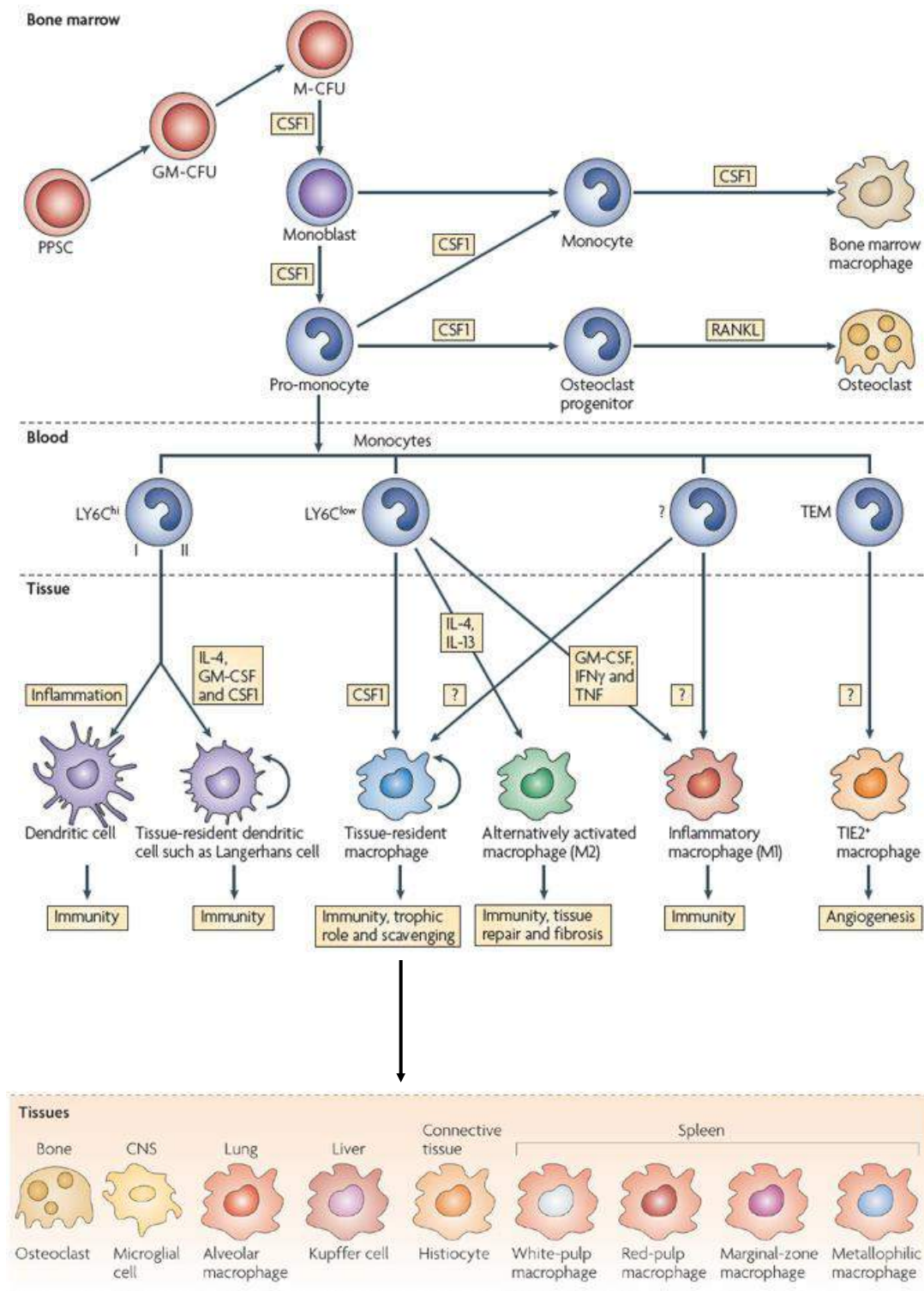


Figure 2 : Le développement des cellules du système des phagocytes mononucléés (adapté de Pollard, 2009 et Mosser and Edwards, 2008)

Cependant, il a récemment été démontré que la description historique des macrophages résidents adultes comme provenant uniquement de monocytes issus de la moelle osseuse s'avère être fautive. En effet, contrairement aux macrophages impliqués dans les réponses inflammatoires et dérivés de ces monocytes circulants, certains macrophages résidents tissulaires possèdent en fait une origine embryonnaire puisqu'ils sont issus de progéniteurs du sac vitellin, précédant ainsi les progéniteurs hématopoïétiques. Cette découverte, ainsi que celle de la capacité de prolifération de certains macrophages tissulaires (Parwaresch & Wacker, 1984; Sawyer, Strausbauch, & Volkman, 1982), ont contribué à remettre en question le SPM (voir les paragraphes 1.2.2 et 1.2.3).

1.1 L'hétérogénéité des monocytes

Une des pistes pour expliquer la grande diversité fonctionnelle de la lignée monocytes/macrophages est leur hétérogénéité et leur formidable plasticité. Une fois différenciés et sortis de la moelle osseuse, les monocytes circulent dans le sang périphérique pendant plusieurs jours avant d'entrer dans les tissus et régénérer les populations de macrophages tissulaires. Ils représentent toutefois une population cellulaire hétérogène et ont été subdivisés en sous-populations selon l'expression de récepteurs aux chimiokines et de molécules de surface (tableau 1).

Subset	Markers	Chemokine receptors	Functions
<i>Mouse</i>			
LY6C ^{hi}	CD11b ⁺ CD115 ⁺ LY6C ^{hi}	CCR2 ^{hi} CX ₃ CR1 ^{low}	Pro-inflammatory ⁷ and antimicrobial ³ roles
LY6C ^{low}	CD11b ⁺ CD115 ⁺ LY6C ^{low}	CX ₃ CR1 ^{hi} CCR2 ^{low}	Patrolling ¹¹ ; early responses ¹¹ ; tissue repair ^{12b}
<i>Human</i>			
Classical	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻	CCR2 ^{hi} CX ₃ CR1 ^{low}	Resemble LY6C ^{hi} monocytes based on gene-expression arrays ^{7,17,140}
Intermediate	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺	CX ₃ CR1 ^{hi} CCR2 ^{low}	Pro-inflammatory roles ^{12,15}
Non-classical	CD14 ⁺ CD16 ⁺⁺	CX ₃ CR1 ^{hi} CCR2 ^{low}	Patrolling ¹⁴ ; antiviral roles ¹⁴

CCR2, CC-chemokine receptor 2; CX₃CR1, CX₃C-chemokine receptor 1.

Tableau 1 : Les grandes sous-populations de monocytes murins et humains (extrait de Shi and Pamer, 2011)

Chez la souris, l'expression de Ly6C (aussi appelé Gr1) et de CD11b désigne un type de monocyte qui exprime fortement le récepteur CC-chemokine 2 (CCR2) mais de faibles niveaux de CX3CR1. Ces monocytes, souvent appelés monocytes « pro-inflammatoires » ou Ly6C^{hi}/CX3CR1^{low}, représentent environ 2 à 5% des leucocytes circulants chez une souris non-infectée et sont les plus aptes à être recrutés rapidement vers les sites d'infection et

d'inflammation (Serbina, Jia, Hohl, & Pamer, 2008). Une déficience pour CCR2 a pour effet une diminution nette du recrutement de monocytes Ly6C^{hi} vers les sites d'inflammation, témoignant du rôle décisif de ce récepteur aux chimiokines dans la réponse immunitaire des monocytes (Kurihara, Warr, Loy, & Bravo, 1997; Kuziel et al., 1997) (figure 3).

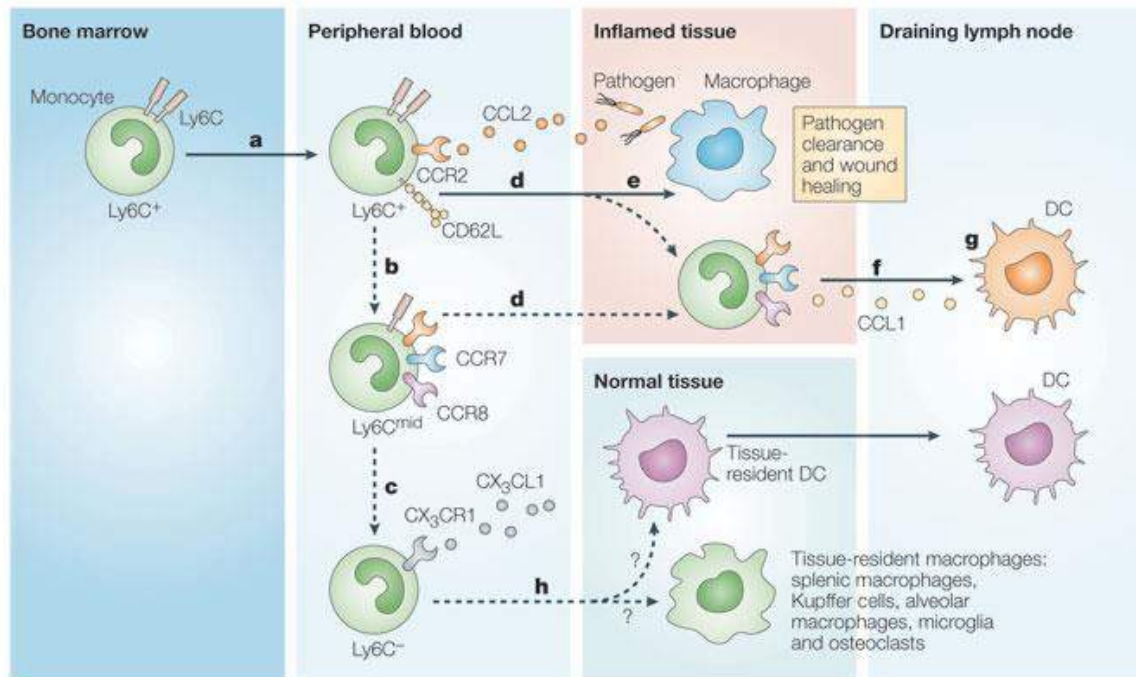


Figure 3 : L'hétérogénéité des monocytes murins (extrait de Gordon and Taylor, 2005)

Une deuxième sous-population majeure de monocytes circulant chez la souris exprime fortement CX₃CR1 mais faiblement CCR2 et Ly6C (Geissmann, Jung, & Littman, 2003; Palframan et al., 2001). Dans la circulation sanguine, ces monocytes Ly6C^{low} (aussi appelés monocytes CX₃CR1^{hi} et monocytes « résidents ») sont moins abondants que les monocytes Ly6C^{hi} et des études de microscopie intravitale montrent qu'ils adhèrent et migrent le long de la surface lumineuse des cellules endothéliales présentes sur les vaisseaux sanguins au cours d'un processus de « patrouillage » (Auffray et al., 2007). En réponse à un challenge microbien ou autre, ils sont capables de quitter la circulation rapidement pour intervenir.

Des études ont montré qu'au cours de la régénération des réservoirs de monocytes sanguins suite à une administration toxique de liposomes, la population Ly6C^{hi} est la première à réapparaître, suivie de la population Ly6C^{low} , ce qui a mené à l'hypothèse que ces deux populations pourraient en fait représenter une séquence de différenciation. Une observation

clé fut réalisée grâce à des expériences de transfert adoptif (Geissmann et al., 2003), au cours desquelles des monocytes $\text{Ly6C}^{\text{hi}}/\text{CX3CR1}^{\text{low}}$ marqués par fluorescence furent transférés et sélectivement recrutés vers la cavité péritonéale sous forme d'exsudat au cours d'une inflammation induite par injection de thioglycollate. Il a été observé que les cellules Ly6C^{hi} immatures ont une demi-vie très courte et peuvent être déplétées de façon sélective sans perte de la population Ly6C^{low} , capable de persister beaucoup plus longtemps après transfert adoptif. En effet, il était possible de retrouver des cellules transférées dans le sang, la rate, les poumons, le foie et le cerveau des souris receveuses plusieurs jours après le transfert. Ainsi, alors qu'il est capable de se différencier, un monocyte « immature » Ly6C^{hi} inflammatoire pourrait devoir quitter la circulation avant d'avoir l'opportunité de devenir un monocyte de type « mature » ou « résident » Ly6C^{low} (Geissmann et al., 2010).

La distinction entre « résident » *versus* « inflammatoire » doit aussi prendre en compte le fait que les sous-populations de monocytes pourraient avoir différentes dispositions à donner certaines populations résidentes du SPM, en particulier dans des surfaces muqueuses telles que les poumons et l'intestin. Une certitude est que les monocytes sanguins sont hétérogènes en termes d'expression de molécules clés, récepteurs aux chimiokines et molécules d'adhérence cellulaire qui détermineront exactement leur réponse à des stimuli au cours du recrutement tissulaire. Ce qui reste encore à déterminer est jusqu'où les monocytes peuvent être subdivisés en termes de leurs fonctions effectrices et leurs devenir, et si des populations distinctes sont recrutées par des stimuli distincts et vers des sites distincts, ou si un pool commun peut intervenir quelle que soit la perturbation et se différencier spécifiquement en fonction de celle-ci.

Chez l'Homme, les monocytes sont divisés en sous-populations selon leur expression des marqueurs de surface CD14 et CD16 (aussi appelé $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$) (Ziegler-Heitbrock, 2007). Les monocytes $\text{CD14}^{++} \text{CD16}^{-}$, aussi appelés monocytes classiques (Ziegler-Heitbrock et al., 2010), représentent la sous-population la plus abondante dans le sang humain et, tout comme les monocytes Ly6C^{hi} murins, expriment CCR2 et sont impliqués dans les réponses inflammatoires (Geissmann et al., 2003). La population de monocytes CD16^{+} comprend deux sous-populations, les monocytes $\text{CD14}^{+} \text{CD16}^{++}$ et $\text{CD14}^{++} \text{CD16}^{+}$, appelés monocytes non-classiques et intermédiaires respectivement (Ziegler-Heitbrock et al., 2010). La sous-population $\text{CD14}^{+} \text{CD16}^{++}$ est équivalente à la population de monocytes murins Ly6C^{low} murins en termes de patrouillage *in vivo* (Cros et al., 2010). Bien qu'on ne puisse pas

exactement superposer les sous-populations de monocytes identifiées chez l'Homme et celles identifiées chez la souris, leur différenciation et leur contribution à la défense immunitaire paraissent similaires (Belge et al., 2002; Grage-Griebenow, Flad, & Ernst, 2001; Ingersoll et al., 2010).

1.2 Les macrophages tissulaires résidents

1.2.1 Leur caractérisation et leurs fonctions

Jusqu'aux années 1980, les macrophages résidents des tissus, généralement appelés des histiocytes, furent identifiés largement par leur morphologie, leur localisation, et leur capacité à exercer une activité phagocytaire. Grâce au développement de nombreux anticorps dirigés contre les macrophages, plusieurs « sous-populations » de macrophages ont été définies en fonction du nombre de marqueurs présents à la surface (Gordon & Taylor, 2005; Hume, 2006). Un anticorps monoclonal généré dans le laboratoire de Siamon Gordon fut d'une utilité particulière : le F4/80 (le 80^{ème} hybridome au cours de la 4^{ème} tentative de fusion) ou EMR1 (*epidermal growth factor-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1*). Une des observations les plus surprenantes des études avec le F4/80 fut le nombre très important de macrophages présents dans les tissus, faisant d'eux l'un des types cellulaires les plus abondants dans le corps (Gordon et al., 1986). Dans certains tissus, ils peuvent occuper une région anatomique très précise par rapport à d'autres types cellulaires, par exemple les macrophages de la pulpe rouge de la rate. Les macrophages ont une relation particulièrement intime avec les cellules épithéliales et endothéliales. Dans un épithélium simple, c'est-à-dire ne comportant qu'une seule couche de cellules, ainsi que sur les parois de la circulation capillaire et lymphatique, les macrophages tissulaires se répartissent le long des membranes basales, tandis que dans un épithélium stratifié (par exemple dans la peau, la trachée et le cervix), ils sont intégrés dans l'épithélium (Hume, Halpin, Charlton, & Gordon, 1984). Les macrophages sinusoidaux, tels que ceux résidant dans le foie, la rate et certaines glandes endocrines, ont un contact direct avec le sang. Cependant, la séparation par l'endothélium n'empêche pas les macrophages péricapillaires d'étendre leurs fonctions dans le lumen et d'interagir avec le contenu sanguin. Par exemple, les cellules de Kupffer participent à la clairance de débris cellulaires et d'érythrocytes âgés présents dans le sang (Klein et al., 2007). La capacité des macrophages à étendre leurs fonctions à travers l'épithélium et jusqu'aux vaisseaux lymphatiques a également été montrée. Ces macrophages résidents ont une durée de vie très longue et possèdent un rôle de patrouilleurs permettant la détection de dommages tissulaires ou d'infection. Ces processus seront détaillés dans le chapitre suivant.

Bien que les macrophages soient le plus souvent reconnus pour leur fonction immunitaire d'élimination de pathogènes, ils jouent également un rôle important dans le développement embryonnaire, l'homéostasie et la réparation tissulaire (**figure 4**). Par exemple, les macrophages de l'épiderme, appelés cellules de Langerhans, participent au contrôle de la prolifération et de la différenciation des kératinocytes. Les macrophages des os, appelés les ostéoclastes, contrôlent la différenciation et l'activité de calcification des ostéoblastes, et ceux présents dans l'embryon sont capables de contrôler le développement rénal. L'importance majeure des macrophages dans le développement est mise en évidence par la multitude de systèmes affectés par la déplétion de macrophages dans des souris *op/op*, déficientes pour le M-CSF. Ces souris présentent une ostéopétrose, un défaut de croissance somatique, un défaut de développement du pancréas et du système nerveux, ainsi qu'une infertilité chez les mâles et les femelles (Gow, Sester, & Hume, 2010; J. W. Pollard, 2009). Les macrophages résidents s'adaptent pour réaliser des fonctions spécifiques aux divers organes. Ainsi, les macrophages du cerveau (appelés les microglies) sont très différents des macrophages alvéolaires des poumons, des cellules de Kupffer du foie ou des macrophages présents le long de la paroi intestinale, qui représentent la plus grande population de macrophages tissulaires.

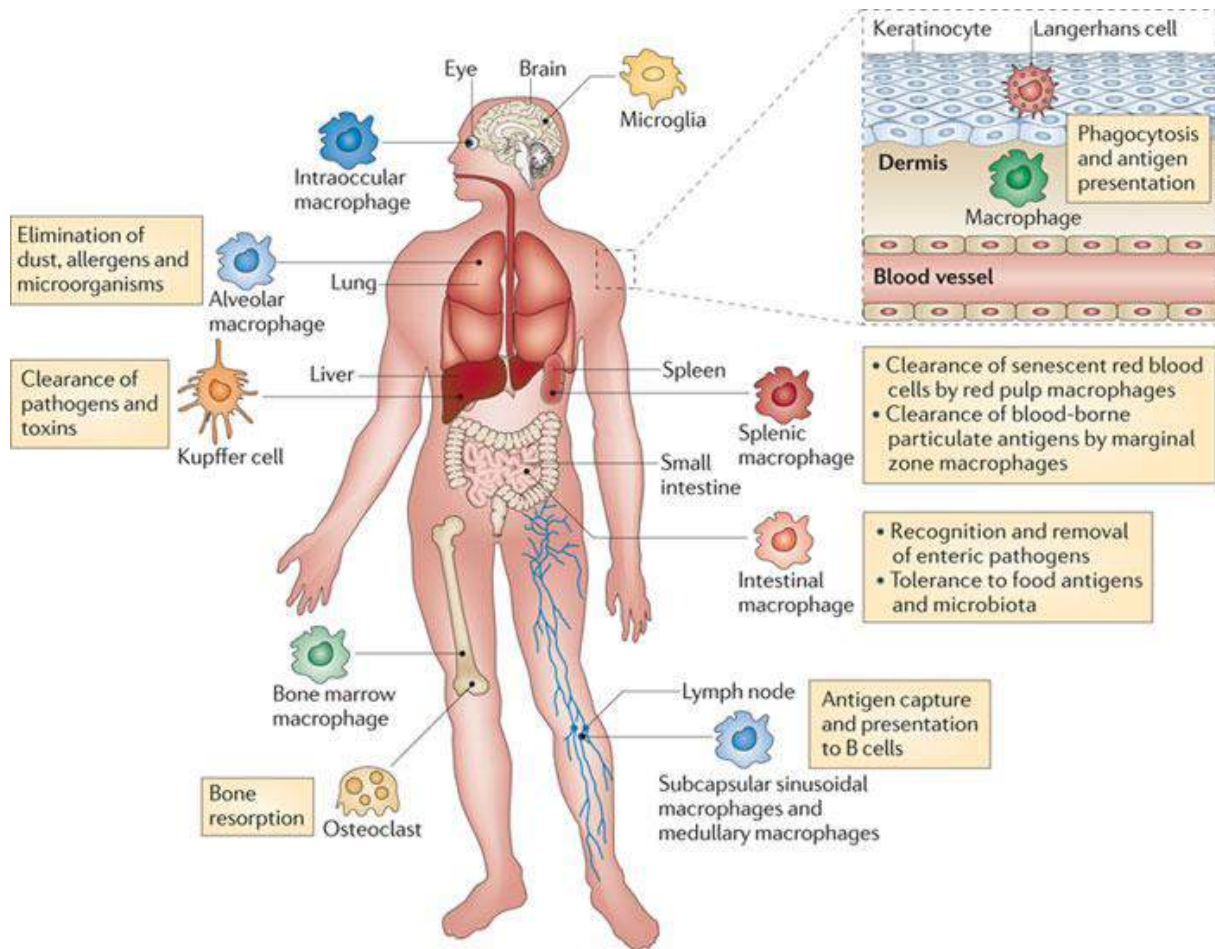


Figure 4 : Les macrophages tissulaires résidents et leurs fonctions (extrait de Murray and Wynn, 2011)

1.2.2 Leur ontogenèse

Les origines des macrophages tissulaires résidents ont été redécouvertes récemment. En effet, il a longtemps été pensé que ces macrophages, tout comme les macrophages impliqués dans la réponse inflammatoire, étaient recrutés à partir des monocytes circulants issus de la moelle osseuse. Cependant, des études récentes de « cartographie de destinée cellulaire » (ou « *fate mapping* ») basées sur le système *Cre-loxP* (Yona et al., 2013) ou réalisées avec des souris parabiotiques (Hashimoto et al., 2013) ont montré qu'à l'état basal, les cellules de Kupffer, les cellules de Langerhans, les microglies et les macrophages péritonéaux, spléniques et alvéolaires ne dérivait pas de monocytes ou d'autres progéniteurs de la moelle osseuse. D'autres études montrent en fait qu'une partie des macrophages tissulaires chez la souris sont dérivés de précurseurs embryonnaires, apparaissent avant la naissance et se maintiennent chez l'adulte par auto-renouvellement. Ces macrophages apparaissent par un processus d'hématopoïèse dite « primitive » dans le sac vitellin à E8,5-E9,0 (âge embryonnaire en jours) chez la souris (K. Takahashi, Yamamura, & Naito, 1989) et

le rat (K. Takahashi & Naito, 1993), puis se répartissent dans les tissus de l'embryon *via* la circulation sanguine (Ginhoux et al., 2010) une fois que celle-ci est entièrement établie (de E8,5 à E10,0). Ces cellules, à l'exception des macrophages du cerveau, sont ensuite rejointes par des monocytes issus du processus d'hématopoïèse « définitive » ayant lieu dans le foie fœtal vers E11,5-E12,5 (Naito, Takahashi, & Nishikawa, 1990). Ces monocytes sont recrutés aux tissus vers E13,5-E14,5 où ils vont proliférer et se différencier en macrophages, diluant la population préexistante de macrophages dérivés du sac vitellin et devenant ainsi des contributeurs des populations de macrophages tissulaires adultes (Hoeffel et al., 2012). La **figure 5** résume l'origine embryonnaire des macrophages (Ginhoux & Jung, 2014). Toutefois, la véritable contribution de ces deux origines de macrophages chez l'adulte reste encore controversée, notamment d'un tissu à un autre. Une étude très récente montre en effet que ces précurseurs embryonnaires sont bien présents dans les intestins pendant la période néonatale. Toutefois, ils ne semblent pas persister chez la souris adulte et sont remplacés aux alentours du sevrage par un recrutement continu de monocytes circulants Ly6C^{hi} *via* le CCR2, un phénomène favorisé par le microbiote (Bain et al., 2014). Il est ainsi impossible de généraliser l'origine des macrophages résidents puisque chaque tissu représente une situation différente, accroissant ainsi l'hétérogénéité des macrophages. Dû au fait que le *fate mapping* ne soit pas envisageable chez l'Homme, très peu d'études ont examiné si les macrophages tissulaires avaient des origines embryonnaires.

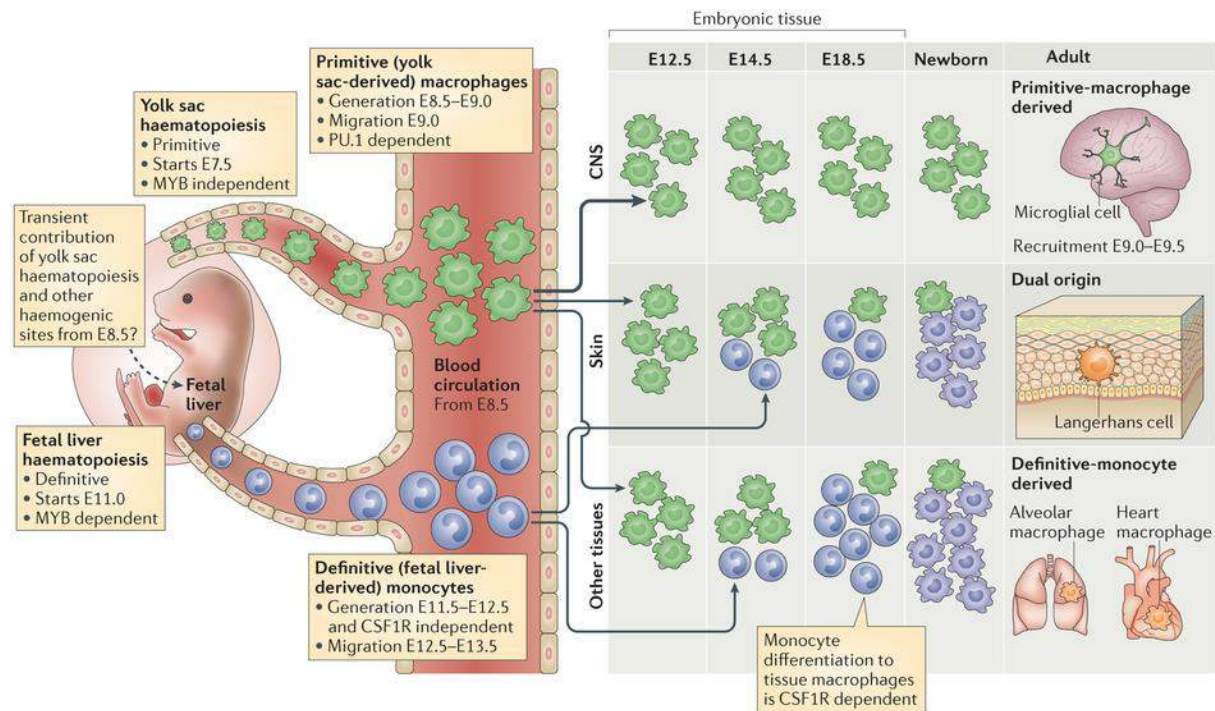


Figure 5 : Le développement embryonnaire des macrophages (extrait de Ginhoux and Jung, 2014)

1.2.3 Leur homéostasie

Les macrophages ont longtemps été considérés comme des cellules quiescentes, à longue durée de vie, à un stade de différenciation terminale et à faibles capacités prolifératives. Toutefois, la récente découverte des origines prénatales de populations de macrophages a fait naître l'hypothèse de leur renouvellement par prolifération. En effet, les cellules de Langerhans humaines possèdent des capacités prolifératives (Czernielewski & Demarchez, 1987) et des cellules de Langerhans dérivées de donneurs peuvent toujours être retrouvées plus de quatre ans après la transplantation (Kanitakis, Petruzzo, & Dubernard, 2004). Une telle capacité de renouvellement a également été confirmée chez la souris (Merad et al., 2002). Des preuves d'un renouvellement de façon indépendante des cellules dérivées de la moelle osseuse ont aussi été retrouvées pour les microglies (Ajami, Bennett, Krieger, Tetzlaff, & Rossi, 2007), les macrophages péritonéaux (Davies et al., 2011) et intestinaux (Varol et al., 2009). De plus, cette capacité semble être favorisée par certaines conditions telles que le développement embryonnaire (Ginhoux et al., 2010; Hoeffel et al., 2012), la grossesse (Tagliani et al., 2011) et une infection (Jenkins et al., 2011), impliquant des molécules telles que le M-CSF et l'interleukine-4 (IL-4) (Jenkins et al., 2013). Toutefois, des expériences d'ablation de macrophages résidents ont montré que les cellules dérivées de la moelle osseuse pouvaient aussi contribuer à renouveler ces populations (Hashimoto et al.,

2013; Landsman, Varol, & Jung, 2007), laissant ainsi ouverte la question de l'apport exact de la prolifération des macrophages aux macrophages résidents.

1.3 L'activation et la polarisation des macrophages

Indépendamment de leurs origines, une autre facette de la plasticité des macrophages est leur capacité à se polariser ou s'activer en réponse à leur microenvironnement. On distingue classiquement deux grands états de polarisation représentant deux extrêmes d'un continuum : les macrophages de type 1 (polarisation M1) et de type 2 (polarisation M2), c'est-à-dire activés respectivement « classiquement » et activés « alternativement » (Gordon, 2003; Mantovani, Sica, & Locati, 2005; Mantovani et al., 2004) (figure 6). La différenciation dite « classique » des macrophages désigne l'activation observée au cours d'une réponse inflammatoire. Ces macrophages expriment fortement le CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe II et sont adaptés pour éliminer les microorganismes et les cellules tumorales, présenter des antigènes aux cellules de l'immunité acquise et activer les réponses Th1/lymphocytes T cytotoxiques. Le facteur d'activation classique des macrophages, produit par des lymphocytes Th1 et cellules NK stimulés, est l'interféron- γ (IFN- γ) (Schroder, Hertzog, Ravasi, & Hume, 2004), seule ou en concert avec des stimuli bactériens (par exemple, le lipopolysaccharide ou LPS) et des cytokines (telle que *tumor necrosis factor α* ou TNF- α). En revanche, l'activation dite « alternative » des macrophages est associée à une activité modulatrice par activation Th2 et est impliquée dans des processus de développement et de réparation tissulaire, jouant un rôle dans l'angiogenèse, la fibrogenèse et la synthèse de matrice extracellulaire (Benoit, Desnues, & Mege, 2008; B. Z. Qian & Pollard, 2010). Le facteur d'activation alternative est la cytokine IL-4 produite par les lymphocytes Th2 (Gordon, 2003). La plasticité et la flexibilité sont des caractéristiques clés des macrophages et de leurs états (Biswas & Mantovani, 2010; Mantovani, Sozzani, Locati, Allavena, & Sica, 2002; Mosser & Edwards, 2008). Le phénotype de macrophages polarisés M1-M2 peut, dans une certaine mesure, être réversé *in vitro* et *in vivo* (Guiducci, Vicari, Sangaletti, Trinchieri, & Colombo, 2005; Saccani et al., 2006). De plus, les pathologies sont fréquemment associées avec des changements dynamiques dans l'activation des macrophages (plus de détails dans le chapitre suivant).

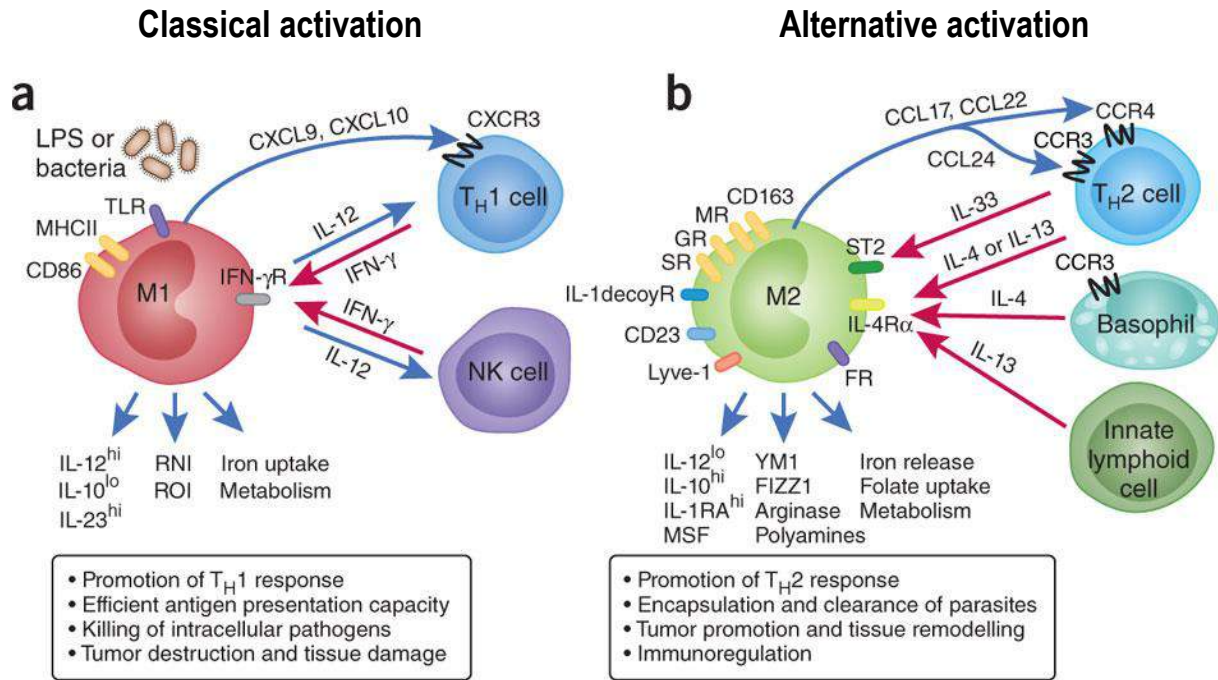


Figure 6 : La polarisation M1/M2 des macrophages (extrait de Biswas and Mantovani, 2010)

Il est important de noter que, similairement à la dichotomie Th1/Th2 des lymphocytes, la distinction stricte entre phénotypes M1 et M2 est contestable à cause de la grande plasticité et de l'hétérogénéité des macrophages faces à la multitude de types de stimuli différents rencontrés simultanément ou séquentiellement dans un tissu pathologique. Un point de vue proposé et possiblement plus approprié serait de considérer l'éventail de phénotypes de macrophages comme un spectre de couleurs sur un cercle chromatique (Mosser & Edwards, 2008). Les macrophages pourraient être classés « rouges » (macrophages activés classiquement pro-inflammatoires), « jaunes » (macrophages impliqués dans la réparation tissulaire) ou « bleus » (macrophages régulateurs anti-inflammatoires), toutes les combinaisons et nuances étant possibles (figure 7). Un exemple serait les macrophages associés aux tumeurs, discutés en détail dans le chapitre suivant, qui seraient verts puisqu'ils présentent des caractéristiques à la fois de macrophages régulateurs et de macrophages réparateurs. Toutefois, ce type de classification n'est pas reconnue par tous et un manque de consensus dans les définitions d'activation des macrophages au cours d'expériences *in vitro* et *in vivo* a pour effet d'entraver le progrès sur l'étude des macrophages. Pour y remédier, un collectif d'équipes a récemment proposé un système de standards englobant trois principes (la source des macrophages, la définition des éléments activateurs, et un ensemble consensuel de

marqueurs afin de décrire l'action des macrophages), dans le but de normaliser la nomenclature de l'activation des macrophages (Murray et al., 2014).

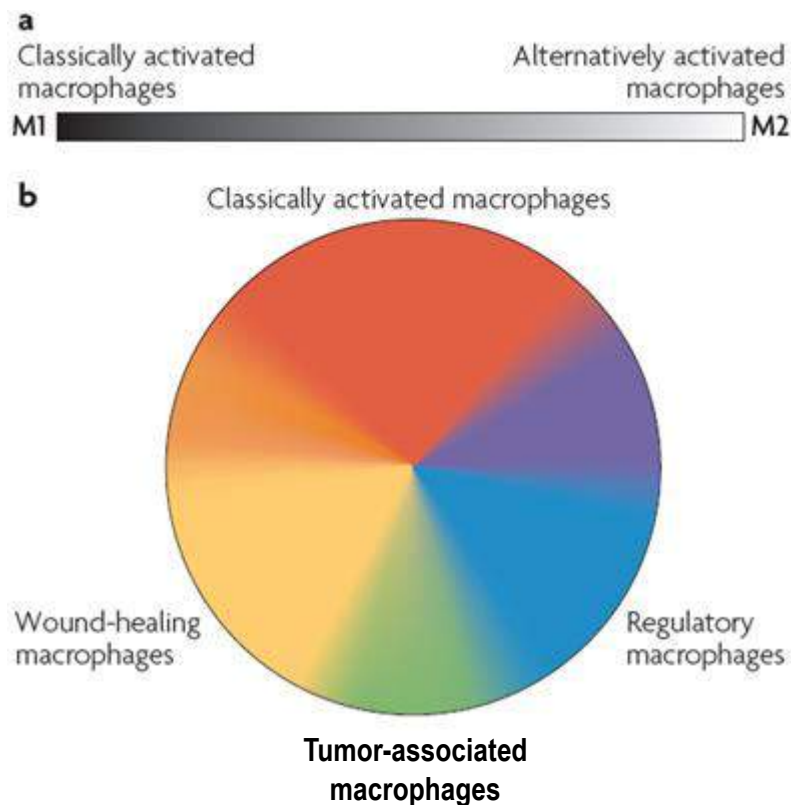


Figure 7 : Le spectre de la polarisation des macrophages (adapté de Mosser and Edwards, 2008)

L'activation des macrophages n'implique pas uniquement les cellules T. En effet, les macrophages peuvent répondre directement aux motifs moléculaires associés aux pathogènes ou *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs). La reconnaissance se fait à travers la membrane plasmique grâce à des récepteurs cytoplasmiques tels que les *Toll-like receptors* (TLR) et autres récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (Kawai & Akira, 2010). Il s'avère que les récepteurs sont soumis à une forte sélection évolutionniste et sont donc souvent associés à des variations dans la susceptibilité aux pathologies entre individus (Leulier & Lemaitre, 2008). L'activation classique des macrophages, impliquant une interaction synergétique entre l'IFN- γ et une molécule pathogène telle que le LPS, ne représente qu'une des nombreuses interactions se produisant entre stimuli distincts. Elle entraîne la production d'une grande gamme de molécules de type hormonal appelées cytokines, telles que le TNF- α , l'IL-1 et l'IL-6 notamment, qui sont indispensables à

l'orchestration d'une réponse inflammatoire appropriée, mais qui peuvent également participer à la pathogenèse de plusieurs maladies (plus de détails dans le [chapitre 2](#)).

2 L'inflammation et la réponse des macrophages

Les macrophages sont des acteurs clés de la réponse inflammatoire. L'inflammation est un processus finement régulé se mettant en place suite à un dommage tissulaire ou une infection. La fonction principale de l'inflammation est d'écarter l'agression pathologique et d'éliminer ou réparer les tissus endommagés, dans le but de revenir à l'homéostasie tissulaire.

2.1 Phase I : la détection de la perturbation par les macrophages résidents

L'initiation de la réponse inflammatoire doit être très finement régulée afin d'éviter les dommages collatéraux. Des signaux moléculaires générés en réponse à un dommage tissulaire ou une invasion microbienne sont reconnus par des cellules présentatrices d'antigène, telles que les macrophages et les cellules dendritiques. Grâce à leur localisation stratégique à proximité du site de la blessure, les macrophages résidents tissulaires sont les premiers à percevoir le désordre et sont donc les déclencheurs primaires de la réponse inflammatoire. Par exemple, contrairement aux cellules apoptotiques, la mort par nécrose cellulaire provoquée par une blessure ou une infection entraîne une perturbation des membranes cellulaires et la libération de constituants cytoplasmiques et nucléaires, contenant des motifs moléculaires associés aux dommages ou *damage-associated molecular patterns* (DAMPs). Les DAMPs (tel que l'ADN) sont reconnus par des récepteurs à la surface des macrophages (tels que les TLR) ce qui va entraîner l'activation des voies de signalisation de *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B) et *signal transducers and activators of transcription 1* (STAT1), ce qui génère la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α et l'interleukine-1 (Kawai & Akira, 2010). De plus, des protéases et des hydrolases libérées par des cellules mortes vont pouvoir modifier des composants extracellulaires et générer des médiateurs (par exemple des fragments du complément) et autres DAMPs (par exemple des fragments de la matrice extracellulaire) capables d'activer les macrophages. Comme mentionné précédemment, les PAMPs jouent également un rôle important dans l'activation des récepteurs à la surface des macrophages, l'exemple le plus courant étant l'activation du récepteur TLR4 par le LPS. Les monocytes non-classiques peuvent également jouer un rôle de sentinelles en patrouillant le long du côté luminal de

l'endothélium, comme décrit dans le [paragraphe 1.1](#). En réponse à un désordre, ces monocytes peuvent rapidement quitter la circulation et envahir le site affecté afin de seconder les macrophages tissulaires. Le résultat de cette première phase est la production de cytokines pro-inflammatoires (par exemple, le TNF, l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8) et de chimiokines, ayant pour conséquence la formation d'un signal chimiotactique responsable de l'attraction et du recrutement des leucocytes. De plus, diverses molécules synthétisées par les cellules du tissu endommagé ou les leucocytes (telles que l'histamine, la sérotonine et la bradykinine), et des protéines du complément (telles que C3a, C3b et C5a) vont provoquer une vasodilatation et donc une augmentation du flux sanguin (responsable de la sensation de chaleur et de la rougeur au cours d'une inflammation), ainsi qu'une augmentation de la perméabilité vasculaire (responsable du gonflement), facilitant le recrutement des monocytes.

2.2 Phase II : le recrutement des monocytes

Le recrutement des leucocytes est possible grâce au processus de chimiotaxie. La production de cytokines par les macrophages résidents a pour effet d'activer les cellules endothéliales et les rendre plus adhérentes grâce à l'augmentation de l'expression de molécules d'adhérence telle que la P-sélectine. De plus, la production de chimiokines par les cellules endothéliales va créer un gradient chimiotactique qui favorise et oriente la migration des cellules inflammatoires (Renkawitz et al., 2009). Ce gradient sera suivi par les monocytes/macrophages néo-recrutés pour aller du sang jusqu'au site infecté ou endommagé. L'existence d'un gradient chimiotactique a été récemment démontrée *in vivo* (impliquant CCL21 et des cellules dendritiques) (M. Weber et al., 2013). Les monocytes peuvent également migrer vers une concentration importante de molécules produites par les microorganismes eux-mêmes, par des tissus endommagés, par l'activation du complément ou par la cascade de coagulation qui libère certains peptides bioactifs tel que le C5a. Les peptides N-formyl-méthionyl sont un exemple de chimioattractant microbien, unique à la bactérie puisqu'il s'agit de l'acide aminé initial à l'extrémité N-terminale de toutes les protéines bactériennes.

Les chimiokines sont des petits peptides, divisées en différentes classes selon les motifs des noyaux cystéine formant les ponts disulfures : les chimiokines CC ont deux cystéines adjacentes alors que les chimiokines CXC ont un acide aminé intercalé (CX3CL1 ayant trois acides aminés intercalés). Par conséquent, les récepteurs aux chimiokines sont classés en familles : CCR, CXCR et CX3CR. La grande majorité des récepteurs qui contrôlent

la chimiotaxie rentrent dans la catégorie des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Tel qu'il est indiqué dans la revue de Lattin et collègues (Lattin et al., 2007), les macrophages sont remarquablement adaptés à répondre à un large éventail de signaux différents couplés aux RCPG, dont le niveau d'expression très élevé sous-tend de nombreux mécanismes de signalisation et boucles rétroactives. De plus, l'expression spécifique de récepteurs aux chimiokines sur différentes populations de monocytes permet leur recrutement différentiel en réponse à différents signaux. En effet, il a été montré que contrairement à la population de monocytes humains CD14^{hi}, les monocytes CD14+CD16+ n'expriment que très peu le CCR2 (récepteur du CCL2) mais expriment plus fortement le CCR5 (C. Weber et al., 2000). Ils sont donc plus aptes à réagir au cours d'une condition inflammatoire de type Th1 (impliquant fortement le CCR5) telle que l'arthrite rhumatoïde.

En réponse aux cytokines pro-inflammatoires ou par stimulation de récepteurs de l'immunité innée par diverses molécules microbiennes, la plupart (si ce n'est la totalité) des cellules nucléées sont capables d'exprimer CCL2 (ou MCP-1), ligand du récepteur CCR2 (fortement exprimé par les monocytes Ly6C^{hi} « classiques » inflammatoires, voir paragraphe précédent). Plusieurs infections induisent l'expression de CCL2, ce qui résulte en de hautes concentrations de CCL2 circulant dans le sérum et dans les tissus enflammés. CCL2 est une chimiokine clé responsable du passage des monocytes de la moelle osseuse vers la circulation sanguine. D'autres chimiokines telles que CCL3 et CCL6 sont également impliqués dans le recrutement des monocytes vers les tissus. L'ensemble des chimiokines impliquées dans le recrutement des monocytes et neutrophiles est résumée dans le [tableau 2](#) (Soehnlein & Lindbom, 2010).

Après avoir perçu le signal chimiotactique, les monocytes vont devoir parcourir quatre phases afin de pénétrer dans le tissu et atteindre le site affecté : 1) le « roulement » le long de la paroi vasculaire, 2) l'adhérence à cette paroi, 3) la diapédèse (aussi appelée l'extravasation), c'est-à-dire le franchissement de la barrière endothéliale, et enfin 4) la migration trans-tissulaire ([figure 8](#)). Les processus moléculaires complexes mis en jeu au cours des trois premières étapes sont déjà bien décrits dans la littérature ([figure 8](#)) (Shi & Pamer, 2011), et pour faciliter la lecture de ce manuscrit, je ne décrirai que les grandes lignes de chaque processus. En revanche, la dernière étape de migration trans-tissulaire reste encore largement méconnue. C'est ce processus qui constitue l'objet de mon travail de thèse (voir chapitre suivant).

Chemokine	Source	Receptor	Target	Mechanism leading to production or activation	Role in phagocyte interplay
CXCL1	Macrophages	CXCR2	Neutrophils	Onset: sensing necrotic cell death (by CLEC4E, ROS and HMGB1)	Onset: neutrophil recruitment
				Onset: increased activity after cleavage by MMP9	
				Resolution: cleavage by MMP12	Resolution: termination of neutrophil efflux
CXCL2	Macrophages	CXCR2	Neutrophils	Onset: sensing necrotic cell death (by CLEC4E, ROS and HMGB1)	Onset: neutrophil recruitment
				Resolution: cleavage by MMP12	Resolution: termination of neutrophil efflux
CXCL5	Macrophages, eosinophils and epithelial cells	CXCR2	Neutrophils	Onset: increased activity following cleavage by MMP8	Onset: neutrophil recruitment
CXCL8	Macrophages	CXCR2	Neutrophils	Onset: sensing stress (by ROS)	Onset: neutrophil recruitment
			Neutrophils	Onset: increased activity after cleavage by MMP8 or MMP9	
	Neutrophils		Monocytes	Onset: transcriptional activation	Onset: monocyte recruitment
	Macrophages		Neutrophils	Resolution: lipoxin A4 blocks transcription	Resolution: termination of neutrophil influx
CCL2	Endothelial cells and macrophages	CCR2	Inflammatory monocytes	Onset: IL-6 trans-signalling	Onset: inflammatory monocyte recruitment
				Onset: synthesis following exposure to neutrophil granule proteins	
				Resolution: cleavage by MMP1, MMP3 and MMP12	Resolution: termination of leukocyte influx
CCL3	Endothelial cells, monocytes and macrophages	CCR1	Inflammatory monocytes	Onset: synthesis following exposure to neutrophil granule proteins	Onset: inflammatory monocyte recruitment
	Neutrophils	CCR5	Apoptotic neutrophils	Onset: transcriptional activation	
				Resolution: chemokine sequestration	Resolution: termination of leukocyte influx
CCL4	Neutrophils	CCR1	Inflammatory monocytes	Onset: transcriptional activation	Onset: inflammatory monocyte recruitment
CCL5	Macrophages	CCR5	Apoptotic neutrophils	Resolution: chemokine sequestration	Resolution: termination of leukocyte influx
CCL6	Neutrophils and macrophages	CCR1	Inflammatory monocytes	Onset: increased activity following truncation by neutrophil proteases	Onset: inflammatory monocyte recruitment
CCL7	Macrophages	CCR2	Inflammatory monocytes	Resolution: cleavage by MMP2 and MMP12	Resolution: termination of leukocyte efflux
CCL8	Neutrophils and monocytes	CCR1 and CCR5	Inflammatory monocytes	Resolution: cleavage by MMP1, MMP3 and MMP12	Resolution: termination of leukocyte efflux
CCL9	Macrophages and epithelial cells	CCR1	Inflammatory monocytes	Onset: increased activity following truncation by neutrophil proteases	Onset: inflammatory monocyte recruitment
CCL15	Macrophages and epithelial cells	CCR1	Inflammatory monocytes	Onset: increased activity following truncation by neutrophil proteases	Onset: inflammatory monocyte recruitment
CCL20	Neutrophils, macrophages and lymphocytes	CCR6	Inflammatory monocytes	Onset: transcriptional activation	Onset: inflammatory monocyte recruitment
CCL23	Macrophages	CCR1	Inflammatory monocytes	Onset: increased activity following truncation by neutrophil proteases	Onset: inflammatory monocyte recruitment
CX ₃ CL1	Apoptotic cells, endothelial cells and macrophages	CX ₃ CR1	Monocytes	Resolution: released by apoptotic cells	Resolution: monocyte recruitment

CC, CC-chemokine; CX₃C, CX₃C-chemokine; CXC, CXC-chemokine; HMGB1, high-mobility group box 1 protein; L, ligand; MMP, matrix metalloproteinase; R, receptor; ROS, reactive oxygen species.

Tableau 2 : Les molécules impliquées dans le recrutement des monocytes et neutrophiles (extrait de Soehnlein and Lindbom, 2010)

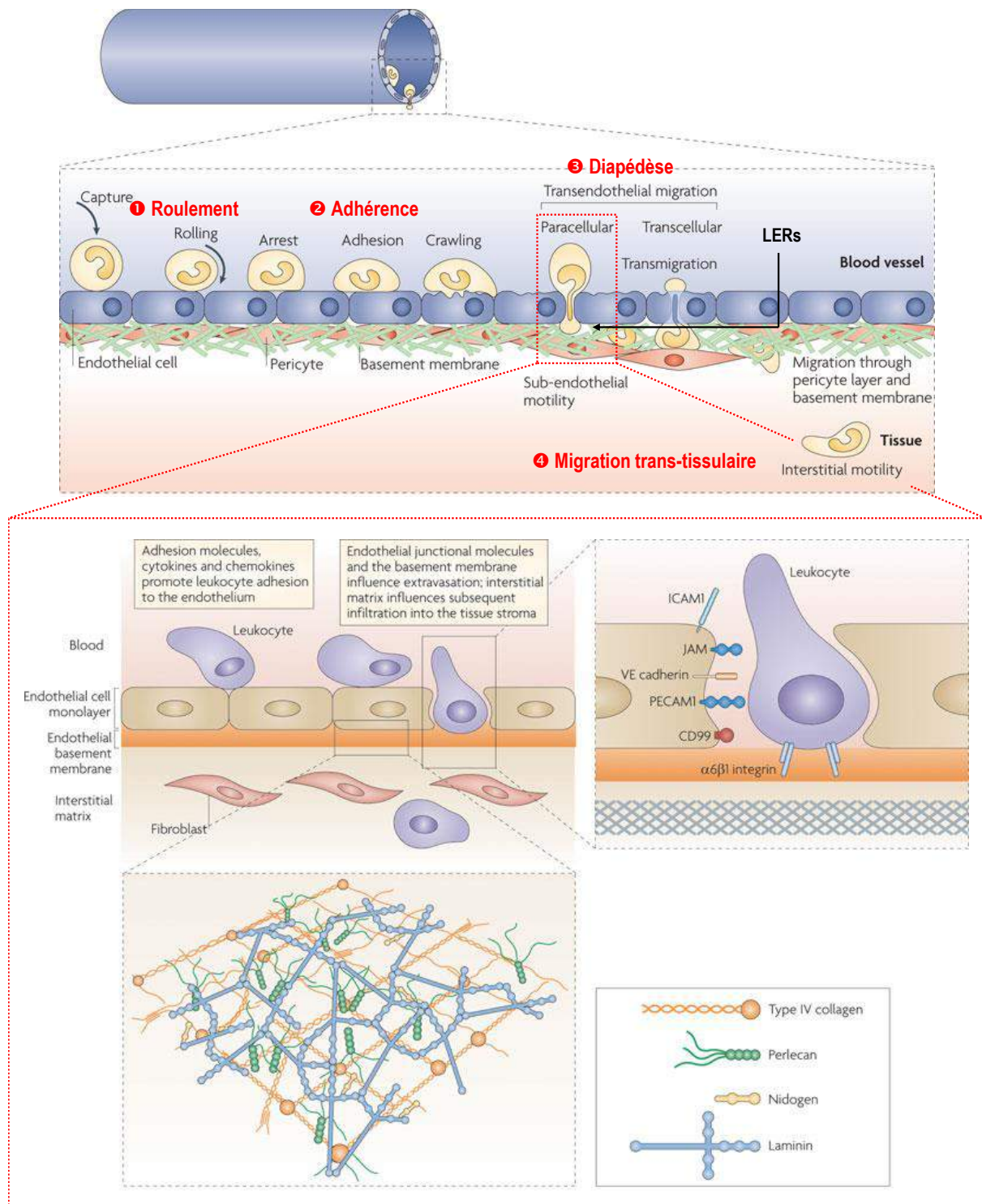


Figure 8 : Les différentes étapes du recrutement des leucocytes (extrait de Murray and Wynn, 2011)

2.2.1 Le roulement et l'adhérence

L'étape de roulement dépend de plusieurs molécules d'adhérence exprimées en réponse aux cytokines pro-inflammatoires à la surface des cellules endothéliales et des monocytes, notamment les sélectines et les intégrines (Ley, Laudanna, Cybulsky, &

Nourshargh, 2007). En effet, la migration de monocytes au cours d'une infection par *Leishmania major* dépend de deux types d'interaction impliquant les sélectines : le *P-selectin glycoprotein ligand 1* (PSGL-1) exprimé par les monocytes interagit avec les sélectines-E et -P des cellules endothéliales ; alors que la L-sélectine des monocytes va se lier au *peripheral node addressin* (PNAd) des cellules endothéliales (Ley et al., 2007). Quant aux intégrines exprimées à la surface des monocytes, le *lymphocyte function-associated antigen 1* (LFA1 ou intégrine $\alpha\text{L}\beta\text{2}$) va pouvoir se lier au *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM1) des cellules endothéliales, tandis que le *macrophage receptor 1* (MAC1 ou intégrine $\alpha\text{M}\beta\text{2}$) et le *very late antigen 4* (VLA4 ou intégrine $\alpha\text{4}\beta\text{1}$) vont plutôt interagir avec le *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM1). Une description plus détaillée des intégrines sera faite dans un le [chapitre 3, paragraphe 1.3](#). Une fois arrivés à proximité des cytokines pro-inflammatoires et du site endommagé, l'affinité des monocytes pour les ICAMs présents sur les vaisseaux va augmenter *via* l'action des intégrines et permettre l'immobilisation nécessaire pour le passage à travers la paroi endothéliale et l'invasion des tissus adjacents. En plus de ces interactions, les neutrophiles, qui précèdent généralement les monocytes, vont également favoriser le recrutement de monocytes en se déchargeant de protéines des granules telles que la cathélicidine et l'azurocidine qui vont s'ancrer sur les protéoglycanes de l'endothélium et qui vont faciliter l'adhérence stable des monocytes à cet endothélium jusqu'à l'étape de diapédèse ([figure 9](#)).

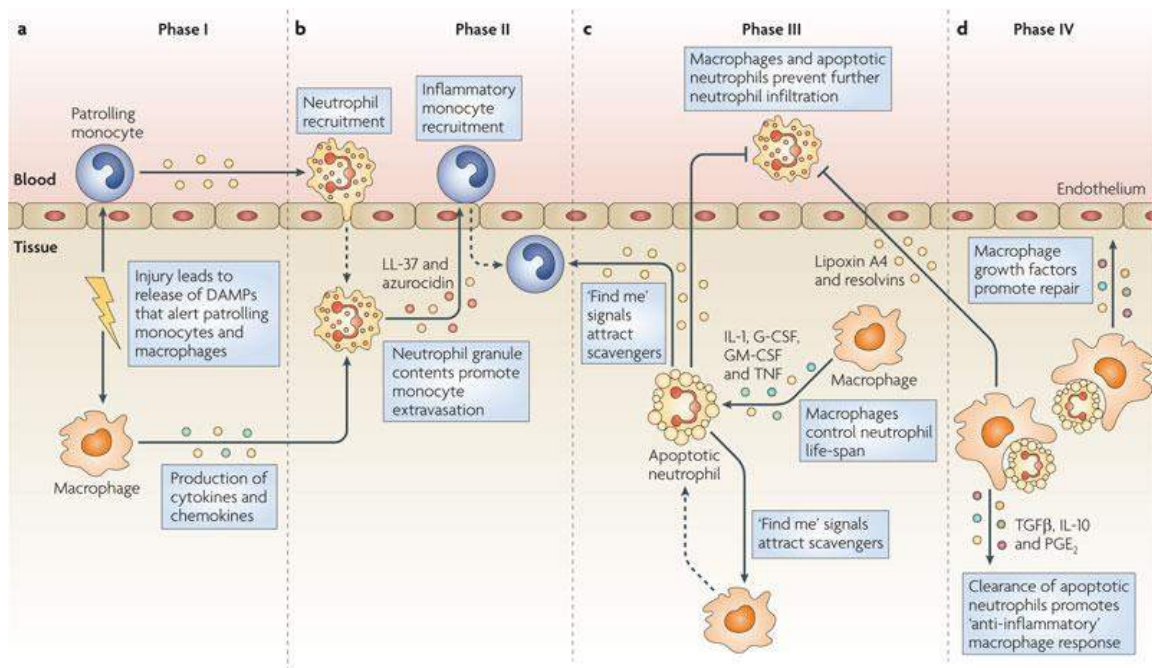


Figure 9 : Le recrutement des macrophages et des neutrophiles au cours de l'inflammation (extrait de Soehnlein and Lindbom, 2010)

2.2.2 La diapédèse

La diapédèse, c'est-à-dire le passage des monocytes du lumen vasculaire vers le tissu, implique la pénétration de la barrière cellulaire endothéliale, de la membrane basale associée et de l'enveloppe de péricytes. Elle peut se faire selon deux voies : la voie para-cellulaire, c'est-à-dire à travers les jonctions endothéliales, et la voie trans-cellulaire, c'est-à-dire à travers une cellule endothéliale (moins fréquente et longtemps controversée) (Ley et al., 2007). L'extension de protrusions membranaires par les monocytes dans les jonctions ou corps cellulaires endothéliaux est déclenchée par la liaison de ICAM-1 sur MAC1, provoquant une cascade de signalisation ayant pour résultat une augmentation des contractions des cellules endothéliales dans le cas de la voie para-cellulaire ; et la formation d'organelles vésiculo-vacuolaires formant des canaux intracellulaires permettant la voie trans-cellulaire. La migration à travers la membrane basale sous-jacente et l'enveloppe de péricytes peut avoir lieu à travers des interstices entre péricytes adjacents et des régions de faible composition protéique de la matrice extracellulaire ([figure 8](#)). En effet, il a été montré, *in vivo*, que les monocytes traversent la membrane basale sans la dégrader en s'infiltrant dans des zones de moindre résistance (*low-expression regions* ou LERs) présentes dans cette membrane (Voisin, Probstl, & Nourshargh, 2010). Toutefois, ce processus peut être facilité par l'implication d'intégrines et possiblement par des protéases telles que des métallo-protéases matricielles (MMPs), présentées plus en détails dans le [chapitre 3](#). Comme précisé précédemment, des molécules telles que l'histamine, la sérotonine et la bradykinine et des protéines du complément libérées par le tissu endommagé ou les leucocytes vont mener à une augmentation de la perméabilité vasculaire et faciliter la diapédèse. Bien que la diapédèse soit une étape indispensable pour le recrutement de monocytes vers le site inflammatoire, elle joue également un rôle important dans la régulation de la réactivité et du comportement des monocytes dans le tissu extravasculaire. Des études montrent en effet que des événements de signalisation et de transcription déclenchés par des interactions moléculaires au cours de la migration transendothéliale sont responsables de modifications phénotypiques et fonctionnelles qui vont moduler la réponse inflammatoire des monocytes/macrophages recrutés (Nourshargh & Marelli-Berg, 2005). Par exemple, des études montrent qu'au cours de la migration à travers des HUVECs (*human umbilical vein endothelial cells*), l'interaction des monocytes avec des cellules endothéliales provoque une augmentation de l'expression d'intégrine α L, de CD33, de CD45RO et d'ICAM-1 (Nourshargh & Marelli-Berg, 2005) par les monocytes ainsi qu'une sécrétion accrue de CCL2 et d'IL-8 (M. Takahashi et al., 1995).

2.2.3 La migration trans-tissulaire

Une fois sortis de la circulation sanguine et présents dans le tissu affecté, les monocytes, tout en se différenciant en macrophages, doivent atteindre la région blessée ou infectée. Ce processus est appelé la migration trans-tissulaire, au cours de laquelle les monocyte/macrophages traversent les structures du tissu composé de cellules et de matrice extracellulaire. Les mécanismes impliqués dans cette migration sont encore largement méconnus et seront discutés dans le [chapitre 3](#), ainsi que dans la partie « résultats » de ce manuscrit puisqu'ils constituent l'objet d'étude de ma thèse.

2.3 Phase III : l'élimination de l'élément perturbateur et la résolution de l'inflammation

Une fois arrivés au site perturbé, les macrophages néo-recrutés différenciés à partir de monocytes vont participer à la restauration de l'homéostasie dans le tissu, d'une part par élimination de la source pathogénique et d'autre part par la réparation tissulaire. Au cours des phases initiales de la réponse inflammatoire, les macrophages inflammatoires présentent un phénotype de type M1. Ceux-ci vont produire des cytokines telles que l'IL-1 et le TNF qui vont faciliter le recrutement d'autres monocytes, ainsi que l'IL-12 et l'IL-23 qui vont diriger la différenciation et l'expansion de cellules Th1 et Th17 antimicrobiennes ([figure 10](#)). De plus, la sécrétion de MMPs tels que MMP2 et MMP9 va également contribuer à dégrader la matrice extracellulaire et ainsi faciliter le recrutement de cellules pro-inflammatoires vers le pathogène ou la blessure (Wynn, 2008).

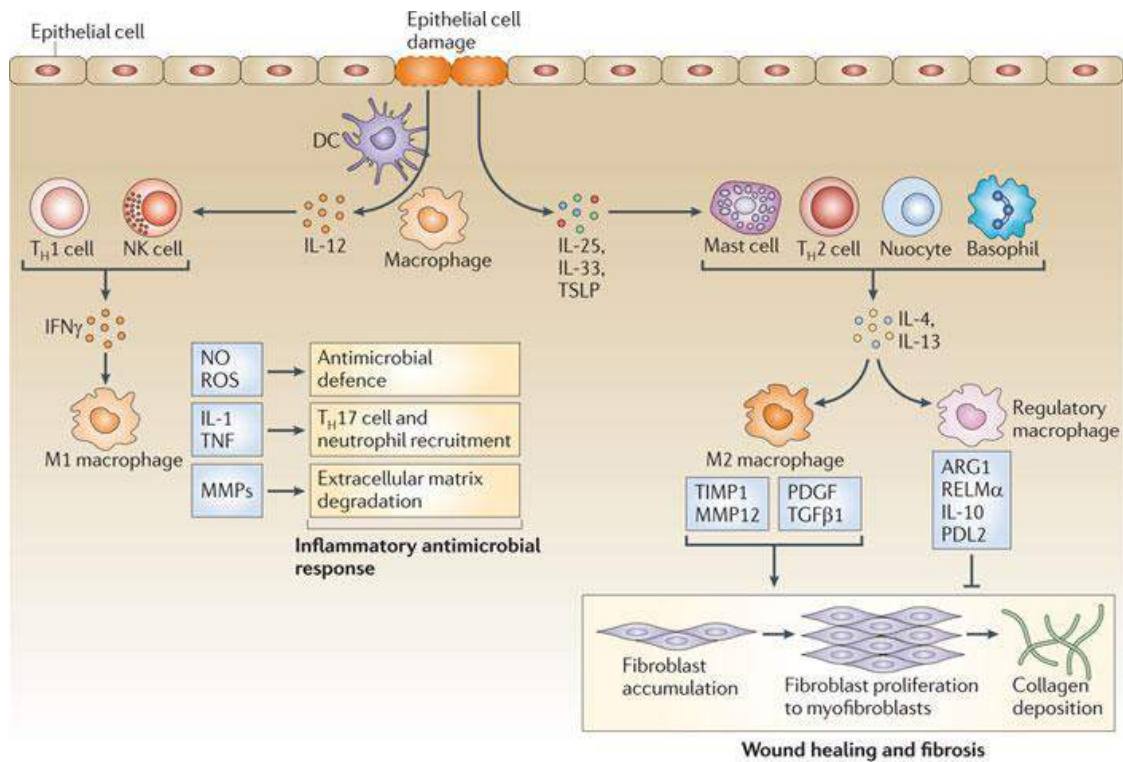


Figure 10 : La réponse inflammatoire et la réparation tissulaire des macrophages (extrait de Murray and Wynn, 2011)

Les macrophages possèdent tout un arsenal antimicrobien, comprenant la production de molécules toxiques telles que l'oxyde nitrique (NO) et les dérivés réactifs de l'oxygène (*reactive oxygen species* ou ROS) par la NADPH oxydase (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*), mais aussi l'activité phagocytaire. En effet, bien que toutes les cellules de mammifères soient capables de capter des macromolécules et des particules présentes dans l'environnement extracellulaire, les macrophages sont considérés comme des cellules phagocytaires « professionnelles », d'où l'étymologie de leur appellation (« gros mangeur » en grec). Ils sont exceptionnels comparés à d'autres types cellulaires en termes de dynamique membranaire, de diversité de leurs récepteurs de capture, et de capacité à rapidement internaliser des particules de grande taille puis à dégrader le matériel internalisé. La phagocytose, couramment définie comme l'internalisation de particules de 1 μm de diamètre ou plus, est une fonction biologique qui a été conservée depuis les organismes eucaryotes les plus primitifs. Elle nécessite notamment un mécanisme permettant la discrimination entre les cellules à éliminer (non-soi, cellules apoptotiques, etc...) et les cellules à conserver dans l'organisme. Les macrophages possèdent de nombreux récepteurs qui permettent une reconnaissance directe des PAMPs, particules spécifiques aux pathogènes et reconnues grâce

à leur composition en sucres et lipides, leur séquence peptidique et leur charge (l'exemple le plus connu étant le LPS). Les particules peuvent également être reconnues indirectement par une couche d'opsonines telles que des anticorps spécifiques ou des composants du complément. Je ne décrirai pas les différentes étapes de la phagocytose ici, mais ils sont détaillés dans la [figure 11](#).

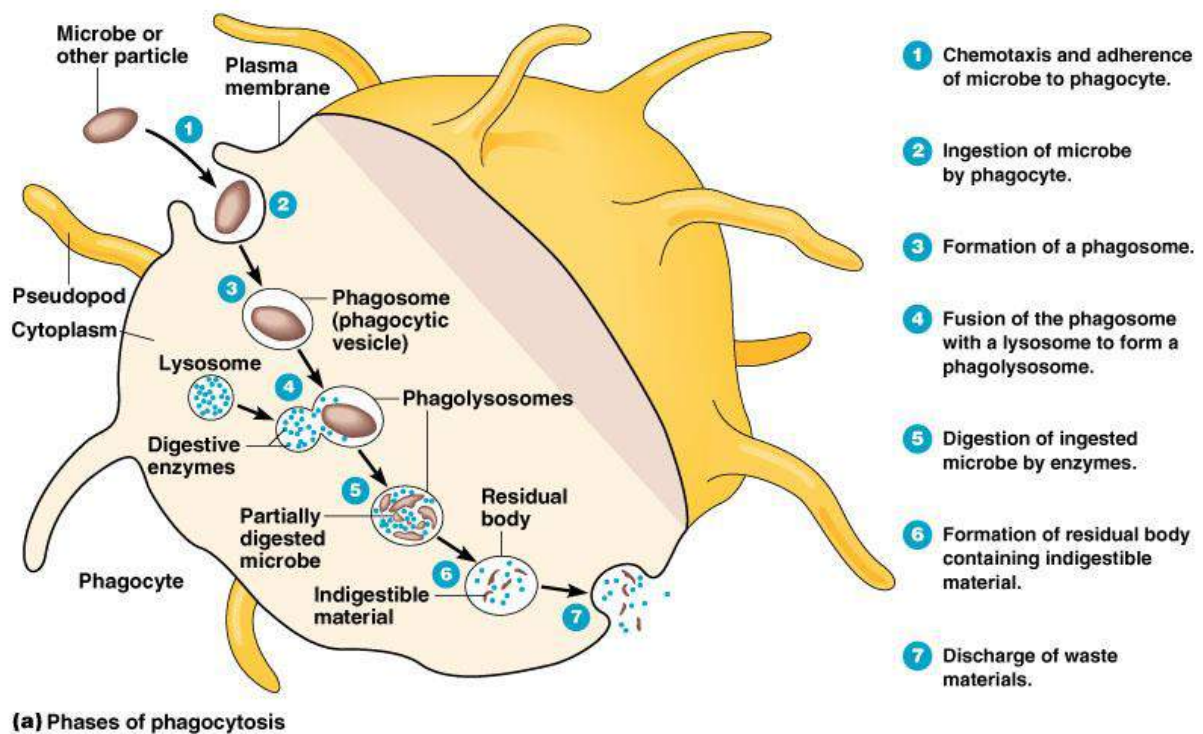


Figure 11 : Les étapes de la phagocytose (extrait de Tortora, Case and Funke, *Microbiology: an Introduction, Eighth Edition*)

Concernant la NADPH oxydase, son action a été initialement décrite dans les neutrophiles, considérés comme les cellules antibactériennes par excellence. Toutefois, la production de ROS a aussi lieu dans les macrophages (Forman & Torres, 2002). De nombreuses données montrent que la dégranulation des neutrophiles, et notamment la libération de la myéloperoxydase, la cathepsine G, ou la cathelicidine, activent la phagocytose des macrophages et leur production de ROS (Silva, 2010; Soehnlein, Weber, & Lindbom, 2009). En contrepartie, les macrophages allongent la durée de vie des neutrophiles recrutés *via* la sécrétion d'IL-1 β , de TNF- α et de GM-CSF (Silva, 2010). De plus, quelques données *in vitro* suggèrent également que les macrophages infectés par certains pathogènes voient leur capacité antimicrobienne augmentée lorsque qu'ils perçoivent la myéloperoxydase sécrétée par les neutrophiles (Silva, 2010). Enfin, il a été montré que des vésicules appelées ectosomes

et libérées par les neutrophiles peuvent activer les macrophages *via* un flux intracellulaire de Ca^{2+} , nécessaire pour l'activation de la voie TLR2 (Eken, Sadallah, Martin, Treves, & Schifferli, 2013). Ainsi il semble que les neutrophiles et les macrophages agissent de concert en vue de l'élimination de pathogènes, leurs actions étant complémentaires (Colucci-Guyon, Tinevez, Renshaw, & Herbomel, 2011).

Une fois le stimulus inflammatoire éliminé, l'activation M1 est réduite, provoquant un changement dans l'environnement cytokinique, avec une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires et une augmentation de la production de DAMPs et de cytokines telles que l'IL-25 et l'IL-33 par les cellules épithéliales endommagées. Ceci va entraîner la transition de la réponse immunitaire inflammatoire vers une réponse de réparation tissulaire, qui est caractérisée par une accumulation de macrophages M2. Une étude récente a mis en évidence un processus d'accumulation de macrophages M2 distincte du néo-recrutement de monocytes sanguins (Jenkins et al., 2011). En effet, elle montre que les macrophages tissulaires, mais également des macrophages néo-recrutés, pouvaient déclencher une prolifération rapide *in situ* orchestrée par l'IL-4 afin d'accroître leur densité sans avoir recours au pool hématopoïétique. Les macrophages M2 vont favoriser la cicatrisation et la fibrose par la production de MMPs (MMP12...), de facteurs de croissance (*platelet-derived growth factor* ou PDGF...) et de cytokines (*transforming growth factor- β 1* ou TGF- β 1). Dans les phases finales de la réparation tissulaire, les macrophages vont également jouer un rôle prépondérant dans la résolution de l'épisode inflammatoire et le retour à l'homéostasie en mettant en place de nouvelles signalisations anti-inflammatoires tels que les lipoxines (médiateurs lipidiques générés par les lipoxigénases à partir de l'acide arachidonique) qui vont stopper l'influx des neutrophiles, faciliter la phagocytose des neutrophiles apoptotiques par les macrophages et favoriser le recrutement de monocytes afin d'éliminer les cellules apoptotiques et les débris cellulaires (Serhan, 2007; Serhan & Savill, 2005). Cette phagocytose menée par les macrophages va induire un vaste programme d'élimination cellulaire ainsi qu'une libération par les macrophages de TGF- β et d'IL-10 favorisant l'arrêt et la résolution de la réponse inflammatoire. Finalement, la dispersion des macrophages après le retour à l'homéostasie reste encore mal connue, toutefois il a été proposé que les macrophages présents deviennent résidents, entrent en apoptose, ou bien empruntent les vaisseaux lymphatiques (Serhan & Savill, 2005) pour présenter des antigènes aux lymphocytes présents dans les ganglions.

Ainsi, les macrophages interviennent de façon coordonnée avec des actions qui leur sont spécifiques afin de résoudre l'inflammation. Notons que ces étapes doivent être finement régulées afin d'éviter que la réaction inflammatoire se poursuive et devienne chronique, ce qui peut entraîner des maladies inflammatoires et des cancers dans lesquels les macrophages jouent des rôles décisifs.

Chapitre 2

Le rôle des macrophages dans le développement de pathologies

Comme décrit dans le chapitre précédent, les macrophages sont parmi les cellules présentant le plus de plasticité dans le système hématopoïétique, et sont présents dans tous les tissus et possèdent une grande diversité fonctionnelle. Ils jouent des rôles majeurs dans le développement, l'homéostasie, la réparation tissulaire et l'immunité. Bien que les macrophages tissulaires soient anatomiquement distincts les uns des autres, et possèdent des profils transcriptionnels et capacités fonctionnelles différents, ils sont tous requis pour le maintien de l'homéostasie. Cependant, ces fonctions réparatrices et homéostatiques peuvent être subverties par des perturbations chroniques, ce qui résulte en une association causale des macrophages à des états pathologiques.

1 Le rôle des macrophages dans les maladies inflammatoires, auto-immunes et infectieuses

Lorsque les tissus sont endommagés suite à une infection ou une blessure, les monocytes inflammatoires sont recrutés à partir de la circulation et se différencient en macrophages pendant leur migration vers les tissus affectés. Ces macrophages recrutés ont un phénotype pro-inflammatoire et sécrètent un grand nombre de médiateurs inflammatoires (TNF- α , IL-1, IL-12, IL-23...) et toxiques (ROS, NO...) qui vont contribuer à l'élimination du pathogène. Bien que ces macrophages inflammatoires aient initialement un rôle bénéfique puisqu'ils vont faciliter la clairance du pathogène, ils vont également provoquer des dommages collatéraux considérables aux tissus par l'activité toxique des ROS et NO et des

cellules Th1 et Th17 qu'ils recrutent (Nathan & Ding, 2010). En effet, si la réponse inflammatoire des macrophages n'est pas rapidement contrôlée, elle peut devenir pathologique et contribuer à la progression de plusieurs maladies, telles que des maladies inflammatoires chroniques et des maladies auto-immunes. Afin de contrer l'apparition de ces dommages tissulaires, les macrophages doivent rapidement entrer en apoptose ou adopter un phénotype anti-inflammatoire ou suppresseur afin d'affaiblir la réponse inflammatoire et faciliter la cicatrisation. Il devient de plus en plus évident que les mécanismes responsables de la transformation des macrophages pro-inflammatoires en macrophages anti-inflammatoires, ou à l'inverse des macrophages suppresseurs à un phénotype pro-inflammatoire, ont un impact majeur dans la progression et la résolution de plusieurs maladies chroniques.

1.1 Les maladies inflammatoires et auto-immunes

De nombreuses maladies inflammatoires mettent en cause les macrophages. J'ai choisi de consacrer ce paragraphe à l'exposition de trois d'entre elles qui présentent à la fois une forte incidence mondiale et qui sont en progression constante, notamment dans les pays développés : l'athérosclérose (les maladies cardiovasculaires totalisent 29% des causes de mortalité), l'obésité (près de 15% de la population mondiale affectée en 2013) et l'asthme allergique (environ 235 millions de personnes affectées en 2011, avec 250 000 décès par an). Je terminerai avec le rôle des macrophages dans les maladies auto-immunes.

1.1.1 L'athérosclérose

L'athérosclérose est aujourd'hui décrite comme étant à la fois un trouble lipidique et une maladie inflammatoire dans lequel les macrophages jouent un rôle central (Woollard & Geissmann, 2010). Grâce à leur capacité à faciliter l'élimination du cholestérol, les macrophages pourraient être vus comme ayant un rôle protecteur au cours de l'athérosclérose et l'homéostasie lipidique. Pourtant, des souris hypercholestérolémiques déficientes en macrophages semblent être protégées de la maladie, suggérant que les macrophages auraient plutôt un rôle pathogénique (J. D. Smith et al., 1995). En effet, il a été observé qu'au cours de la maladie, les macrophages se logent dans l'intima et la subintima des artères, menant à la formation de plaques athérosclérotiques obstructives qui sont sujettes à une rupture et peuvent ainsi provoquer une thrombose, un infarctus du myocarde ou un accident vasculaire cérébral (**figure 12**) (Ayoub, Hickey, & Morand, 2008). Des études ont montré que les cellules Th1 contribuent au développement de la maladie en produisant l'IFN- γ (Gupta et al., 1997). Cette cytokine va stimuler la différenciation de macrophages fortement activés (phénotype plutôt M1 pro-inflammatoires), appelés cellules spumeuses ou *foamy macrophages*, qui favorisent la

formation de lésions instables (A. C. Li & Glass, 2002). Ces macrophages pathogéniques expriment également plus fortement des récepteurs « éboueurs » (« *scavenger receptors* ») tels que CD36, responsables de l'augmentation de la capture de lipoprotéines de basse densité (LDL, qualifiées de « mauvais cholestérol »). En revanche, les cytokines de type Th2, en particulier IL-10, semblent jouer un rôle protecteur en bloquant la formation de ces macrophages M1 pathogéniques dans les plaques athérosclérotiques (Pinderski et al., 2002). Bien que l'hypercholestérolémie fut initialement considérée comme stimulus primaire du recrutement des macrophages vers la paroi artérielle, il est fort probable que des blessures, ainsi que des infections bactériennes et virales, puissent également contribuer à ce recrutement et donc à la pathogenèse de l'athérosclérose. Ainsi, des stratégies de déplétion ou d'inactivation de ces macrophages de type M1 pourraient être utiles dans le traitement de la maladie.

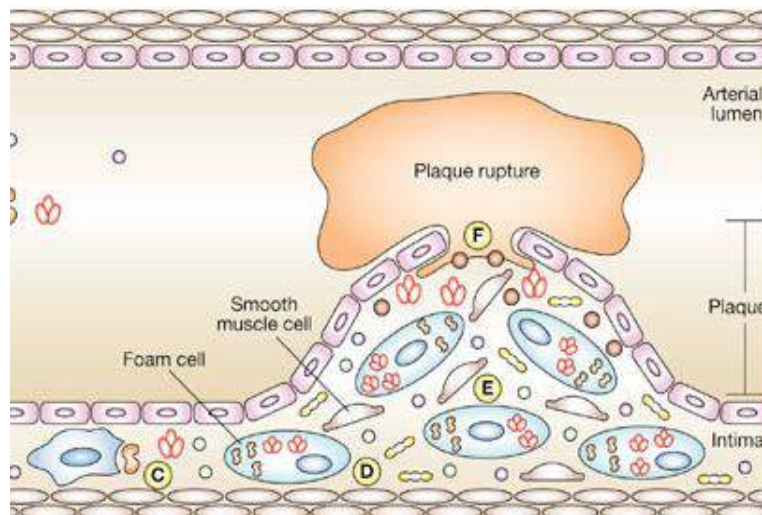


Figure 12 : Les macrophages au cours du développement de l'athérosclérose (extrait de Ayoub, Hickey and Morand, 2008). Les macrophages se logent dans l'intima et la subintima des artères et capturent des LDL, menant à la formation de foamy macrophages. L'accumulation de ces cellules induit la formation de plaques athérosclérotiques comprenant des cellules inflammatoires, des cellules musculaires lisses, des débris cellulaires, des cristaux de cholestérol et de la matrice extracellulaire.

1.1.2 L'obésité

La résistance à l'insuline associée à l'obésité, les diabètes et le syndrome métabolique sont soutenus par une inflammation chronique (Hotamisligil, 2006). Les macrophages du tissu adipeux (*adipose tissue macrophages* ou ATMs) sont un composant majeur du tissu adipeux et jouent un rôle important dans la pathologie associée à l'obésité. En effet, chez les sujets et souris obèses, les adipocytes libèrent des médiateurs tels que le CCL2, le TNF ou des acides gras libres qui favorisent le recrutement et l'activation des ATMs. Les cytokines

inflammatoires produites par les ATMs recrutés vont contrer l'action de sensibilisation de l'insuline par l'adiponectine et la leptine, menant à l'insulino-résistance. En effet, des études montrent que l'infiltration des ATMs est corrélée au degré de l'obésité (Weisberg et al., 2003). Là encore, l'inhibition de cette infiltration de macrophages paraît être une stratégie intéressante pour lutter contre le syndrome métabolique.

1.1.3 L'asthme allergique

Les macrophages M2 sont couramment décrits comme suppresseurs puisqu'ils inhibent la production de médiateurs pro-inflammatoires (voir le chapitre précédent). Toutefois, la définition et les fonctions de ces macrophages M2 ont été étendus, du fait de leur rôle dans la régulation des réponses inflammatoires de type Th2. Ainsi, de nombreuses études ont identifié leur rôle dans les réponses allergiques (Prasse et al., 2007), bien que cela reste encore controversé. L'asthme allergique est une maladie inflammatoire chronique complexe des poumons, se manifestant par une inflammation, une obstruction, une hyperréactivité et un remodelage pathologique des voies respiratoires. Cette réponse inflammatoire est caractérisée par le recrutement de lymphocytes Th2 (Anthony et al., 2006), de mastocytes, d'éosinophiles et de macrophages dans les poumons, et une expression élevée de l'immunoglobuline E dans le sérum, spécifique des allergènes. Cette inflammation chronique, c'est-à-dire non-résolue, dirigée par des cytokines Th2 et caractéristique de l'asthme allergique, serait expliquée par la présence persistante d'une population de macrophages présentatrice d'antigènes dans le lumen des voies respiratoires (Julia et al., 2002). Les macrophages pulmonaires produisent une variété de facteurs qui vont directement stimuler la contraction des muscles lisses des voies aériennes et la dégradation de la matrice extracellulaire, favorisant ainsi le remodelage pathologique des voies. On retrouve chez certains asthmatiques des macrophages pulmonaires qui sont en permanence exposés à des cytokines de type Th2 (par exemple, IL-4, IL-13 et IL-33) entraînant leur différenciation vers un phénotype M2 impliqué dans la pathogenèse de l'asthme. En effet, des expériences de transfert adoptif ont montré que la sévérité de la maladie allergique est exacerbée par des macrophages IL-4R⁺ (exprimant le récepteur à l'IL-4, cytokine majeure de la différenciation M2), alors qu'une diminution du nombre de ces cellules est associée à une protection contre la maladie (Ford et al., 2012; Moreira et al., 2010).

1.1.4 Les maladies auto-immunes

Les macrophages sont également impliqués dans la pathogenèse d'une variété de maladies auto-immunes, telles que la polyarthrite rhumatoïde, la sclérose en plaques,

l'hépatite auto-immune et la maladie de Crohn. Au cours de ces maladies, les macrophages de type M1 représentent une source importante d'un grand nombre de cytokines inflammatoires clés qui ont été identifiées comme des conducteurs de l'inflammation auto-immune, telles que l'IL-12, l'IL-18, l'IL-23 et le TNF- α (Murray & Wynn, 2011). Par exemple, au cours d'une colite expérimentale, une sous-population de monocytes Ly6C^{hi}/CX3CR1^{lo} exprimant TLR2, il a été montré que CCR2 et TNF favorisent l'inflammation colique (Platt, Bain, Bordon, Sester, & Mowat, 2010). Similairement, chez des patients atteints de la maladie de Crohn, une population de macrophages CD14⁺ a été identifiée, distincte du pool normal de macrophages intestinaux, qui est responsable de la production de larges quantités de cytokines pro-inflammatoires citées plus haut, notamment l'IL-23 et le TNF, considérées comme responsables de la maladie (Kamada et al., 2009; Kamada et al., 2008).

Dans le cas de maladies provoquant une démyélinisation du système nerveux central, il a été montré que des macrophages M1 inflammatoires contribuent à la démyélinisation des axones dans des expériences d'encéphalomyélite auto-immune chez la souris, souvent utilisée comme modèle de la sclérose en plaques (Hendriks, Teunissen, de Vries, & Dijkstra, 2005). Les macrophages recrutés vers le système nerveux central conduisent les cellules T à exécuter un programme effecteur Th1 pro-inflammatoire, tandis que les cellules myéloïdes recrutées produisant de l'IL-23 stimulent la production de GM-CSF par les cellules T auxiliaires, qui régulent le développement et la sévérité de la maladie (Codarri et al., 2011; El-Behi et al., 2011).

Toutefois, malgré les preuves d'implication des macrophages dans ces pathologies complexes, il est important de garder en tête que les principes d'hétérogénéité et de plasticité des macrophages s'appliquent également, et donc que plusieurs populations de macrophages peuvent avoir des effets pro- ou anti-inflammatoires flexibles et ainsi différents impacts sur la maladie. Par exemple, dans le cas de la polyarthrite rhumatoïde, le TNF produit par les macrophages de type M1 a été identifié comme un déclencheur de la production de cytokines par les cellules synoviales, menant au développement de la maladie (d'ailleurs, des molécules anti-TNF- α représentent un traitement efficace) (Kawane et al., 2006). En revanche, il a été observé que les macrophages produisant des ROS protègent les souris de l'arthrite par inhibition de l'activation des cellules T (Gelderman et al., 2007). Des populations de macrophages anti-inflammatoires ont aussi été retrouvées dans plusieurs maladies auto-immunes, ayant des rôles protecteurs (Shechter et al., 2009). Ainsi, bien que les macrophages

représentent des cibles intéressantes pour le traitement de ces maladies, il est important de considérer les rôles de chaque sous-population.

1.2 Les maladies infectieuses

Comme précisé dans le [chapitre 1](#), l'activité phagocytaire des macrophages constitue une ligne de défense importante contre une attaque par des agents infectieux. Cependant, plusieurs pathogènes sont capables de détourner cette fonction et d'exploiter les macrophages comme leur site de réplication de choix. Ils favorisent leur propre internalisation tout en évitant d'être dégradés en empêchant la fusion phagosome-lysosome, en résistant à l'action des enzymes digestives des lysosomes, ou alors en s'échappant vers le cytoplasme par rupture de la vésicule d'internalisation. Ceci constitue une stratégie d'échappement au système immunitaire au cours de leur dissémination à travers l'organisme, dont voici deux exemples.

1.2.1 Le SIDA

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1) est un rétrovirus infectant l'Homme et responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), qui est un état affaibli du système immunitaire le rendant vulnérable à de multiples infections opportunistes. Bien que capable de se répliquer à l'intérieur de plusieurs types cellulaires, le virus possède deux réservoirs préférentiels majeurs à l'intérieur de l'hôte : les cellules T CD4+ et les macrophages. Les macrophages sont largement reconnus comme une cible cellulaire précoce du VIH-1, suivis ensuite par l'infection des cellules T provoquant leur déplétion subséquente et l'immunopathogenèse associée au SIDA (Perno et al., 2006). Contrairement aux cellules T, les macrophages sont plus résistants aux effets cytopathiques du virus et sont capables de mieux échapper aux actions défensives du système immunitaire de l'individu infecté. Par conséquent, les macrophages infectés par le VIH-1 sont capables de produire et d'héberger le virus pendant de longues périodes. Avec sa capacité à traverser la barrière endothéliale, un macrophage infecté représente donc un agent important pour la propagation du VIH-1 dans tous les tissus et organes du corps, notamment le cerveau (provoquant des démences). Ainsi, les macrophages infectés sont d'une importance critique au cours de la pathogenèse du VIH-1 en étant un acteur majeur de la transmission, la persistance et la dissémination du virus à travers le corps de l'hôte. Cet aspect est étudié dans l'équipe dans laquelle j'ai effectué ma thèse.

1.2.2 La tuberculose

La tuberculose est une maladie infectieuse transmissible et non immunisante, avec des signes cliniques variables. Elle est provoquée par une mycobactérie du complexe *tuberculosis*

correspondant à différents germes et principalement à *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). L'infection a lieu suite à l'inhalation de gouttelettes sous forme d'aérosol comportant des bacilles viables. Une fois inhalés, les bacilles sont phagocytés dans les voies aériennes des poumons par les macrophages alvéolaires résidents et les cellules dendritiques. Les phagocytes infectés par Mtb peuvent migrer de l'espace alvéolaire vers l'interstitium pulmonaire où ils vont recruter d'autres macrophages ainsi que d'autres leucocytes afin de former des structures organisées appelées des granulomes, caractéristiques pathologiques de la tuberculose. Ceux-ci ont longtemps été considérés comme un bénéfice pour l'hôte en contenant la propagation de mycobactéries dans l'organisme notamment grâce à la proximité des lymphocytes. Cependant, en 2009, Davis et Ramakrishnan ont démontré que les granulomes jouaient un rôle dans la dissémination des infections tuberculeuses *via* l'évasion des macrophages infectés de la structure granulomateuse par des routes lymphatiques ou hématogènes, formant ainsi des granulomes secondaires (Davis & Ramakrishnan, 2009) (figure 13). Ainsi, les macrophages hôtes infectés jouent des rôles cruciaux dans la pathogenèse de la tuberculose puisqu'ils permettent non seulement la prolifération libre de la mycobactérie en leur sein, mais également leur prolifération à travers l'organisme de l'individu infecté, résultant en une maladie primaire progressive ou une maladie réactivée après une période de latence chez environ 10% des individus infectés.

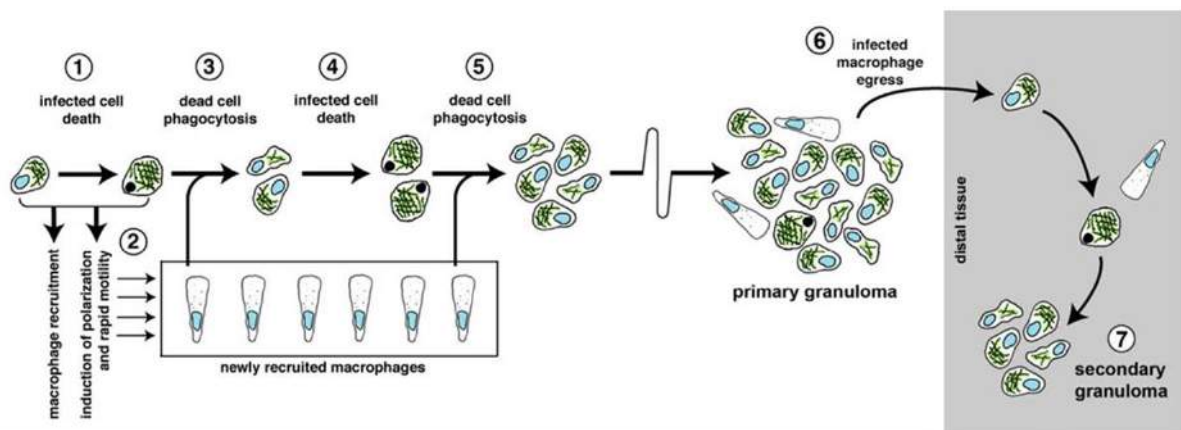


Figure 13 : Les macrophages au cours d'une infection avec *Mycobacterium tuberculosis* (adapté de Davis and Ramakrishnan, 2009). Une cellule infectée (1) recrute de nouveaux macrophages et induit leur motilité rapide (2). Une fois morte, la cellule est phagocytée par les macrophages recrutés (3). Alors que la bactérie se prolifère, ces cellules meurent à leur tour (4) et sont phagocytées par d'autres macrophages recrutés (5). Les cellules infectées quittent le granulome primaire (6) pour former des granulomes secondaires (7).

Comme nous le montrent ces divers pathogènes complexes et de natures très variées, les macrophages et leurs nombreuses fonctions peuvent être détournés et mis au profit de la

maladie. Ainsi, plusieurs stratégies thérapeutiques ciblant les macrophages sont actuellement envisagées et seront décrites dans le [paragraphe 2.3](#).

2 Le rôle des macrophages dans le cancer

Le cancer désigne un groupe de maladies caractérisées par une prolifération cellulaire incontrôlée avec un potentiel d'invasion et de dissémination vers d'autres organes de l'organisme. Il existe aujourd'hui plus d'une centaine de formes de cancer pouvant affecter l'Homme et il est estimé qu'en 2012, plus de 14 millions de nouveaux cas sont apparus dans le monde, provoquant environ 8,2 millions de décès.

2.1 Les liens entre cancer et inflammation

Les tumeurs acquièrent des mutations sur des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeur, induisant leur progression vers un stade de malignité. Leur microenvironnement est composé de vaisseaux sanguins, de matrice extracellulaire, de cellules tumorales mais aussi de cellules non-tumorales. Parmi celles-ci, il est possible de retrouver par exemple des fibroblastes, des adipocytes et des leucocytes, tels que des lymphocytes, des cellules dendritiques, des neutrophiles et, notamment, des macrophages. Bien que la plupart des recherches sur le cancer aient été concentrées sur ces modifications génétiques, et la plupart des thérapies dirigées contre les cellules tumorales elles-mêmes, il est devenu apparent que les cellules non-malignes présentes dans le microenvironnement évoluent avec la tumeur et fournissent un support essentiel à son phénotype malin (Joyce & Pollard, 2009). En effet, des liens entre inflammation et cancer ont commencé à émerger au cours du 19^{ème} siècle, les premiers étant l'observation que les tumeurs prennent souvent origine à des sites d'inflammation chronique, et que des cellules inflammatoires telles que les macrophages étant présentes dans des biopsies de tumeur (F. Balkwill & Mantovani, 2001; Mantovani, Romero, Palucka, & Marincola, 2008). Plus récemment, Mantovani et collègues ont proposé le terme de « *smoldering inflammation* » afin de caractériser une réponse inflammatoire persistante pouvant participer à l'initiation de la tumeur (F. R. Balkwill & Mantovani, 2012). Cette réponse inflammatoire peut être générée suite à une variété de stimuli comme, par exemple, l'obésité qui est associée à un risque plus élevé pour certains cancers tels que le cancer du sein (Grivennikov, Greten, & Karin, 2010). En effet, l'obésité est caractérisée par une inflammation systémique renforcée, ainsi qu'une augmentation du nombre de structures inflammatoires en couronne constituées de macrophages et d'adipocytes au niveau du sein. D'autres inflammations persistantes sont associées à l'initiation de cancers et peuvent être

causées par une infection chronique virale, telle que l'hépatite B dans le foie, une infection bactérienne, telle que *Helicobacter pylori* dans l'estomac, ou une exposition continue à certains irritants, tels que l'amiante dans les poumons (F. Balkwill, Charles, & Mantovani, 2005; Brown et al., 2008). De plus, des conditions inflammatoires telles que la maladie de Crohn augmentent considérablement les risques d'un cancer colorectal (F. R. Balkwill & Mantovani, 2012; Coussens & Werb, 2002). Le [tableau 3](#) énumère quelques exemples de liens connus entre certains cancers et des conditions inflammatoires.

Malignancy	Inflammatory stimulus/condition
Bladder	Schistosomiasis
Cervical	Papillomavirus disease/talc/tissue remodelling
Ovarian	Pelvic inflammatory
Gastric	H pylori induced gastritis
MALT lymphoma	H pylori
Oesophageal	Barrett's metaplasia
Colorectal	Inflammatory bowel disease
Hepatocellular	Hepatitis virus (B and C)
Bronchial	Silica, asbestos, cigarette smoke
Mesothelioma	Asbestos
Kaposi's sarcoma	Human herpesvirus type 8

Tableau 3 : Liens entre cancer et inflammation (extrait de Balkwill and Mantovani, 2001)

2.2 Les macrophages associés aux tumeurs (TAMs)

2.2.1 Les macrophages et le cancer

L'inflammation, comme je l'ai décrite précédemment, implique très fortement les macrophages à travers leur production de cytokines. Ils sont parmi les cellules non-tumorales les plus abondantes dans la tumeur (jusqu'à 50% de la masse tumorale) et de très nombreuses études ont montré que plutôt d'avoir un rôle tumoricide, ils vont adopter un phénotype pro-tumoral à la fois dans le site primaire et dans les sites métastatiques (Biswas, Allavena, & Mantovani, 2013). En effet, une méta-analyse récente rapporte que 80% des études cliniques montrent une corrélation entre la densité des macrophages et un pronostic faible des patients (Bingle, Brown, & Lewis, 2002) (notamment par une plus grande invasivité et formation de métastases) dans le cas de plusieurs cancers tels que le cancer de la thyroïde ou des poumons et le carcinome hépatocellulaire (Chen et al., 2005; Ryder, Ghossein, Ricarte-Filho, Knauf, & Fagin, 2008; Zhu et al., 2008) (voir le [tableau 4](#) pour une corrélation entre pronostic et densité

de macrophages) (C. E. Lewis & Pollard, 2006). Il faut toutefois noter que ce n'est pas toujours le cas : en effet une densité élevée de macrophages peut favoriser la survie du patient dans le cas du cancer du pancréas (Kim et al., 2008). De plus, une autre étude a également montré que les macrophages du foie, les cellules de Kupffer, phagocytent et éliminent les cellules tumorales, et que leur déplétion est associée à une croissance tumorale plus forte et une capacité métastatique plus élevée (Heuff et al., 1993; Oosterling et al., 2005). Toutefois, ces résultats contrastent avec d'autres études montrant que les cellules de Kupffer fournissent des agents mitogènes essentiels au carcinome hépatocellulaire (Karin & Greten, 2005). Il faut toutefois noter que ces études ont été réalisées avec des modèles de tumeur différents (injection de cellules CC531 contre injection de diethylnitrosamine) et donc les interactions macrophages-cellules tumorales peuvent être différentes.

Prognosis		
Favorable	Poor	No correlation
	Breast*, # Prostate*	
	Colon carcino Endometrial*	
Stomach	Bladder*, # Kidney*	
Colorectal	Lung carcinoma	High-grade astrocytomas
Melanoma	Hepatocellular carcinoma	Cervical carcinoma
Pancreas	Esophageal superficial# Squamous cell carcinoma* Malignant uveal melanoma* Follicular lymphoma Thyroid	

* Correlation with increased tumor angiogenesis
Correlation with increased involvement of lymph nodes

Tableau 4 : Corrélation entre pronostic et un nombre élevé de macrophages dans les cancers (adapté de Lewis and Pollard, 2006)

Comme je l'ai déjà précisé dans le chapitre précédent, la différenciation, la croissance et le recrutement de macrophages sont régulés par de nombreux facteurs de croissance, dont le M-CSF et le GM-CSF, et des chimiokines telle que le CCL2. Plusieurs études ont montré à la fois chez la souris et chez l'Homme qu'une surexpression du M-CSF était associée à un mauvais pronostic dans les cancers du sein, de l'ovaire, de l'endomètre, de la prostate, du côlon et le carcinome hépatocellulaire, entre autres (Grobewska et al., 2007; Lin, Gouon-Evans, Nguyen, & Pollard, 2002; Mroczko et al., 2007; Sapi & Kacinski, 1999; H. O. Smith et al., 1995; Zhu et al., 2008). De même, le CCL2 est aussi surexprimé dans de nombreux

cancers (Kedrin et al., 2008) et représente également un signe de mauvais pronostic dans les cas de cancer du sein, du côlon et de la thyroïde (Bailey et al., 2007; Saji et al., 2001; Tanaka et al., 2009; Yoshidome et al., 2009), alors que son absence permet une meilleure survie chez des patientes de cancer du col utérin (Zijlmans et al., 2006). Toutefois, ces observations ne sont pas universelles à tous les cancers puisqu'au cours de mélanomes, il semble y avoir une relation inverse entre les expressions du CCL2 et du M-CSF (celui-ci étant négativement corrélé avec le caractère agressif et invasif de la maladie), bien que la densité de macrophages reste un signe de mauvais pronostic (Varney, Johansson, & Singh, 2005). Malgré le grand nombre d'études montrant le rôle pro-tumoral de ces molécules connues comme participant à la biologie des macrophages, il est important de noter que dans certains cas comme des adénocarcinomes, les cellules tumorales sont capables à la fois de sécréter ces molécules et d'exprimer leurs récepteurs, au cours d'une signalisation autocrine qui va favoriser leur phénotype malin (Mantovani, Allavena, Sica, & Balkwill, 2008; Patsialou et al., 2009; Scholl et al., 1994; H. O. Smith et al., 1995). Ainsi, de nouvelles preuves expérimentales ont dûes être obtenues chez la souris pour montrer l'implication réelle des macrophages. En effet, une ablation génétique du M-CSF dans le modèle de cancer du sein murin exprimant l'oncoprotéine *polyoma middle T* (PyMT) a pour effet de réduire considérablement la densité de macrophages dans les tumeurs, de ralentir la progression tumorale vers le stade malin et d'inhiber la formation de métastases (Lin, Nguyen, Russell, & Pollard, 2001). Dans ces expériences, seuls les macrophages expriment le récepteur au M-CSF. En revanche, une surexpression de M-CSF dans les tumeurs favorise un recrutement plus précoce des macrophages et accélère la progression tumorale et la formation de métastases. D'autres études réalisées ont produit des résultats similaires avec des stratégies différentes (interférence par ARN ou anticorps dirigés contre le M-CSF ; déplétion de macrophages par du clodronate encapsulé dans des liposomes) et dans des modèles de cancer du côlon (Oguma et al., 2008), des poumons (Y. N. Kimura et al., 2007), de l'ovaire (Robinson-Smith et al., 2007), de la prostate (Halin, Rudolfsson, Van Rooijen, & Bergh, 2009), de mélanome humain (Gazzaniga et al., 2007), de téréatocarcinome (Zeisberger et al., 2006) et d'ostéosarcome (Kubota et al., 2009). Une autre preuve de la corrélation entre inflammation/macrophages et cancer fut fournie par Deng et collègues qui montrent que l'ablation génétique du facteur de transcription anti-inflammatoire *Stat3* dans les macrophages a pour conséquence une réponse inflammatoire chronique dans le côlon, suffisante pour induire un adénocarcinome invasif (Deng et al., 2010). D'un point de vue mécanistique, cette inflammation peut favoriser l'initiation tumorale en créant un environnement mutagène, soit directement par génération de

radicaux libres, soit indirectement par des altérations dans le microbiote et les barrières anatomiques, permettant ainsi à des bactéries génotoxiques d'avoir accès aux cellules épithéliales (Dedon & Tannenbaum, 2004; Jobin, 2013). De plus, les cellules de Langerhans, un type de macrophages/cellules dendritiques, peuvent favoriser la cancérogenèse au niveau de la peau par conversion métabolique de carcinogènes vers leur état actif (Modi et al., 2012). Les macrophages peuvent également produire des facteurs de croissance et cytokines pouvant stimuler la croissance de cellules épithéliales ayant acquis des mutations cancérogènes spontanées (Grivennikov et al., 2010). Ces mutations peuvent en retour entraîner le recrutement de cellules inflammatoires et donc la mise en place d'un cercle « vicieux » alimentant la progression du cancer (F. R. Balkwill & Mantovani, 2012). Il existe donc de très nombreuses preuves montrant le lien causal des macrophages dans l'initiation tumorale et le développement par leur rôle central de médiateurs de l'inflammation.

Les macrophages impliqués dans ces réponses inflammatoires entraînant l'initiation tumorale sont activés d'un point de vue de l'immunité. Cependant, une fois que la tumeur est établie, ils sont rééduqués et deviennent pro-tumoraux, et sont couramment appelés des macrophages associés aux tumeurs (TAMs). La transition de croissance bénigne vers un cancer invasif a lieu parallèlement à une transition des cytokines et facteurs de croissance du microenvironnement tumoral d'une réponse de type Th1 inflammatoire vers une réponse de type Th2. Ce nouveau microenvironnement est dominé par des molécules telles que l'IL-4, le TGF- β 1 et l'arginase 1, synthétisées par des cellules T CD4+ et/ou les cellules tumorales. Ceci a pour conséquence la polarisation des macrophages vers un phénotype de type M2 ([figure 14](#)) (Sica, Larghi, et al., 2008). Toutefois, comme précisé dans le chapitre précédent, la distinction M1 et M2 n'est pas suffisante pour décrire avec exactitude le phénotype des TAMs, et il est possible de définir plusieurs sous-populations de TAMs (Laoui, Movahedi, et al., 2011; Laoui, Van Overmeire, et al., 2011). De plus, divers facteurs peuvent influencer le phénotype des TAMs, notamment l'hypoxie qui est une caractéristique importante des tumeurs solides. En effet, plusieurs études ont montré que les tumeurs solides avancées présentent des régions d'hypoxie au sein de la masse tumorale et que les TAMs s'accumulent en très grand nombre dans les zones avasculaires dans de nombreuses tumeurs humaines (Murdoch, Giannoudis, & Lewis, 2004). Le *vascular endothelial growth factor A* (VEGFA) (J. S. Lewis, Landers, Underwood, Harris, & Lewis, 2000), l'endothéline-2 (Grimshaw, Wilson, & Balkwill, 2002) et le *endothelial monocyte-activating polypeptide II* (EMAPII) (Matschurat et al., 2003) sécrétés par les TAMs et les cellules tumorales sont vraisemblablement impliqués dans ce recrutement des macrophages vers les régions

hypoxiques. L'hypoxie va ensuite diriger la polarisation des macrophages vers un phénotype pro-tumoral, notamment *via* le facteur de transcription *hypoxia-inducible factor* (HIF)-1 α (Burke et al., 2002; Talks et al., 2000). Une étude récente montre que l'infiltration myéloïde dans des tumeurs de carcinome pulmonaire chez la souris inclut deux sous-populations distinctes de TAMs CD11b^{hi} F4/80^{hi} Ly6C^{low}, désignées TAMs MHC-II^{low} et TAMs MHC-II^{hi}, toutes les deux dérivées de monocytes Ly6C^{hi} infiltrés (Laoui et al., 2014). Les TAMs MHC-II^{low} expriment de plus hauts niveaux de marqueurs M2 et se concentrent dans les régions les plus hypoxiques de la tumeur. Les résultats montrent en fait que l'hypoxie n'est pas un facteur majeur influençant la polarisation M2 des TAMs mais va plutôt affiner ce phénotype M2 en TAMs MHC-II^{low}.

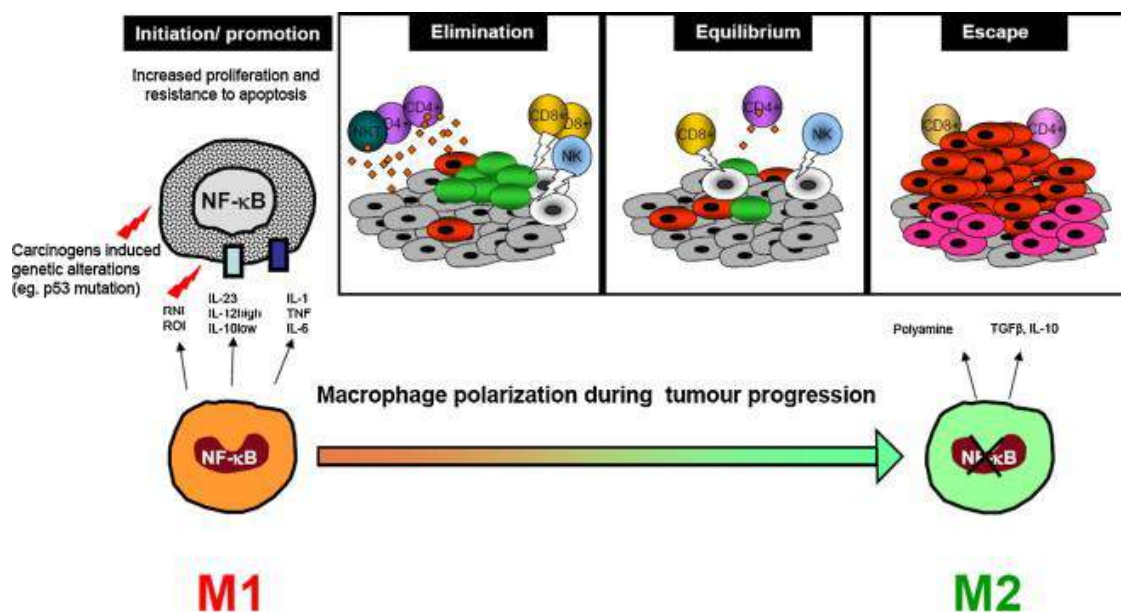


Figure 14 : La polarisation des macrophages pendant la progression tumorale (extrait de Sica et al., 2008)

Ainsi, une des conditions essentielles pour la survie des tumeurs semble être l'acquisition de mutations ou de modifications épigénétiques nécessaires à la synthèse des facteurs permettant la repolarisation des macrophages résidents et le recrutement de nouveaux monocytes. De nombreuses études cliniques montrent d'ailleurs que l'infiltration et la présence de macrophages au sein des tumeurs sont associées à un mauvais pronostic des patients.

2.2.2 Les origines des TAMs

Bien que les macrophages puissent avoir des origines autres que la moelle osseuse (telles que le sac vitellin ou la rate, qui possède une activité hématopoïétique), de nombreuses

études chez la souris montrent que la grande majorité des TAMs proviennent de la population Ly6C^{hi} de monocytes circulants issus de la moelle osseuse, dans des modèles de greffe tumorale (Movahedi et al., 2010), de tumeur primaire murine (Franklin et al., 2014) et de métastases pulmonaires (B. Z. Qian et al., 2011). De plus, des expériences récentes utilisant des monocytes de la moelle osseuse et de la rate exprimant un marqueur fluorescent photoconvertible ont montré que la contribution splénique est négligeable et que la moelle osseuse est la source primaire de monocytes pouvant donner des TAMs dans un modèle de greffe syngénique de carcinome Lewis Lung (Shand et al., 2014).

Comme précisé dans le paragraphe précédent, le M-CSF est le régulateur majeur des populations de macrophages et serait le principal responsable du recrutement de macrophages vers la tumeur. Toutefois, lors d'expériences d'ablation du M-CSF, la surexpression du VEGFA (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire) a également pour effet un recrutement important de macrophages dans la tumeur (Lin et al., 2007), montrant ainsi que le M-CSF et le VEGFA sont des « recruteurs » indépendants de macrophages vers la tumeur dans des modèles murins. Il est cependant plus probable que ces facteurs agissent en collaboration afin d'augmenter le nombre de macrophages au sein de la tumeur par recrutement de monocytes et/ou par prolifération des cellules recrutées ou résidentes. Par exemple, le M-CSF sécrété par des cellules murines de sarcome est capable de stimuler l'activité proliférative des TAMs (Bottazzi et al., 1990).

Chez l'Homme, les origines des TAMs dans plusieurs cancers restent toutefois encore incertaines. D'ailleurs, les mécanismes impliqués dans leur recrutement et leur différenciation sont probablement différents et plus complexes dans les cancers exposés à des produits microbiens, tel que le cancer du côlon, comparés aux cancers de sites stériles. En effet, contrairement aux sites stériles, la présence de bactéries en plus de celle de cellules tumorales représente un facteur supplémentaire pouvant moduler la réponse immunitaire des macrophages. Les liens entre infection et cancer sont encore peu connus, mais il fut observé que des patients atteints de cancer qui développaient des infections post-opératoires sévères au site tumoral présentaient une régression tumorale spontanée et maintenue (Coley, 1991). Une hypothèse serait que la présence bactérienne entraînerait une réponse inflammatoire « favorable » *via* les TLRs, ce qui favoriserait la polarisation anti-tumorale M1 des macrophages. Toutefois, d'autres études sont nécessaires afin de vérifier cette hypothèse.

2.2.3 Les fonctions des TAMs

Les TAMs, par la reprogrammation de leur polarisation vers un phénotype de type M2, reprennent en quelques sortes leur fonction dans la réparation tissulaire. En plus de sécréter une batterie de facteurs favorisant la prolifération tumorale (*vascular endothelial growth factor* ou VEGF, IL-10, TGF- β , *epithelial growth factor* ou EGF...) (Mantovani et al., 2002; Sica, Allavena, & Mantovani, 2008; Solinas et al., 2010), ils vont également participer à la croissance tumorale par l'angiogénèse, le remodelage tissulaire et la suppression de l'immunité adaptative (figure 15) (J. W. Pollard, 2004).

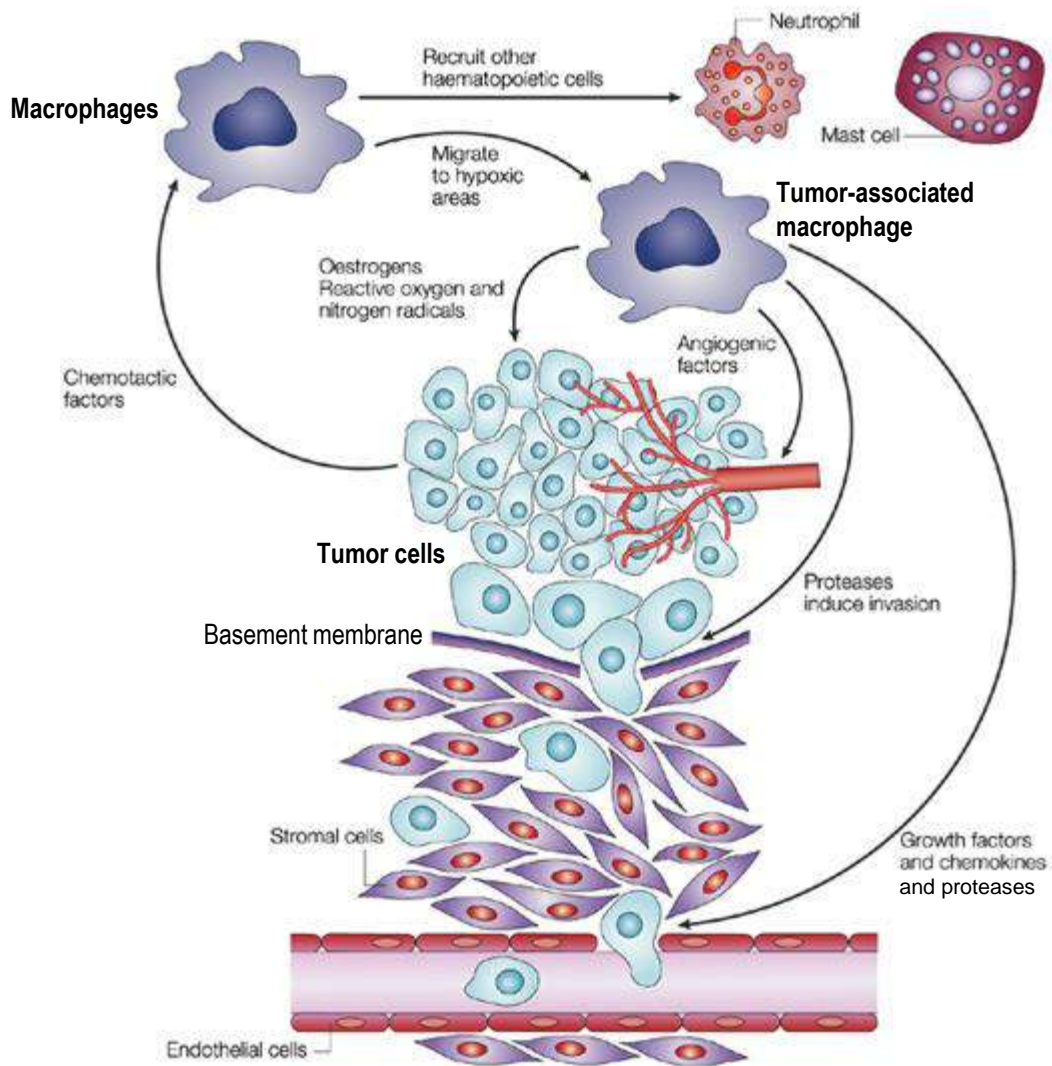


Figure 15 : Les fonctions des macrophages associés aux tumeurs (adapté de Pollard, 2004). Les macrophages sont recrutés sur le site tumoral (attraction des zones hypoxiques et des cytokines libérées, entre autres, par les cellules tumorales) où ils stimulent l'angiogénèse. Ils recrutent également d'autres cellules comme les neutrophiles qui rempliront les mêmes tâches. De plus, les TAMs sécrètent des protéases qui facilitent l'évasion des cellules tumorales vers le milieu environnant et par la suite dans la circulation. Enfin ils sécrètent aussi de nombreux facteurs prolifératifs et anti-apoptotiques.

2.2.3.1 *L'angiogenèse*

La vascularisation est nécessaire pour qu'une tumeur puisse grossir au-delà de 2 à 3 mm³ et métastaser (Guruvayoorappan, 2008). Il est bien connu que la croissance et la propagation de tumeurs malignes requiert la néo-angiogenèse, c'est-à-dire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de la vascularisation existante, permettant leur alimentation en oxygène et nutriments et l'élimination des déchets. Cette étape s'appelle le *switch* angiogénique. Les TAMs jouent un rôle important dans la régulation de cette néo-vascularisation et expriment un large répertoire de facteurs de croissance pour promouvoir la néo-angiogenèse, tels que le VEGF, le *platelet-derived growth factor* (PDGF) et le TGF- β . Bien que tous les TAMs possèdent de telles fonctions, la sous-population de macrophages exprimant Tie2 (les TEMs) joue un rôle critique dans l'angiogenèse tumorale (C. E. Lewis, De Palma, & Naldini, 2007). Les TEMs sont dérivés de monocytes circulants exprimant Tie2 et sont recrutés vers les zones hypoxiques des tumeurs solides par des facteurs tels qu'Ang-2 (ligand de Tie2) et CXCL12 (ligand de CXCR4). En plus de cela, des protéases dérivées des TAMs telles que des MMPs (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 et MMP-12), la plasmine et l'urokinase participent à l'angiogenèse. Les macrophages favorisent aussi la lymphangiogenèse et donc, avec l'angiogenèse, la métastase des cellules tumorales.

2.2.3.2 *La migration et la formation de métastases*

Les TAMs jouent un rôle important à plusieurs stades du développement des métastases, c'est-à-dire de l'évasion des cellules tumorales du site primaire jusqu'à leur établissement dans des sites éloignés. Suite à leur détachement de la tumeur primaire, les cellules tumorales mettent en place un processus de migration/évasion permettant leur mise en contact avec les vaisseaux sanguins ou lymphatiques. Le M-CSF libéré par les cellules tumorales stimule les macrophages à migrer et à produire l'*epidermal growth factor* (EGF), activant la migration des cellules tumorales et favorisant leur transition épithélio-mésenchymateuse, c'est-à-dire le passage d'un phénotype épithélial vers un phénotype mésenchymateux entraînant l'augmentation des capacités d'invasion, des capacités migratoires, des capacités d'échappement à l'apoptose et des capacités de production de la matrice extracellulaire (Patsialou et al., 2009). D'ailleurs, la matrice joue un rôle majeur dans la capacité migratoire et envahissante des cellules tumorales. Il a été montré que les macrophages peuvent améliorer l'adhérence des cellules tumorales aux composants de la matrice extracellulaire telle que la fibronectine (Sangaletti et al., 2008). Ils sont également capables de stimuler la fibrillogenèse, c'est-à-dire le développement de fibrilles composant les fibres de collagène. Le collagène fibrillaire I améliore le processus d'invasion puisque les

cellules tumorales et les macrophages se déplacent dix fois plus rapidement le long de ces structures que dans le reste du stroma. Ceci a aussi pour conséquence le recrutement des cellules tumorales vers les vaisseaux sanguins sur lesquels s'ancrent les fibrilles de collagène. Les TAMs produisent également des protéases, telles que des cathepsines, MMPs et protéases à sérine, qui vont induire une dégradation protéolytique de la matrice extracellulaire et ainsi faciliter l'évasion des cellules tumorales à travers le stroma dense (Giraud, Inoue, & Hanahan, 2004; Guet et al., 2011; Kessenbrock, Plaks, & Werb, 2010; Liu et al., 2013). A plusieurs étapes de la croissance tumorale, notamment au cours de la transition vers un état métastatique, les macrophages peuvent être retrouvés à des sites de dégradation de la membrane basale, permettant ainsi aux tumeurs d'exploiter leurs capacités de remodelage matriciel. L'intravasation, c'est-à-dire l'entrée des cellules tumorales dans les vaisseaux sanguins, est également facilitée par les TAMs, dont l'action tend à détériorer la barrière endothéliale. Lors de l'établissement d'une nouvelle métastase, les cellules cancéreuses ainsi que les cellules stromales du site métastatique potentiel libèrent du CCR2 et recrutent des monocytes inflammatoires qui vont faciliter l'extravasation des cellules tumorales en produisant du VEGF (augmentation de la perméabilité vasculaire) (Lin et al., 2007).

Avant leur colonisation par des cellules tumorales métastatiques, les organes secondaires subissent des changements dans leur microenvironnement local, appelé la « niche pré-métastatique ». La tumeur primaire a une grande influence sur le devenir métastatique. Avant même l'arrivée des cellules tumorales, elle sécrète des facteurs (S100A8 et 9) qui attirent des cellules myéloïdes vers des sites distants (Hiratsuka, Watanabe, Aburatani, & Maru, 2006). Des études récentes ont montré que le recrutement des macrophages est une étape importante pour la survie des cellules métastatiques et la formation de ces niches pré-métastatiques. Gil-Bernabe et collègues ont observé chez la souris que des facteurs tissulaires dérivés de la tumeur (telle que le facteur de coagulation III ou CD142) favorisent la formation de caillots provoquant un recrutement de macrophages et par conséquent une meilleure survie des cellules tumorales (Gil-Bernabe et al., 2012). De plus, Erler et collègues ont identifié le rôle de la lysyl oxydase (LOX) dans la formation des niches. LOX, sécrétée par les cellules tumorales, stabilise le réseau de matrice extracellulaire aux sites pré-métastatiques par pontage covalent du collagène IV. Les cellules myéloïdes vont ensuite adhérer au collagène et produire la MMP2. Celle-ci va cliver le collagène et favoriser le recrutement additionnel de cellules myéloïdes (Erler et al., 2009). Il est proposé que ces niches servent de réservoir de monocytes qui peuvent être ainsi rapidement mobilisées lors de l'arrivée des cellules tumorales pour favoriser l'implantation d'une nouvelle tumeur (B. Z. Qian & Pollard, 2010).

Il est par ailleurs proposé qu'une sous-population spécifique de macrophages (exprimant fortement CX3CR1, CCR2 et VEGFR1 mais faiblement Tie2 et CXCR4) soit recrutée au site métastatique pour faciliter l'extravasation des cellules tumorales (B. Qian et al., 2009).

2.2.3.3 *L'immunosuppression*

Dans la grande majorité des tumeurs, il ne semble pas y avoir une réelle limitation immunologique à la croissance tumorale. Puisque les lymphocytes sont présents dans la tumeur, ceci suggère donc que le microenvironnement tumoral est capable de passer la réponse immunitaire sous silence (Swann et al., 2008). Les TAMs vont participer grandement à ce mécanisme d'immunosuppression en diminuant l'expression d'activateurs immunologiques tels que l'IL-12, l'IL-18 et les voies de signalisation TLR (et donc un défaut d'activation de NF- κ B) (Biswas et al., 2006; Ojalvo, King, Cox, & Pollard, 2009). Les TAMs peuvent également inhiber les réponses des cellules T cytotoxiques par plusieurs mécanismes. Par exemple, les macrophages sécrètent l'IL-10 qui va induire l'expression de *programmed death ligand* (PD)-L1 par les monocytes et supprimer les réponses T cytotoxiques (Kuang et al., 2009). Ils peuvent également diminuer les niveaux d'IL-2 et affecter l'expression de CD25 et la voie de signalisation STAT5 des cellules T cytotoxiques, ce qui affaiblit leur prolifération (Schoupe et al., 2013). Dans les cancers humains de l'ovaire, les macrophages synthétisent le CCL22, une chimiokine qui régule le recrutement de cellules T régulateurs (T_{reg}) qui vont également supprimer ces réponses (Curiel et al., 2004). Dans les xéno greffes de tumeur mammaire, l'activité immunosuppressive des macrophages se fait par synthèse de prostaglandine (PG)E2 et du TGF- β (Torroella-Kouri et al., 2009).

Au niveau des sites métastatiques, les macrophages vont également participer à la survie des cellules tumorales par immunosuppression en libérant des cytokines anti-inflammatoires telles que le TGF- β 1, l'IL-10 et l'arginase I. Ceci a pour conséquence une polarisation des macrophages vers un phénotype M2 (anti-inflammatoire), une diminution de la maturation et des fonctions des cellules présentatrices d'antigène et des cellules T, et donc globalement un atténuation de la réponse immunitaire acquise antitumorale.

2.3 **Les thérapies ciblant les TAMs**

A cause de leurs multiples fonctions pro-tumorales, les monocytes et TAMs représentent des cibles thérapeutiques très intéressantes contre les cancers. Plusieurs stratégies ciblant les macrophages ont été conçues, visant soit la réduction du pool de macrophages dans ces tumeurs, soit la modification fonctionnelle de ces cellules (**figure 16**) (Richards, Hettinger, & Feuerer, 2013).

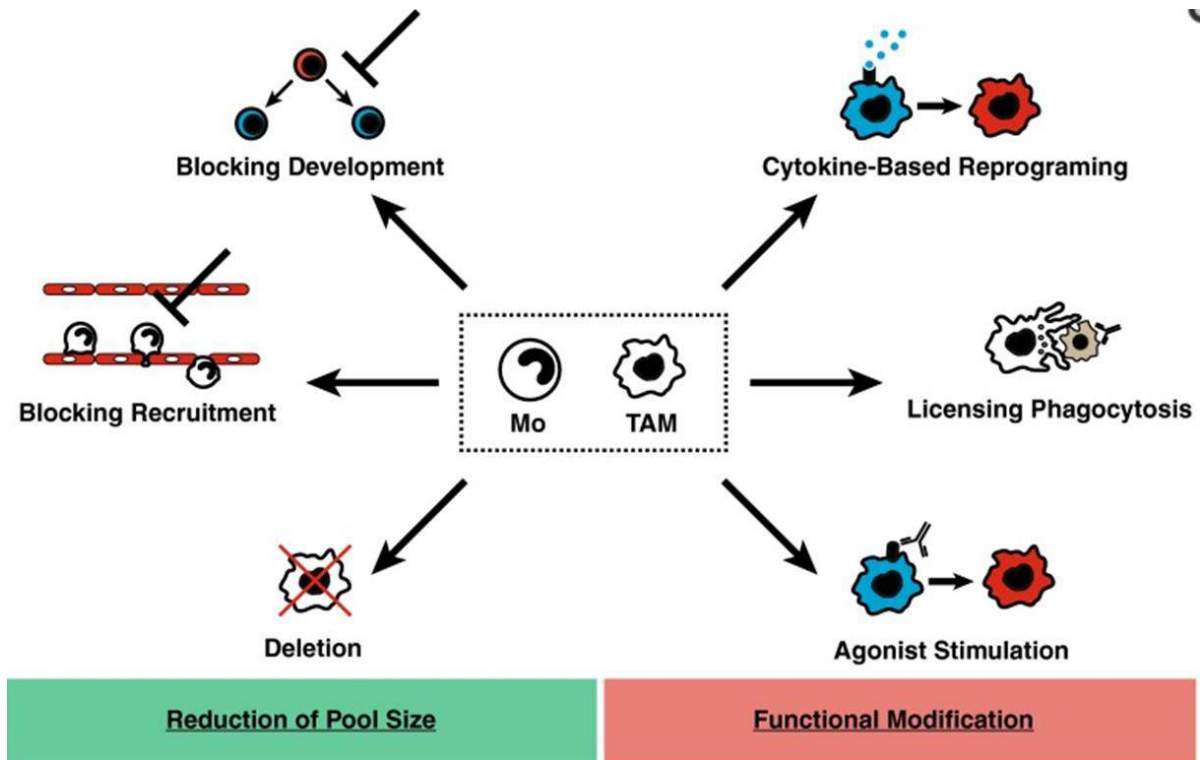


Figure 16 : Les stratégies anti-cancéreuses ciblant les macrophages (extrait de Richards, Hettinger and Feuerer, 2013)

2.3.1 La déplétion des monocytes/macrophages

Ces thérapies sont basées sur l'utilisation de composés cytotoxiques contre les monocytes/macrophages affectant leur localisation, leur renouvellement et leur fonction phagocytaire. Ce n'est que depuis récemment que leur faculté à dépler les monocytes et macrophages fut étudiée. La Trabectédine (aussi appelée Yondelis), un alcaloïde tetrahydroisoquinoline produit par le tunicier marin *Ecteinascidia turbinata*, fut découverte grâce à un vaste criblage anti-cancéreux de plantes et substances marines réalisé par le National Cancer Institute dans les années 50 et 60. Il s'agit d'une molécule particulièrement cytotoxique pour les monocytes et macrophages humains et murins, ainsi que les TAMs. Elle inhibe la production du CCL2 et de l'IL-6, sans affecter d'autres cellules (dont les neutrophiles et les lymphocytes) de manière significative (Allavena et al., 2005). Le ciblage spécifique des macrophages se fait par activation d'un « *death receptor* » (*tumor necrosis factor receptor*) qui leur est spécifique, ce qui va activer la caspase-8 et déclencher l'apoptose (Germano et al., 2013). La Trabectédine fut récemment immatriculée en Europe pour le traitement de sarcomes des tissus mous et du cancer de l'ovaire et participe présentement à de nombreux essais cliniques pour d'autres types de cancer (D'Incalci, Badri, Galmarini, & Allavena, 2014). Les bisphosphonates constituent une autre classe d'anti-néoplasiques en

cours d'essai pour leur faculté à dépléter les macrophages *in vivo*. Ils représentent le traitement primaire contre les métastases osseuses, et le traitement secondaire contre de nombreux types de tumeurs tels que le cancer du sein, de la prostate et les myélomes (Morgan & Lipton, 2010). Afin de sélectivement cibler les macrophages, les molécules doivent être encapsulées dans des liposomes qui sont spécifiquement phagocytés et dégradés par les macrophages. Par exemple, l'utilisation de clodronate encapsulé dans des liposomes a pu permettre de réduire la croissance tumorale dans certains modèles de tumeur tels que les mélanomes chez la souris (Gazzaniga et al., 2007). Toutefois, un effet secondaire de ces traitements est une susceptibilité plus élevée aux infections due à la diminution du nombre de macrophages, nécessaires dans les réponses immunitaires.

2.3.2 Le ciblage d'antigènes de surface spécifiques des TAMs

Des stratégies de ciblage spécifique d'antigènes tumoraux ont été largement étudiées et développées pour des usages cliniques (Zafir-Lavie, Michaeli, & Reiter, 2007). Ils ont été utilisés pour cibler et tuer des cellules tumorales ainsi que pour bloquer les facteurs favorisant leur croissance. Le principe de cette technique est d'identifier des antigènes de surface spécifiques des TAMs afin de développer des anticorps monoclonaux contre eux ou d'augmenter leur reconnaissance et leur élimination par les cellules T cytotoxiques. Malheureusement, la grande hétérogénéité des populations de macrophages et la redondance de marqueurs de surface cellulaires ont rendu difficile l'utilisation de ces techniques. Toutefois, des analyses récentes d'expression génique et protéique ont pu identifier des profils TAM-spécifiques potentiels qui pourraient être utilisés comme antigènes en thérapie (Lewen et al., 2008; Movahedi et al., 2010). Par exemple, des vaccins ADN contre des épitopes du CMH de classe I dérivés de la légumaine ont été développés pour générer des cellules T cytotoxiques spécifiques des TAMs. La légumaine est une protéine de stress fortement surexprimée par les TAMs dans le microenvironnement tumoral. Ces vaccins induisent une réponse T CD8+ contre les TAMs et protègent les souris de challenges tumoraux létaux dans un modèle de cancer du sein en bloquant l'angiogenèse, la croissance tumorale et la métastase (Lewen et al., 2008). De plus, Mohavedi et collègues ont généré un anticorps à domaine unique (*single domain antibody* ou sdAb), aussi appelé « nanobody », ciblant spécifiquement le récepteur au mannose des macrophages (MMR ou CD206), fortement exprimé par certaines sous-populations de TAMs (voir le papier de Mohavedi et collègues pour les profils de ces différentes sous-populations (Movahedi et al., 2010)). Ces sdAb sont capables de se lier spécifiquement à des TAMs isolés de plusieurs types de tumeurs *ex vivo* (pulmonaires et mammaires par exemple) ainsi que des TAMs *in vivo* suite à une injection intraveineuse

(Movahedi et al., 2012). Ces études pré-cliniques suggèrent donc que le ciblage d'antigènes spécifiques des TAMs est possible, toutefois le potentiel thérapeutique d'une telle stratégie reste encore à être déterminé.

2.3.3 La reprogrammation thérapeutique des TAMs

La grande hétérogénéité des sous-populations de TAMs tout au long du développement tumoral représente des cibles thérapeutiques potentielles pour la reprogrammation de la polarisation des macrophages. La manipulation de la polarisation des macrophages a fait l'objet de très nombreuses études (Gabrilovich, Ostrand-Rosenberg, & Bronte, 2012; Sica et al., 2012), et une des stratégies les plus intéressantes est de renverser la fonction immunosuppressive des TAMs et de restaurer la réponse pro-inflammatoire anti-tumorale ainsi que la réponse immunitaire acquise impliquant les cellules T (Allavena et al., 1987; Beatty et al., 2011; Duluc et al., 2009; Hagemann et al., 2008). En effet, un activateur clé de la polarisation M1, associée à une activité anti-tumorale des macrophages, est l'IFN- γ pu présenter un effet clinique bénéfique chez certaines patientes atteintes du cancer de l'ovaire (Colombo et al., 1992). De même, il a récemment été décrit dans un modèle murin de glioblastome que l'inhibition du récepteur au M-CSF peut atténuer la polarisation M2 pro-tumorale des macrophages (Pyonteck et al., 2013).

Un autre exemple est celui du ciblage de CD40, une protéine de co-stimulation exprimée par les cellules présentatrices d'antigène, qui a généré des résultats très surprenants. Dans le but de réverser l'immunosuppression et de promouvoir les réponses anti-tumorales des cellules T, Beatty et collègues ont récemment réalisé des essais cliniques de phase II avec le « CP-870,893 », un anticorps humain agoniste de CD40, en combinaison avec une chimiothérapie à la gemcitabine sur 21 patients atteints d'un cancer du pancréas à un stade avancé (Beatty et al., 2011). La régression tumorale observée chez certains patients les a menés à étudier les mécanismes responsables sur un modèle murin. De manière inattendue, ils ont observé que cette régression n'était en fait pas corrélée avec une infiltration lymphocytaire dans les lésions primaires, mais plutôt à celle de macrophages avec un phénotype modifié. Exprimant plus fortement le CMH de classe II et la molécule de co-stimulation CD86, ces macrophages s'accumulent dans la tumeur et possèdent une activité de lyse des cellules tumorales. Ces résultats montrent ainsi que la reprogrammation des TAMs peut être une stratégie à fort potentiel thérapeutique.

2.3.4 La stimulation de la phagocytose

CD47 est une protéine de surface de la superfamille des immunoglobulines exprimée par la majorité des tissus. Il agit en tant que signal anti-phagocytose en se liant à *signal regulatory protein α* (SIRP α), une protéine exprimée par les macrophages et les cellules dendritiques (Chao, Weissman, & Majeti, 2012). De nombreuses études récentes ont décrit comment les cellules tumorales exploitaient ce mécanisme afin d'éviter d'être phagocytées. En effet, les cellules tumorales expriment CD47 de manière forte et constitutive dans plusieurs types de cellules tumorales (ovaire, sein, côlon, vessie, glioblastome, carcinome hépatocellulaire, prostate, leucémies...) (Chao et al., 2011; Edris et al., 2012; Jaiswal et al., 2009; Majeti et al., 2009; Willingham et al., 2012). Ainsi, la surexpression de CD47 est un facteur de mauvais pronostic. Le traitement de tumeurs solides ou hématopoïétiques avec des anticorps bloquants dirigés contre CD47 ou SIRP α a pour effet une augmentation de la phagocytose macrophage-dépendante des cellules tumorales, ayant pour conséquence une réduction de la taille de la tumeur et du nombre de métastases (par exemple, dans des lymphomes non hodgkiniens et des léiomyosarcomes), sans pour autant provoquer une augmentation significative de la phagocytose de cellules non-tumorales (Chao et al., 2011; Edris et al., 2012; Majeti et al., 2009; Willingham et al., 2012).

2.3.5 Le ciblage du recrutement des monocytes

Le blocage de la migration des monocytes vers la tumeur pourrait être une stratégie efficace et potentiellement moins nocive pour l'élimination des TAMs (sans affecter les macrophages résidents des tissus sains). Comme précisé précédemment, un grand nombre de facteurs tumoraux et leurs récepteurs associés (notamment CCL2 et M-CSF) sont impliqués dans ce recrutement et représentent donc des cibles possibles de blocage avec interférence par ARN, anticorps monoclonaux et inhibiteurs chimiques de signalisation. Ces stratégies ont déjà fait leurs preuves dans des études précliniques. En effet, grâce à un anticorps anti-CCL2, Qian et collègues ont pu inhiber le recrutement de monocytes vers la tumeur, diminuer la formation des métastases et améliorer la survie des souris dans un modèle transgénique de tumeur mammaire (B. Z. Qian et al., 2011). Ainsi, des anticorps anti-CCL2 sont présentement en cours d'évaluation chez l'Homme pour le traitement des cancers de la prostate et de l'ovaire (Garber, 2009). Leuschner et collègues ont également ciblé le recrutement de monocytes, mais avec une technique d'interférence par ARN contre le récepteur CCR2 dans des modèles murins de lymphome EL4 et de carcinome du côlon CT26, ce qui résulte en une diminution de l'accumulation des TAMs et de la croissance tumorale (Leuschner et al., 2011). Le potentiel d'une thérapie anti-CCL2 a également été démontré dans un modèle de cancer de la

prostate (J. Zhang, Patel, & Pienta, 2010). De même, plusieurs études fondées sur ces mêmes techniques et ciblant le M-CSF et son récepteur ont été réalisées avec des résultats similaires dans des modèles de leucémies myéloïdes, de mélanomes et de tumeurs mammaires chez la souris (Aharinejad et al., 2004; DeNardo et al., 2011; Manthey et al., 2009; Paulus, Stanley, Schafer, Abraham, & Aharinejad, 2006). La voie CXCL12-CXCR4 a aussi été identifiée dans le recrutement de monocytes vers les tissus tumoraux. Par exemple, l'interruption de cette voie avec un antagoniste du CXCR4 suffit pour réduire le recrutement de façon significative et inhiber la croissance tumorale dans de nombreux modèles de tumeur (mammaire et pulmonaire...) (Schmid et al., 2011; Yang et al., 2008). Les chimiokines favorisent le recrutement des monocytes en partie *via* des modulations d'affinité et d'avidité des intégrines, ce qui augmente leur adhérence aux cellules endothéliales qui entourent le tissu tumoral. Dans un modèle sous-cutané de carcinome Lewis Lung, il a été montré que CXCL12 active les intégrines $\alpha 4\beta 1$ sur les monocytes, favorisant leur regroupement et l'adhérence des monocytes aux cellules endothéliales exprimant VCAM-1 (Schmid et al., 2011). L'importance de $\alpha 4\beta 1$ fut confirmée en utilisant un anticorps bloquant et un inhibiteur contre $\alpha 4$, permettant une diminution de l'infiltration monocyttaire et de la croissance tumorale. Toutefois, un grand inconvénient de ces thérapies est qu'elles vont non seulement empêcher le recrutement des monocytes vers les tumeurs, mais également leur recrutement vers les autres tissus de l'organisme et ainsi affecter considérablement leur homéostasie et leur défense contre des infections. Il s'agit ainsi de rechercher de nouvelles stratégies plus spécifiques.

Finalement, une piste jusqu'à présent très peu explorée et qui représente une des priorités de l'équipe est le ciblage spécifique de la migration trans-tissulaire des macrophages dans les tissus tumoraux, mais également dans d'autres pathologies dans lesquelles les macrophages jouent un rôle délétère.

Pour conclure cette partie, il est clair que malgré leur fonction immunitaire originale, de plus en plus de résultats émergent, qui montrent l'implication des macrophages dans une très grande variété de pathologies, au cours desquelles leur recrutement et leurs fonctions sont détournés au profit du développement de la pathologie. Ainsi, le contrôle de leur recrutement nocif pour l'organisme, est devenu une stratégie thérapeutique prometteuse. Toutefois, à cause de la grande hétérogénéité des macrophages, il faut s'assurer, lors de la conception de ces stratégies, de n'affecter que les sous-populations pathogéniques sans perturber le rôle protecteur d'autres sous-

populations de macrophages ou d'autres leucocytes. Une meilleure compréhension de la migration trans-tissulaire des macrophages pourrait donc déboucher sur l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

Chapitre 3

Les mécanismes moléculaires et cellulaires de la migration

La migration cellulaire représente un processus actif conduisant à une translation de cellules d'une position à une autre. Ceci peut avoir lieu dans des environnements non-vivants tels que le sol (par exemple, l'amibe *Dictyostelium discoideum*) ou sur du verre/plastique (commun dans des modèles *in vitro*); ou au sein d'organismes multicellulaires complexes. Les cellules mettent en place les étapes de migration en réponse à de multiples situations rencontrées au cours de leur vie, par exemple le besoin de se nourrir (*Dictyostelium*); la morphogenèse, qui nécessite la mobilisation de précurseurs afin de générer de nouvelles structures ou organes, souvent à des emplacements distants (pendant l'embryogenèse, l'organogenèse et la régénération); ou la présence de signaux environnementaux qui vont recruter les cellules afin qu'ils puissent accomplir une fonction, par exemple le recrutement des leucocytes lors des réponses immunitaires évoquées dans le chapitre précédent.

Toutefois, la migration cellulaire est également une fonction clé qui caractérise des cellules impliquées dans des maladies, l'exemple le plus évident étant celui du cancer où les cellules tumorales invasives sont capables de quitter la tumeur primaire et former des métastases dans des organes secondaires distants. Comme je l'ai évoqué dans le chapitre précédent, les macrophages sont également des cellules extrêmement motiles capables de migrer dans tous les tissus du corps, d'où leur implication majeure dans un grand nombre de pathologies comme les maladies inflammatoires, les maladies infectieuses et le cancer. Ainsi, il est paru évident qu'une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la

migration cellulaire des macrophages serait intéressante pour envisager son contrôle dans des contextes pathologiques.

Ce chapitre sera donc consacré à la description des mécanismes de migration élucidés jusqu'à présent. Je commencerai par décrire les processus de la migration en deux dimensions (2D) qui furent extensivement étudiés. La migration *in vivo* a cependant lieu essentiellement en trois dimensions (3D) et on sait désormais qu'elle implique des mécanismes différents de la migration 2D. Ainsi, je parlerai des différents modèles d'étude 3D *in vitro* et *in vivo* qui ont été développés, avant d'aborder les mécanismes de la migration 3D. Enfin, je terminerai avec la description de la migration 3D des macrophages, qui représente l'axe d'étude majeur de l'équipe.

1 La migration cellulaire en 2D

La migration en 2D s'observe le long de la membrane basale, lorsque les cellules épithéliales doivent y effectuer une réparation en cas de blessure. Sont également des sites de migration 2D, des surfaces telles que la membrane de la cavité pleurale et le péritoine (Friedl, Entschladen, Conrad, Niggemann, & Zanker, 1998), ou encore le déplacement des lymphocytes T sur les cellules présentatrices d'antigène lors du scan de leur surface (Friedl, Zanker, & Brocker, 1998). D'autre part, j'ai évoqué dans le premier chapitre le *crawling* des monocytes sur la paroi vasculaire qui représente également une migration 2D.

Les expériences de migration en 2D sont généralement réalisées avec des cellules déposées sur des lamelles de verre recouvertes ou non de fines couches de protéines matricielles (tels que la fibronectine, le fibrinogène...). Le modèle de « *wound healing* » (cicatrisation d'une blessure), qui consiste à réaliser une blessure dans une monocouche de cellules adhérentes, permet de suivre la recolonisation par les cellules de l'espace ainsi libéré (Moutasim, Nystrom, & Thomas, 2011). Alors que ces deux premiers modèles sont utilisés pour suivre la migration non-orientée, le modèle de chambres de migration permet de mesurer la migration vers un facteur attractant (chimiokines, cytokines, médiateurs lipidiques, etc...), assurant une polarisation cellulaire. La migration est ensuite basée sur des cycles successifs de protrusion membranaire, d'adhérence, de translocation du corps cellulaire et de rétraction de l'arrière de la cellule (**figure 17**) (Tschumperlin, 2013). Ces différentes étapes sont détaillées dans les paragraphes suivants.

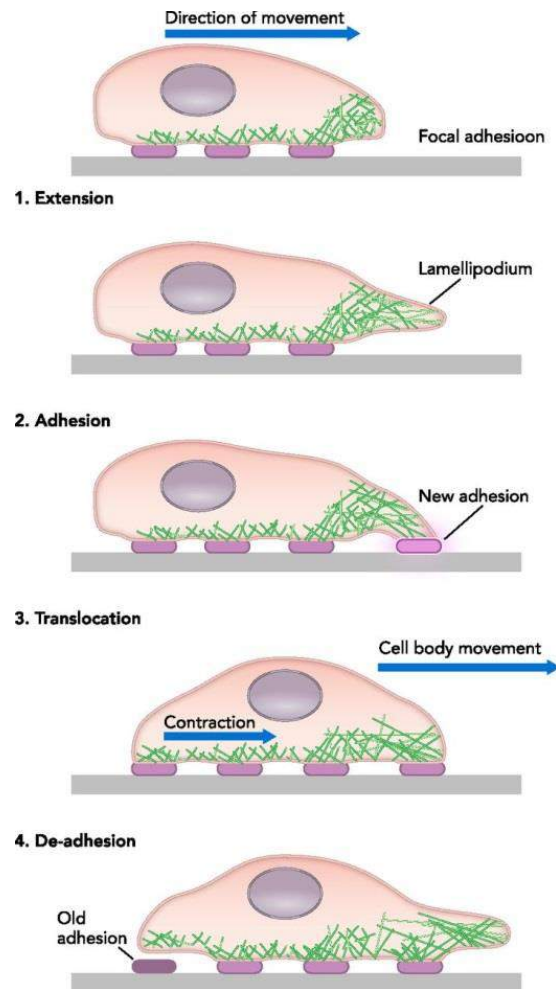


Figure 17 : Les différentes étapes de la migration 2D (extrait de Tschumperlin, 2013)

1.1 La polarisation cellulaire

Dans le contexte de la migration, la polarisation cellulaire ne désigne pas les différents états d'activation d'une cellule (par exemple, la polarisation M1 et M2 des macrophages), mais plutôt l'organisation asymétrique des cellules migrantes entre leur avant (le front de migration), appelé le « *leading edge* », et leur arrière, appelé le « *lagging edge* » ou « *trailing edge* » ([figure 18](#)) (Etienne-Manneville, 2008). Cette polarisation se met en place grâce à des signaux environnementaux qui peuvent être détectés par la cellule et qui lui confèrent une orientation. Ces signaux peuvent être chimiotactiques (induits par des chimioattractants ou des morphogènes), haptotactiques (induits par une variation de concentration du substrat), mécanotactiques (induits par détérioration des contacts cellules-cellules), électrotactiques (induits par un champs électrique), durotactiques (induits par des différences de rigidité du substrat), ou une combinaison de ces facteurs. Le *leading edge* est généralement caractérisé par une activité intense de polymérisation de l'actine, ce qui génère une structure protrusive

propice à la formation d'adhérences avec le substrat. En revanche, le *trailing edge* est caractérisé par la contraction du cytosquelette d'acto-myosine et le désassemblage des adhérences. Dans le cas des leucocytes, la polarisation implique également la formation de l'uropode, nécessaire non seulement pour leur migration mais aussi pour les interactions cellule-cellule, leur activation et l'apoptose. La partie centrale de la cellule contient généralement le noyau et des microtubules qui possèdent différents degrés de polarisation selon le type cellulaire.

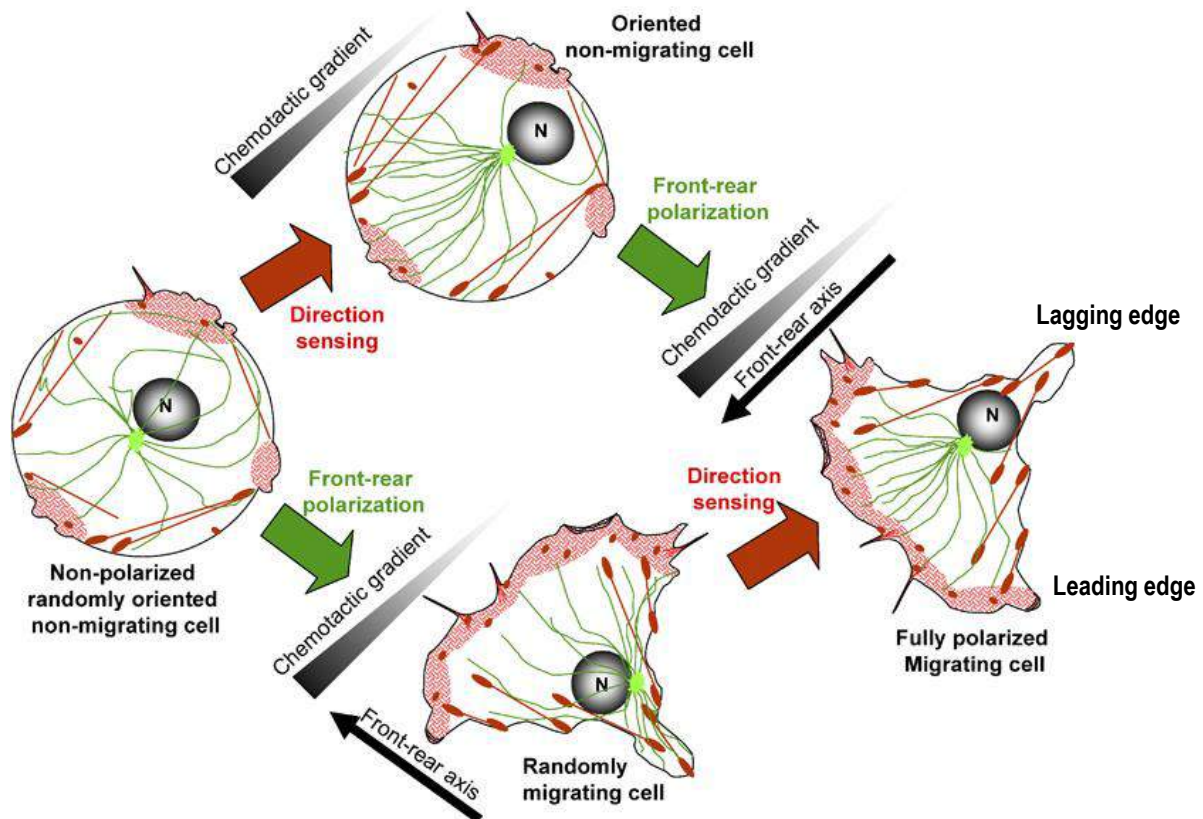


Figure 18 : La polarisation au cours de la migration cellulaire (adapté de Etienne-Manneville, 2008). En réponse à un gradient chimiotactique, la polarisation avant-arrière (flèche verte) et la détection de la direction (flèche rouge) doivent avoir lieu afin de transformer une cellule non-polarisée et orientée aléatoirement (sur la gauche) en cellule migrante polarisée (sur la droite). La polarisation avant-arrière est nécessaire pour la migration, mais n'est pas suffisante pour la chimiotaxie (image du bas). Dans ce cas, les cellules migrent de façon aléatoire. L'orientation cellulaire suite à la détection de la direction est cruciale pour favoriser la migration orientée, mais n'est pas suffisante pour entraîner la migration cellulaire (image du haut). L'orientation de l'axe noyau-centrosome est un indicateur fiable de l'orientation cellulaire au cours de la migration orientée. Les protrusions d'actine sont affichées en rouge, les microtubules sont en vert foncé et le centrosome en vert clair. Les lignes rouges représentent les fibres de stress et les taches rouges représentent les adhérences focales. N = noyau

1.2 La protrusion et la polymérisation de l'actine

L'étape de protrusion consiste en la formation *de novo* d'extensions membranaires, ou protrusions, dans la direction de la migration, c'est-à-dire vers le *leading edge*. Elle comporte trois composants majeurs : l'expansion de la membrane plasmique, la formation d'une

structure cytosquelettique sous-jacente permettant le soutien de cette extension membranaire, et l'établissement de contacts avec le substrat qui vont fournir d'une part l'appui nécessaire pour le déplacement du reste du corps cellulaire et d'autre part des signaux pour la régulation de la polymérisation de l'actine.

La protrusion est rendue possible par la polymérisation locale d'actine (**figure 19**) (T. D. Pollard & Borisy, 2003; Vicente-Manzanares, Webb, & Horwitz, 2005). Parmi les structures retrouvées dans la protrusion, on distingue les lamellipodes, plats et en forme d'éventail, dans lesquels l'actine polymérisée est souvent en structure branchée, et les filopodes, comprenant des filaments d'actine polymérisés arrangés en faisceaux longs et parallèles. Les lamellipodes et les filopodes sont localisés au front de la cellule en migration, définissant la zone de protrusion, et joueraient chacun des rôles différents dans la migration : les filopodes agissent en tant que structures de mécano-sensibilité et d'exploration, alors que les lamellipodes fournissent des surfaces de traction larges afin de générer la force nécessaire pour le mouvement vers l'avant.

La polymérisation de l'actine résulte de la nucléation de nouveaux filaments par addition de nouveaux monomères. Il existe deux principaux types de nucléateurs pour la polymérisation de l'actine : le complexe Arp2/3 et les formines mDia1 et mDia2 (ainsi que d'autres formines selon les types cellulaires). Le complexe Arp2/3 est un heptamère qui se lie sur le côté de filaments d'actine préexistants et qui favorise l'extension d'un nouveau filament d'actine à l'extrémité pointue, formant un angle d'environ 70° avec le filament préexistant (Weaver, Young, Lee, & Cooper, 2003). La régulation d'Arp2/3 est assurée par les protéines WASP (*Wiskott-Aldrich syndrome protein*), N-WASP et WAVE (*WASP-family verprolin-homologous protein*)/Scar, dont des mutations ou troncatures sont associées avec la maladie génétique du syndrome de Wiskott-Aldrich caractérisé par un déficit immunitaire. WAVE/Scar fait partie d'un complexe multimérique avec Abi, Nap125, Sra-1 et HSPC-300. Ce complexe est sous le contrôle de la petite GTPase Rac, de la famille des GTPases Rho, qui induit la dissociation d'Abi, Nap125 et Sra-1 de WAVE, permettant ainsi l'activation de ce dernier. WASP et N-WASP sont régulés par *Cell Division Control protein 42* (Cdc42) et par phosphorylation, les phosphoinositides et d'autres molécules telles que WIP (*WASP interacting protein*) et TOCA (*transducer of Cdc42-dependent actin assembly*) (**figure 19**) (Vartiainen & Machesky, 2004).

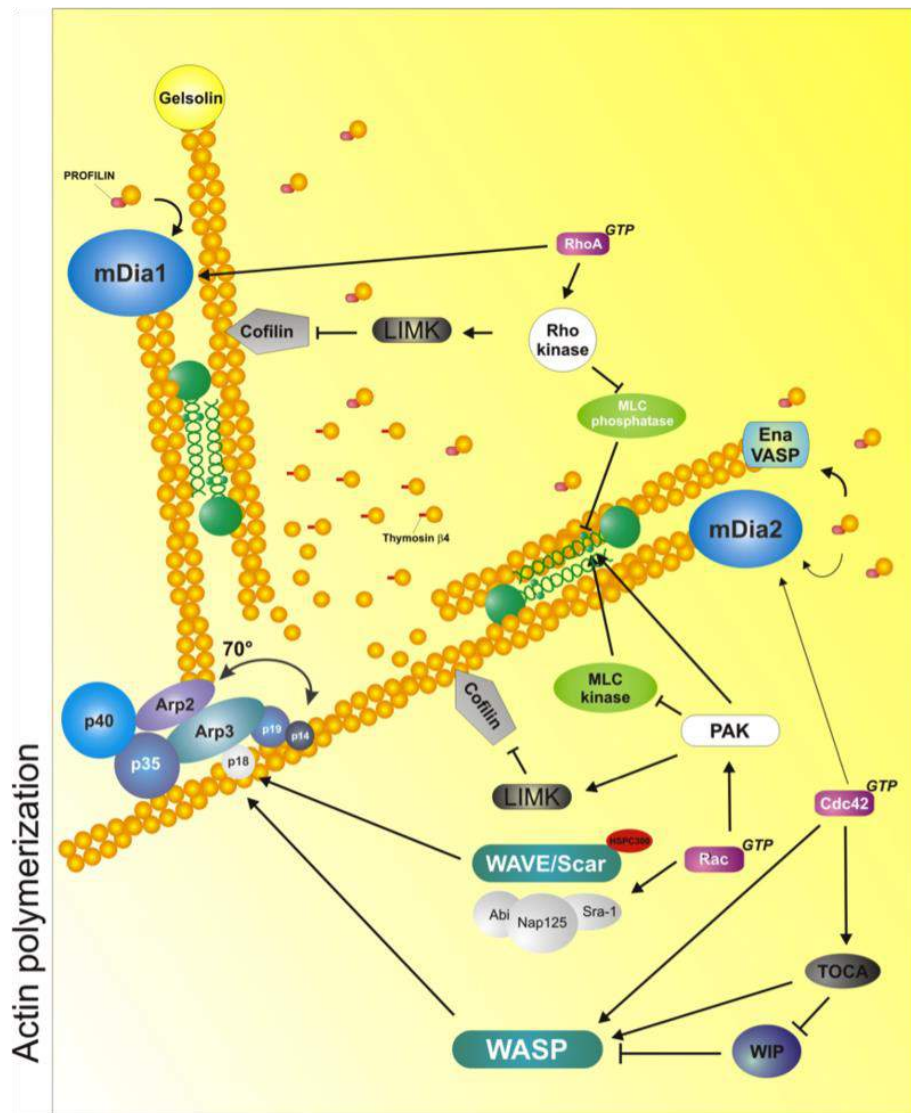
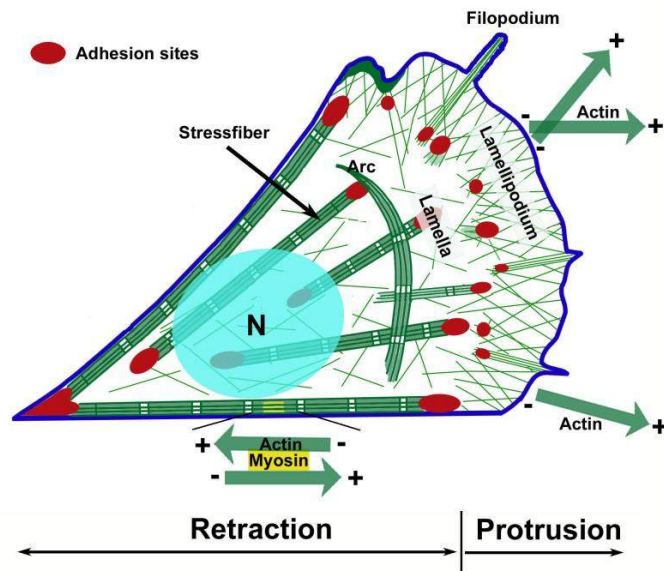


Figure 19 : La formation du lamellipode et des filopodes et la polymérisation de l'actine (extrait de IMBA Institute of Molecular Biotechnology et Vicente-Manzanares et al., 2005)

Contrairement à Arp2/3, les formines se lient à l'extrémité barbée des filaments d'actine et favorisent leur extension processive de façon linéaire. Les formines sont régulées par des petites GTPase (RhoA et Cdc42 pour mDia1 et mDia2 respectivement) et sont capables de récupérer l'actine G liée à la profiline afin de promouvoir la polymérisation (Watanabe & Higashida, 2004).

Ces étapes sont essentielles pour la ramification du lamellipode, ainsi que pour la formation de la base du filipode. Les monomères nécessaires à la polymérisation de nouveaux filaments et ramifications sont obtenus par dissociation de filaments plus anciens, une action assurée par la cofiline.

1.3 L'adhérence et les intégrines

Les adhérences représentent des points d'interaction moléculaire entre la cellule et le substrat. Ils s'assemblent et se désassemblent en réponse à des signaux extracellulaires et régulent la motilité cellulaire. Au cours de la migration, l'assemblage a lieu au niveau du *leading edge* et le désassemblage au *trailing edge*. Cependant, des adhérences peuvent également se désassembler au front au cours de la protrusion et fournissent des composants aux adhérences naissantes du *leading edge* dans un processus appelé « *adhesion turnover* » (Webb et al., 2004). Ainsi, au niveau des sites de protrusion de la cellule, lorsque de nouvelles adhérences se forment, elles peuvent se désassembler (*adhesion turnover*) ou se stabiliser et croître pour devenir des adhérences plus matures et larges. Bien que l'adhérence au substrat implique plusieurs types de molécules de surface (par exemple CD44 que je ne développerai pas ici), elle est principalement assurée par les intégrines (**figure 20**).

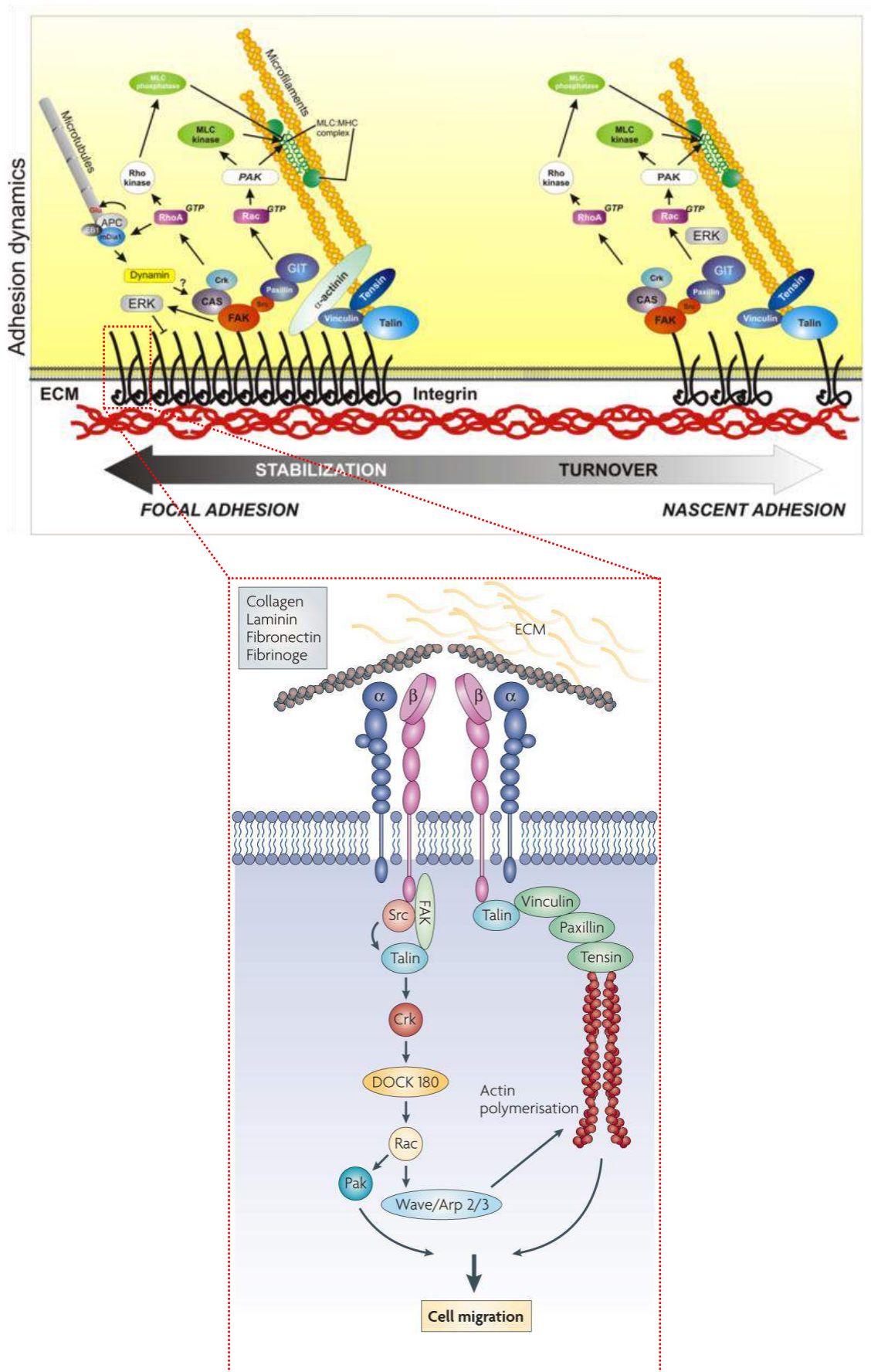


Figure 20 : Les adhérences et les intégrines (extrait de Vicente-Manzanares et al., 2005 et Avraamides, Garmy-Susini and Varner, 2008)

Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires majeurs et les mieux caractérisés, assurant les interactions dynamiques entre le substrat et le cytosquelette d'actine pendant la migration cellulaire (**tableau 5**) (Chan, Cortesio, & Huttenlocher, 2007). Ce sont des hétérodimères $\alpha\beta$ comportant un domaine extracellulaire large capable de s'attacher au substrat et la matrice extracellulaire et de lier le cytosquelette d'actine *via* leur queue cytoplasmique courte (Hynes, 2002). La spécificité de la liaison est déterminée par le domaine extracellulaire des intégrines qui reconnaissent divers ligands matriciels tels que la fibronectine ($\alpha5\beta1$, $\alpha\upsilon\beta3$, $\alpha4\beta1\dots$), le collagène ($\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1\dots$) et la laminine ($\alpha2\beta1$, $\alpha3\beta1$, $\alpha6\beta1\dots$). Des récepteurs de surface cellulaire sont également reconnus par les intégrines, incluant des membres de la superfamille des immunoglobulines tels que ICAM-1 ($\alpha L\beta2$, $\alpha M\beta2$) et VCAM-1 ($\alpha4\beta1$). En général, les intégrines se lient à des motifs spécifiques présents sur la protéine matricielle. Par exemple, neuf intégrines différentes peuvent se lier à la fibronectine et la reconnaissance se fait habituellement à travers le domaine central de liaison cellulaire (le motif RGD, soit Arg-Gly-Asp). Ainsi, les cellules qui adhèrent à la fibronectine impliquent simultanément plusieurs intégrines différentes qui peuvent affecter les dynamiques d'adhérence et de motilité cellulaire de façon différentielle. Des changements dans le répertoire d'intégrines peuvent corrélérer avec des changements dans la migration, induisant souvent des phénotypes plus motiles comme l'exemple de l'expression de l'intégrine $\alpha\upsilon\beta3$ par les mélanomes associée à une tumeur plus invasive (Seftor et al., 1992).

Les sites d'adhérence sont généralement restreints spatialement et peuvent varier en taille de très petits (adhérences naissantes ou complexes focaux) à larges et allongés (adhérences focales). La forme, la taille et le rôle fonctionnel des adhérences varient avec leur localisation subcellulaire et le type cellulaire. Les adhérences à proximité du *leading edge*, c'est-à-dire intégrées dans le lamellipode, ou présentes dans les cellules à migration rapide ont tendance à être plus petites, favorisent activement la polymérisation de l'actine et sont plus dynamiques (assemblage et désassemblage). En revanche, les adhérences éloignées du *leading edge* dans des cellules plus lentes peuvent être plus larges, plus stables et permettent l'ancrage de larges fibres de filaments d'actine.

Plus de 150 molécules sont impliquées dans l'assemblage et le *turnover* des adhérences (Zamir & Geiger, 2001). Certaines sont organisées en complexes de signalisation comportant des kinases et des protéines adaptatrices qui favorisent le rapprochement des différents composants de signalisation et leurs interactions mutuelles (**figure 20**). La paxilline, FAK (*focal adhesion kinase*) et des tyrosine kinases Src sont des exemples de ces composants

de signalisation importants (Turner, 2000). Ils sont impliqués dans la régulation de GTPases de la famille Rho qui constituent, dans un contexte de migration, des voies de signalisation majeures. En effet, plusieurs voies convergent vers ces GTPases qui sont indispensables à la régulation de la migration puisqu'ils sont fortement impliqués dans l'organisation et la polymérisation de l'actine, la contraction acto-myosine et la dynamique des microtubules. D'autres molécules structurales des adhérences, dont la taline, la vinculine, la zyxine et l' α -actinine, sont impliquées dans la liaison de l'actine au substrat à travers les intégrines (figure 20) (Avraamides, Garmy-Susini, & Varner, 2008; Choi et al., 2008; Xu, Baribault, & Adamson, 1998; X. Zhang et al., 2008).

Ligand	Integrin receptor
Laminin	$\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_7\beta_1$, $\alpha_{10}\beta_1$, $\alpha_6\beta_4$
Collagen	$\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_{10}\beta_1$, $\alpha_{11}\beta_1$, $\alpha_X\beta_2$
Fibronectin	$\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_8\beta_1$, $\alpha_4\beta_7$, $\alpha_V\beta_1$, $\alpha_V\beta_3$, $\alpha_V\beta_6$, $\alpha_{IIb}\beta_3$
Thrombospondin	$\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_V\beta_3$, $\alpha_{IIb}\beta_3$
Vitronectin	$\alpha_8\beta_1$, $\alpha_V\beta_3$, $\alpha_V\beta_5$, $\alpha_{IIb}\beta_3$
Osteopontin	$\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_8\beta_1$, $\alpha_9\beta_1$, $\alpha_4\beta_7$, $\alpha_V\beta_1$, $\alpha_V\beta_3$, $\alpha_V\beta_5$, $\alpha_V\beta_6$
Fibrinogen	$\alpha_V\beta_3$, $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_X\beta_2$, $\alpha_M\beta_2$
von Willebrand factor	$\alpha_V\beta_3$, $\alpha_{IIb}\beta_3$
Matrigel™(laminin, collagen IV, entactin) (BD Biosciences)	$\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_7\beta_1$, $\alpha_{10}\beta_1$, $\alpha_6\beta_4$
Intercellular cell adhesion molecule (ICAM)	$\alpha_L\beta_2$, $\alpha_X\beta_2$, $\alpha_M\beta_2$, $\alpha_D\beta_2$
Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1)	$\alpha_4\beta_1$, $\alpha_9\beta_1$, $\alpha_4\beta_7$, $\alpha_D\beta_2$
Platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1)	$\alpha_V\beta_3$
E-cadherin	$\alpha_E\beta_7$

Tableau 5 : Les récepteurs intégrines et leurs ligands (extrait de Chan, Cortesio and Huttenlocher, 2007)

1.4 La translocation du corps cellulaire et la rétraction de l'arrière

La translocation du corps cellulaire se fait par propulsion *via* des contractions coordonnées du cytosquelette d'acto-myosine. Ces contractions sont contrôlées par les petites GTPases Cdc42, Rac et RhoA. RhoA active la Rho-kinase (aussi appelée ROCK), qui va phosphoryler et inactiver la phosphatase responsable de la déphosphorylation de la myosine II, ce qui résulte en une augmentation de la contractilité des structures d'acto-myosine (Jaffe

& Hall, 2005). Un mécanisme similaire a été observé pour Cdc42, qui agit à travers la kinase MRCK (*myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase*). Inversement, Rac active PAK (*p21 activated kinase*) qui est responsable de la phosphorylation et donc l'inactivation de la MLC kinase (*Myosin Light-Chain kinase*), ce qui a pour conséquence de diminuer la contractilité et de favoriser l'étalement. Cependant, PAK peut également directement phosphoryler la myosine et augmenter sa contractilité. La prédominance du premier ou second mécanisme (décontraction ou contraction) serait régulée par des facteurs spatiaux ou par la régulation différentielle de PAK. La myosine II contrôle aussi la transduction du noyau, agissant de manière antagoniste avec la dynéine, un moteur moléculaire associé aux microtubules. La rétraction de l'arrière nécessite également des contractions coordonnées du cytosquelette d'actine et le désassemblage des adhérences au niveau du *trailing edge*. Plusieurs mécanismes convergent afin de favoriser ce désassemblage : les contractions d'acto-myosine qui exercent des forces sur l'adhérence et entraînent sa rupture (plusieurs types cellulaires laissent d'ailleurs des traces de récepteurs d'intégrine derrière eux) ; le désassemblage des adhérences induit par les microtubules ; l'endocytose des intégrines ; la régulation en baisse des affinités des contacts adhésifs par déphosphorylation *via* des phosphatases telles que la calcineurine ; et enfin le clivage protéolytique, par la calpaïne, de protéines des adhérences focales liant les intégrines à l'actine, telles que la taline, la paxilline et FAK (**figure 21**) (Vicente-Manzanares et al., 2005).

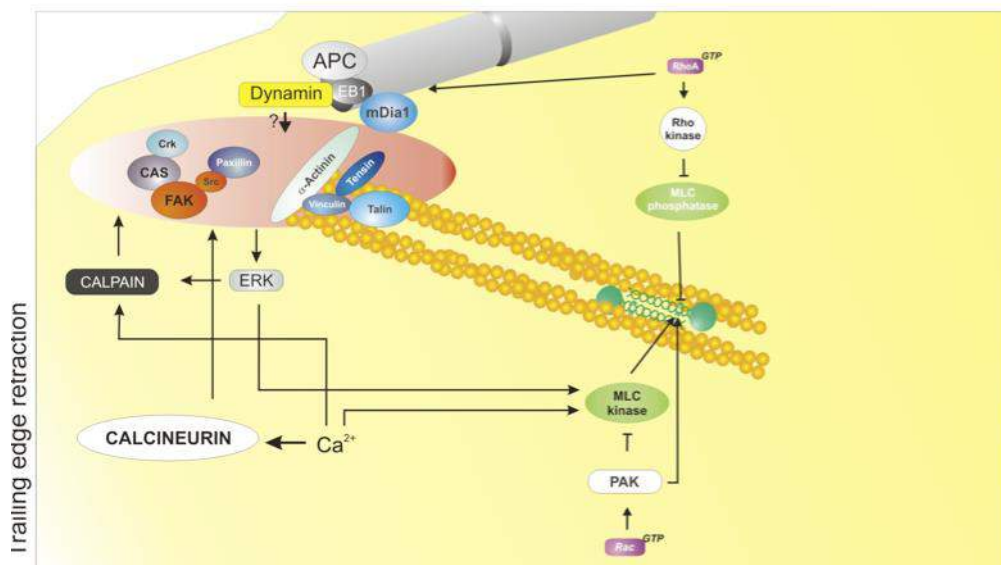


Figure 21 : La rétraction de l'arrière au cours de la migration cellulaire (extrait de Vicente-Manzanares et al., 2005)

2 La migration cellulaire en 3D ou trans-tissulaire

Les mécanismes et régulation de la migration cellulaire que je viens de décrire dans le paragraphe précédent ont été étudiés en 2D grâce à des modèles de culture cellulaire. Cependant, il existe de grands écarts entre le comportement des cellules cultivées sur des surfaces artificielles et leur comportement *in vivo* (Griffith & Swartz, 2006; Nelson & Bissell, 2006), où les cellules sont confrontées non seulement à des environnements 2D tels que la paroi endothéliale des vaisseaux sanguins, mais également aux environnements en 3D des tissus composés de cellules et de matrice extracellulaire. Celle-ci représente l'environnement interstitiel, c'est-à-dire un réseau tri-dimensionnel essentiellement composé de fibres de collagène, de glycoprotéines et de protéoglycanes. Les cellules *in vivo* migrent à travers trois types d'environnement interstitiel : des tissus conjonctifs denses, des tissus conjonctifs lâches et les couches acellulaires minces et denses organisant la membrane basale. On peut également distinguer des compositions et des architectures cellulaires et matricielles très différentes d'un tissu à un autre, conduisant à des interactions cellule-matrice et cellule-cellule uniques à chaque tissu qui vont jouer un rôle déterminant dans le choix du mode migratoire 3D.

Suite à la prise de conscience des limites de la culture 2D, il est devenu nécessaire de développer de nouveaux modèles d'étude en 3D qui permettent une meilleure représentation du microenvironnement des tissus vivants ([paragraphe 2.1](#)). Grâce à ces modèles d'étude, plusieurs modes migratoires en 3D ont pu être caractérisés ([paragraphe 2.2](#)) et l'influence de la matrice extracellulaire a pu être étudiée ([paragraphe 2.3](#)), notamment dans le cas de la migration des macrophages ([paragraphe 2.4](#)) grâce à des travaux largement menés par l'équipe.

2.1 Les modèles d'étude en 3D

Plusieurs types de modèles d'étude de migration 3D ont été développés pour l'étude de différents types cellulaires, tels que des matrices polymérisées *in vitro*, des sphéroïdes tumoraux et des explants tissulaires *ex vivo*. Chaque modèle possède ses avantages et ses désavantages intrinsèques, par exemple une plus grande pertinence physiologique et un accès plus limité aux cellules eu égard à l'imagerie ([figure 22](#)) (Page, Flood, & Reynaud, 2013).

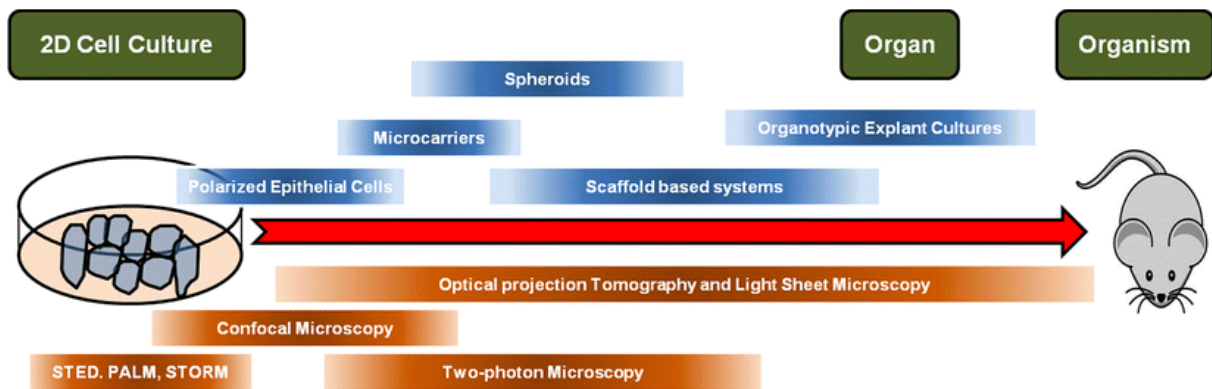
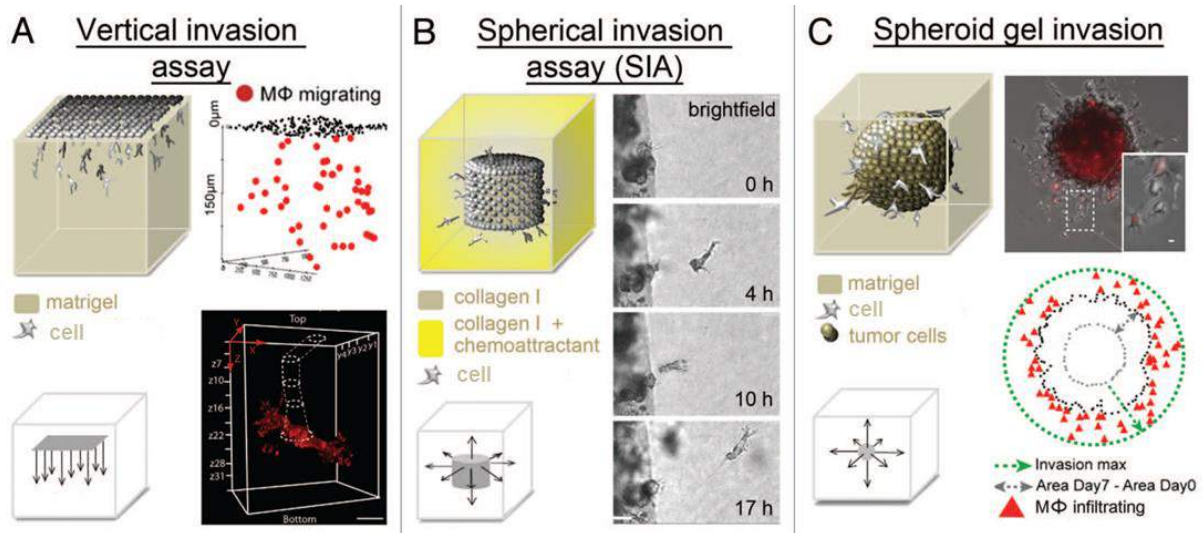


Figure 22 : Une comparaison des modèles 3D et des techniques de microscopie optique en relation avec leur pertinence (extrait de Page, Flood and Reynaud, 2013)

2.1.1 Le modèle d'invasion avec *Transwell*

Un des modèles les plus utilisés est celui du *Transwell* ou chambre de Boyden, permettant l'étude de la migration cellulaire chimiotactique dans un contexte 3D (figure 23). Ceci consiste en la polymérisation d'un gel épais (1 à 2 mm) de matrice extracellulaire au-dessus du filtre/membrane poreux d'un *Transwell*. Les cellules sont ensuite déposées au-dessus de la matrice, qui est placée entre un milieu comportant des chimio-attractants dans la chambre inférieure et un milieu dépourvu de chimio-attractants dans la chambre supérieure. Au fil du temps, un gradient chimiotactique se développe, ce qui induit l'infiltration et la migration orientées des cellules dans la matrice. Il est important de noter que dans ce modèle, les cellules doivent adapter leur mode de migration d'une situation en 2D au-dessus de la matrice, à une situation en 3D à l'intérieur de la matrice afin d'y pénétrer. La proportion de cellules qui migrent en 3D, leur morphologie et leur distance de migration peuvent être quantifiées au cours du temps par microscopie à lumière blanche. Les avantages de cette méthode sont la grande disponibilité de différents types et tailles d'inserts de culture selon les besoins expérimentaux et la relative facilité du protocole (figure 23) (Kramer et al., 2013; Wiesner, Le-Cabec, El Azzouzi, Maridonneau-Parini, & Linder, 2014).



Transmission electron microscopy of *in vitro* matrices

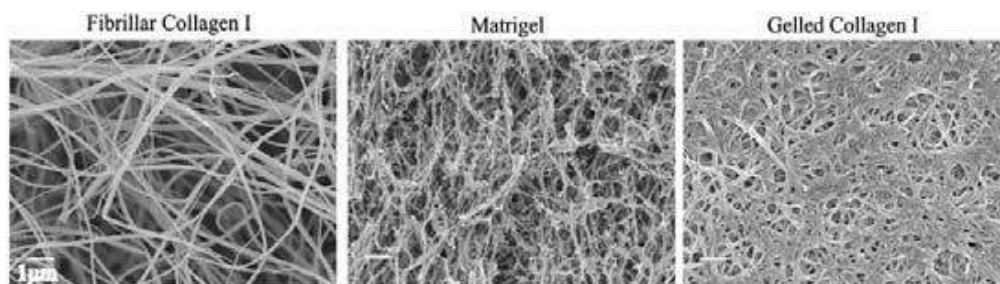


Figure 23 : Les modèles de migration 3D *in vitro* (extrait de Wiesner et al., 2014 et Van Goethem et al., 2010)

Les deux matrices extracellulaires reconstituées *in vitro* les plus couramment utilisées sont des extraits de matrices de tumeurs solides (Matrigel™) et le collagène de type I, qui est le collagène le plus représenté dans l'organisme. Le Matrigel™ est une matrice gélatineuse extraite d'un sarcome de souris Engelbreth-Holm-Swarm. Il est composé de protéines structurales telles que la laminine, l'entactine et le collagène de type IV, ainsi que de nombreux facteurs de croissance provenant du stroma tumoral. Le collagène I est purifié à partir de différentes sources tissulaires (peau, queue, tendons, placenta, etc...) de différentes espèces animales (rat, bœuf, etc...) par l'utilisation d'enzymes protéolytiques (la pepsine ou la pronase) ou de solutions acides, permettant d'obtenir respectivement du collagène I dit « dénaturé » ou « natif ». L'extraction par la pepsine coupe un site nécessaire à la réticulation du collagène et produit donc du collagène I « dénaturé », c'est ce type de collagène qui est

utilisé dans l'équipe. Il est possible d'obtenir différents types de matrices avec le collagène I, en variant la concentration et les conditions de polymérisation, puisqu'il peut former plusieurs microstructures distinctes, telles des états gélifiés ou fibrillaires avec de multiples organisations de fibres qui varient en densité et épaisseur, faisant ainsi varier la porosité du maillage de chaque matrice ([figure 23](#)).

2.1.2 Le modèle de sphéroïdes multicellulaires

Les cellules tumorales *in vivo* envahissent les tissus environnants à partir d'un amas de cellules cancéreuses. Ces amas tumoraux représentent des structures 3D qui peuvent être imitées par des agrégats de petite taille composés de cellules et formés *in vitro*, appelés des sphéroïdes multicellulaires ([figure 23](#)). Les cellules cultivées sous forme de sphéroïdes sont capables de mimer des situations *in vivo* de cancers solides. Ainsi, ce modèle peut servir pour déterminer les capacités de migration d'un type cellulaire de choix dans une structure tumorale, comme l'a récemment fait l'équipe où des sphéroïdes tumoraux de cellules SUM159PT de carcinome mammaire sont intégrés dans du Matrigel™ et co-cultivés avec des macrophages (Guet et al., 2011). L'utilisation de cellules marquées par fluorescence fournit un outil d'analyse de migration 3D en combinaison avec des techniques de microscopie (confocale et multi-photonique). Ce modèle plus complexe que les matrices extracellulaires purifiées présente l'avantage principal de former des structures 3D multicellulaires avec des interactions cellule-cellule et des matrices qui sont retrouvées *in vivo*, sans toutefois reconstituer un réel microenvironnement tumoral par manque de structures comme la vascularisation et absence d'autres types cellulaires comme les fibroblastes.

2.1.3 Les explants tissulaires *ex vivo*

Les explants tissulaires ont été utilisés depuis plusieurs années et consistent en la préparation de « *precision-cut organotypic tissue slices* » (coupes précises de tissus organotypiques) à partir d'organes ou tissus tumoraux grâce à des outils calibrés tels qu'un microtome ou un vibratome, suivie de leur mise en culture *ex vivo*. Utilisés dans des domaines d'études aussi variés que la pharmacologie et la toxicologie, la physiologie cervicale et la morphogenèse, ils représentent également des modèles de migration 3D particulièrement intéressants en combinaison avec des techniques de microscopie permettant l'imagerie 3D à haute résolution (voir paragraphe suivant). En effet, contrairement aux modèles cités dans les paragraphes précédents, ces explants sont de véritables systèmes biologiques dont les structures en 3D et les environnements biochimiques sont physiologiquement pertinents. Ils permettent ainsi d'imiter avec une plus grande fidélité les conditions d'activation, de

polarisation, de motilité et de migration d'une population cellulaire d'intérêt au sein d'explants de tissus sains ou pathologiques. Le suivi des cellules permet de déterminer les capacités migratoires et/ou invasives de ces cellules dans les tissus et peut se faire de plusieurs manières : par marquage de cellules endogènes au tissu, par transfert adoptif de cellules marquées avant la préparation des explants, ou par dépôt de cellules marquées au-dessus ou à proximité des explants dans un système de co-culture. De plus, cette technique présente l'avantage de pouvoir travailler à partir de biopsies humaines. L'utilisation de ce modèle a donc permis l'étude de l'invasion de cellules tumorales dans des explants provenant de tissus divers tels que des biopsies de poumons humains (Fjellbirkeland, Laerum, Eide, & Bjerkvig, 1998) et des cerveaux de souris (Ohnishi, Matsumura, Izumoto, Hiraga, & Hayakawa, 1998), ou alors la migration de lymphocytes dans des biopsies de tumeurs pulmonaires humaines (Salmon et al., 2012) et les nœuds lymphatiques de souris (Asperti-Boursin, Real, Bismuth, Trautmann, & Donnadieu, 2007).

2.1.4 La microscopie intravivale

Grâce aux progrès réalisés dans le domaine de la microscopie, le processus migratoire de cellules au sein d'organismes vivants est maintenant observable. Le plus grand défi de la microscopie intravivale est l'acquisition d'images de fluorescence à l'intérieur du petit animal à des profondeurs suffisantes selon l'étude réalisée, dans les conditions les moins invasives possibles pour l'animal. Les premières expériences de microscopie intravivale furent basées sur la microscopie confocale à balayage laser, toutefois ces microscopes nécessitaient des longueurs d'onde d'excitation dans le spectre visible qui souffraient d'absorption et de diffusion par le tissu observé, menant à des pertes d'intensité du signal, des aberrations, des distorsions et une profondeur d'imagerie limitée ($< 100 \mu\text{m}$). Ces problèmes ont été surmontés grâce à l'émergence de microscopes multi-photoniques qui fonctionnent sur le principe de l'absorption simultanée de deux photons (ou plus) infrarouges de faible énergie dont la combinaison des énergies induit une fluorescence dans le spectre visible sur une section optique mince. L'absorption et la diffusion de ces photons par le tissu étant moindre, ils pénètrent beaucoup plus profondément dans le tissu, avec une profondeur d'imagerie pouvant aller jusqu'à 1 mm. De plus, la lumière infrarouge permet la génération de seconde harmonique qui peut être détectée pour visualiser certaines organisations fibrillaires de la matrice extracellulaire telles que les fibres de collagène de type I. Ces techniques de microscopie intra-vivale, en combinaison avec le développement d'outils de marquage cellulaire *in vivo* et de souris transgéniques exprimant divers types cellulaires fluorescents, ont ainsi permis de visualiser le mouvement des cellules au sein de la circulation sanguine et

lymphatique mais également dans les tissus (Lammermann et al., 2008). En effet, dans le cas des macrophages, des souris exprimant une protéine fluorescente sous le contrôle du promoteur de *csf1-r* (récepteur au M-CSF) (Ovchinnikov et al., 2008) ou alors des « nanobodies » dirigés spécifiquement contre le récepteur au mannose des macrophages (un marqueur M2 particulièrement utiles pour imager les TAMs) (Movahedi et al., 2012) ont été développés. Il faut toutefois noter que, pour l'instant, les contraintes techniques ne permettent l'étude que de tissus relativement superficiels (tumeurs sous-cutanées, derme, glande mammaire (Wang et al., 2002; Wolf et al., 2003; Wyckoff, Pinner, Gschmeissner, Condeelis, & Sahai, 2006; Wyckoff et al., 2007).

2.2 Les modes de migration 3D

Le développement des différents modèles décrits plus haut ont permis la caractérisation des modes de migration en 3D. Les cellules peuvent migrer individuellement et collectivement. Jusqu'à présent, deux modes migratoires pour la migration individuelle en 3D ont été décrits : le mode mésenchymateux et le mode amiboïde. Ces deux modes diffèrent essentiellement par la stratégie migratoire. Dans la migration mésenchymateuse, la cellule génère activement un passage dans son microenvironnement en le dégradant par protéolyse. Dans la migration amiboïde, la cellule se faufile dans son microenvironnement en se contractant et en se déformant. Les caractéristiques majeures de ces deux modes migratoires sont résumées dans la [figure 24](#) (Friedl & Wolf, 2010; Pankova, Rosel, Novotny, & Brabek, 2010). Les données que je vais décrire dans les paragraphes qui suivent ont été obtenues essentiellement sur des cellules tumorales invasives, modèle de prédilection pour l'étude de la migration 3D.

2.2.1 La migration mésenchymateuse

La migration mésenchymateuse est le mode de migration 3D le mieux décrit aujourd'hui puisqu'elle est inspirée des études en 2D reposant sur la formation d'un lamellipode à l'avant de la cellule et la rétraction de l'uropode à l'arrière afin de générer un déplacement. Elle a été observée dans certaines cellules tumorales, les fibroblastes, les kératinocytes, les cellules endothéliales et, plus récemment, les macrophages (voir le [paragraphe 2.4](#)). Ce mode de migration est caractérisé en 3D par l'alignement des cellules le long des fibres de la matrice extracellulaire, par une morphologie très allongée et protrusive, et surtout par la dégradation de la matrice.

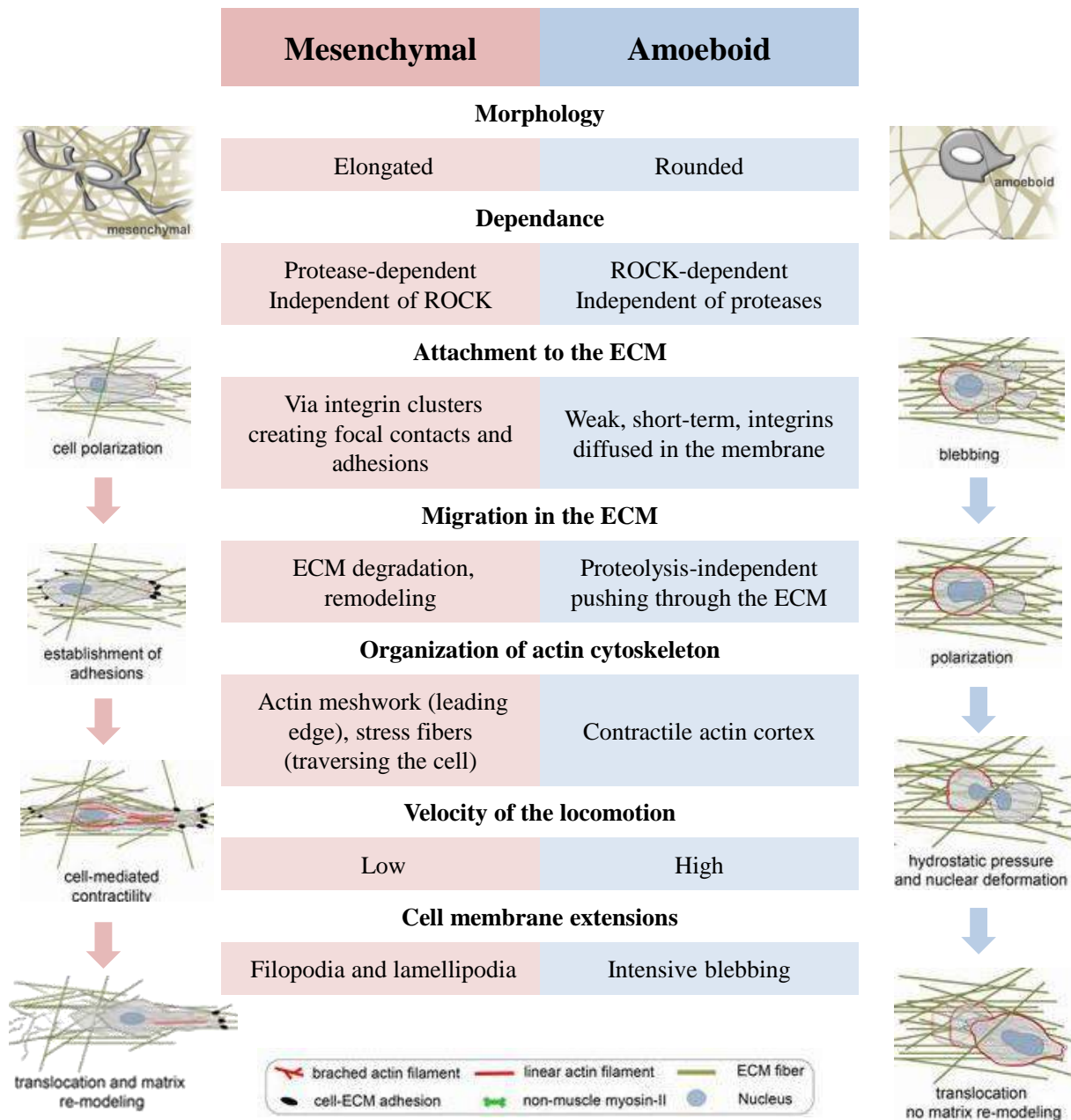


Figure 24 : Les modes de migration 3D mésenchymateux et amoiboïde (adapté de Paňková, Rösel, Novotný and Jan Brábek, 2009 et Friedl and Wolf, 2010)

La migration mésenchymateuse d'une cellule tumorale peut être décrite en trois étapes : 1) l'initiation de la polarisation cellulaire et la formation de la protrusion principale, ce qui mène à 2) une interaction du *leading edge* avec la matrice extracellulaire. Ces contacts cellule-matrice déclenchent une cascade de signalisation qui va résulter en 3) la contraction de l'arrière de la cellule et ainsi son déplacement. La migration commence avec la formation d'une protrusion de lamellipodes et filopodes riches en actine au *leading edge*. Ce processus est possible grâce à des petites GTPases de la famille Rho, notamment Rac et Cdc42, qui vont favoriser la polymérisation de l'actine par régulation des protéines WASP/WAVE (Miki,

Suetsugu, & Takenawa, 1998; Rohatgi et al., 1999). L'interaction de N-WASP et WAVE2 avec Arp2/3 entraîne la nucléation des filaments d'actine et la formation d'un réseau d'actine au *leading edge* (Suetsugu, Miki, Yamaguchi, Obinata, & Takenawa, 2001). Cdc42 induit la formation de filopodes (Nobes & Hall, 1995; Yang, Wang, & Zheng, 2006) et affecte la polarité cellulaire par régulation des microtubules (Cau & Hall, 2005). Les lamellipodes et filopodes au *leading edge* sont stabilisés par des interactions entre les contacts focaux et la matrice extracellulaire. Les composants clés de ces contacts focaux sont les intégrines, qui pour rappel sont des récepteurs transmembranaires assurant le lien mécanique entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette d'actine. L'activation et le regroupement des intégrines aux contacts focaux sont assurés par la taline, une protéine adaptatrice qui associe les intégrines au cytosquelette d'actine (Calderwood et al., 1999). Les complexes d'intégrines recrutent de nombreuses protéines adaptatrices (telles que la paxilline, la vinculine et la zyxine) et protéines de signalisation (notamment FAK et Src) et deviennent en ce faisant des adhérences focales plus stables (Zaidel-Bar, Cohen, Addadi, & Geiger, 2004). L'attachement à la matrice extracellulaire est crucial pour la cellule en migration mésenchymateuse. En effet, il a été montré que le blocage d'intégrines $\beta 1$ dans des cellules mésenchymateuses invasives de fibrosarcome HT-1080 mène à une perte de motilité (Wolf et al., 2003). La formation des adhérences focales est associée à un réarrangement Rho-dépendant du cytosquelette d'actine en de longues fibres de stress d'actine parallèles (Nobes & Hall, 1995).

Les complexes d'intégrines recrutent des enzymes protéolytiques responsables de la dégradation et du remodelage de la matrice extracellulaire afin de générer des voies migratoires en forme de tunnels qui facilitent la migration des cellules tumorales. Jusqu'à présent, plusieurs types de protéases impliquées dans la dégradation de composants de la matrice extracellulaire ont été identifiés, notamment les MMPs (Kessenbrock et al., 2010), mais aussi des sérine protéases et leurs récepteurs associés, le système d'activation plasmine (Deryugina & Quigley, 2012), et des cystéine protéases tels que les cystéine cathepsines (Mohamed & Sloane, 2006). Selon la présence de motifs d'ancrage membranaire, tel que le glycosylphosphatidylinositol (GPI) ou un domaine transmembranaire, les protéases dégradant la matrice peuvent être soit exposées à la surface cellulaire pour une dégradation locale, soit sécrétées dans le milieu extracellulaire pour une protéolyse diffuse (Verollet et al., 2011). Chez l'Homme, il existe 24 membres connus de la famille des MMPs, qui sont soit sécrétés, soit associés avec la membrane plasmique à travers des domaines transmembranaires (*membrane-type-MMPs* ou MT-MMPs) ou des ancres GPI (Page-McCaw, Ewald, & Werb, 2007). De ce groupe, la metalloprotéase de type membranaire MT1-MMP (aussi appelé

MMP14) a émergé comme étant la protéase primordiale puisqu'elle clive une variété de protéines et récepteurs matriciels et active d'autres MMPs par protéolyse telles que MMP2 (Deryugina et al., 2001). En effet, il a été montré qu'une surexpression de MT1-MMP entraîne une meilleure capacité invasive des cellules (Itoh, 2006; Wiesner, El Azzouzi, & Linder, 2013) tandis que son ablation mène à une inhibition quasi-totale de la migration de cellules épithéliales et fibroblastes et de l'invasion de certaines cellules tumorales (telles que des cellules de tumeur mammaire, pancréatique et de la prostate) dans un gel 3D de collagène (Sabeh et al., 2004). Les cathepsines appartiennent à la famille des cystéine protéases, parmi lesquelles 11 ont été identifiées chez l'Homme. Elles sont le plus souvent trouvées à l'intérieur de compartiments lysosomiaux, mais peuvent également être sécrétées sous forme d'enzymes actifs ou pro-enzymes inactifs (**figure 25**) (Turk et al., 2012; Wolf & Friedl, 2011).

La translocation d'une cellule dépend de forces de traction apparaissant grâce à la contraction des fibres de stress (Sheetz, Felsenfeld, & Galbraith, 1998). La contractilité du cytosquelette d'actine est maintenue principalement par la signalisation Rho. Rho, dans sa forme liée au GTP, active ROCK qui en retour va inactiver la *myosin light-chain phosphatase* (MLCP) (K. Kimura et al., 1996), responsable de la déphosphorylation de la *myosin II light-chain* (MLC2). MLCK a un effet antagoniste en phosphorylant MLC2, ce dont est également capable ROCK (Amano et al., 1996). Une fois que MLC2 est phosphorylée (p-MLC2), l'activité ATPase de la myosine II est augmentée et la myosine II interagit de manière plus efficace avec les filaments d'actine, ce qui augmente la contractilité cellulaire (Mierke, Rosel, Fabry, & Brabek, 2008). Une autre voie de signalisation impliquée dans la régulation de la contractilité cellulaire est celle de Cdc42 (Wilkinson, Paterson, & Marshall, 2005). Celui-ci agit à travers son effecteur en aval de MRCK (Leung, Chen, Tan, Manser, & Lim, 1998), ayant un effet inhibiteur sur la MLCP (Wilkinson et al., 2005). Ainsi, le niveau de contractilité de l'acto-myosine dépend du ratio de l'activité phosphorylante et de déphosphorylante de la MLC2 par ses régulateurs.

La voie de signalisation Rho/ROCK ne semble pas être nécessaire à la migration de type mésenchymateux de différents types cellulaires tels que les cellules de carcinome du côlon BE et les cellules de carcinome épidermoïde SW962, puisque l'activation de la voie de Cdc42/MRCK est suffisante pour compenser la perte de contractilité suite à l'inhibition de Rho/ROCK (Sahai & Marshall, 2003; Wilkinson et al., 2005). La vitesse de la migration cellulaire mésenchymateuse est d'environ 0,1 à 0,5 $\mu\text{m}/\text{min}$.

Type of proteolysis	Molecular mechanism	Topography	Functional outcome on ECM	Migration
(a) Secretory, diffusive			Wide-ranging or confined ECM removal and turnover	Generating space for growth and passive translocation; not required for migration <i>per se</i>
(b) Contact-dependent			Migration-associated trails and aligned remodelled ECM	Promotion of migration
(c) Intracellular			Targeted ECM removal, turnover and intracellular degradation	Proliferation/ passive translocation into newly acquired space

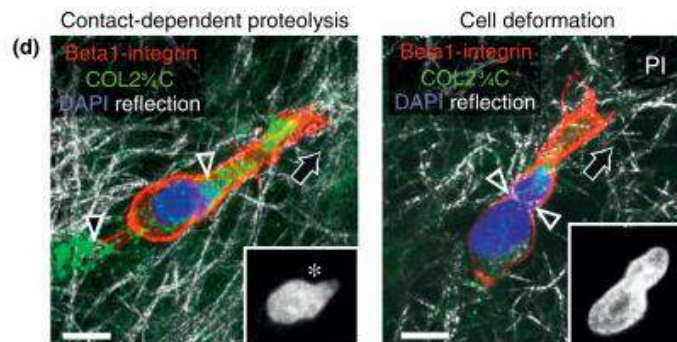


Figure 25 : Les modes de protéolyse 3D dans les tissus (adapté de Friedl and Wolf, 2011)

2.2.2 La migration amiboïde

La migration amiboïde fut nommée d'après la motilité spécifique du protozoaire *Amoeba Proteus*, caractérisée par un déplacement rapide, un défaut d'adhérences focales matures et de fibres de stress, et une déformation cellulaire importante reposant sur des cycles d'expansion et de contraction du corps cellulaire. Les cellules tumorales sont également capables d'utiliser ce mode de migration, ainsi que d'autres types cellulaires tels que les leucocytes. Les cellules qui adoptent ce mode de migration dans les matrices 3D présentent une morphologie ronde caractéristique, même si des morphologies plus allongées ont été décrites par la suite, par exemple chez *Dictyostelium* (Yoshida & Soldati, 2006). La contractilité augmentée de ces cellules est largement dépendante de la voie de signalisation Rho/ROCK, ce qui leur permet de se faufiler à travers les ouvertures des fibres de la matrice

extracellulaire, d'adapter leur corps cellulaire aux espaces existants et d'exercer une force suffisante (restant toutefois faible) pour déformer localement la matrice environnante.

La contraction du réseau cortical d'acto-myosine est indispensable pour la génération des forces motrices (Mierke et al., 2008; Yanai, Kenyon, Butler, Macklem, & Kelly, 1996). L'actine sous-jacente à la membrane plasmique est attachée à celle-ci grâce à des protéines de liaison de la superfamille ERM (comprenant notamment la protéine 4.1, l'eitrine, la radixine et la moésine), qui dépendent de la voie Rho/ROCK (Niggli & Rossy, 2008). Ceci permet le maintien de la contractilité du cortex acto-myosine attaché à la membrane, et ainsi le maintien de la tension cellulaire. Comme observé chez *Amoeba proteus*, la pression hydrostatique intrinsèque permet la génération du mouvement (Yanai et al., 1996). Cette pression intracellulaire résulte soit en le détachement du réseau acto-myosine de la membrane, soit en la rupture du cortex acto-myosine et à la formation de protrusions membranaires courtes et sphériques, appelées les « *blebs* », structures clé dans la motilité cellulaire (Keller & Eggli, 1998). La différence majeure entre la formation des lamellipodes au cours de la migration mésenchymateuse et celle du « *blebbing* » membranaire est que celui-ci est formé par un afflux de cytoplasme (Keller & Eggli, 1998). Ainsi, la formation des *blebs* membranaires au *leading edge* n'est pas dirigée par la polymérisation d'actine, mais est déclenchée par une augmentation de la pression intracellulaire au niveau de la membrane dans la direction du mouvement. Le déplacement devient ainsi possible grâce à l'accumulation d'acto-myosine contractile au cortex postérieur (Yumura, Mori, & Fukui, 1984) et par la déplétion des protéines ERM de liaison cortex-membrane au niveau des *blebs* du front cellulaire et le désassemblage local d'actine (Keller & Eggli, 1998). Une fois le *bleb* formé, le réseau acto-myosine sous la membrane est restauré (Charras, Hu, Coughlin, & Mitchison, 2006) et le *bleb* va soit se rétracter, soit persister pour participer à d'autres déplacements.

Ainsi, une différence majeure avec la migration mésenchymateuse est l'absence de dégradation par protéolyse de la matrice extracellulaire au cours de la migration amiboïde, même si l'implication des MMPs a été récemment mise en évidence dans la migration amiboïde de cellules de mélanome (Orgaz et al., 2014). De plus, le mécanisme de *blebbing* et l'absence de protusions dues à la polymérisation d'actine donnent aux cellules en migration amiboïde une morphologie souvent arrondie, très différente des protrusions caractéristiques de la migration mésenchymateuse. Toutefois, ce mode migratoire repose surtout sur des déformations contrôlées par Rho/ROCK et des attachements de faible adhérence au substrat

pour le déplacement en 3D, permettant des vitesses pouvant varier de 2 $\mu\text{m}/\text{min}$ (cellules de mélanome A375m2) à 25 $\mu\text{m}/\text{min}$ (lymphocytes dans du collagène).

2.2.3 Les transitions entre la migration mésenchymateuse et amiboïde

L'utilisation de l'un des modes de migration peut être conditionnée par la dérégulation de voies de signalisation. Ainsi, des cellules tumorales, telles que les HT1080, utilisent le mode migratoire mésenchymateux quelle que soit la matrice (Van Goethem et al., 2010). Les fibroblastes transformés par Src migrent selon le mode mésenchymateux mais, si la protéine p27^{kip1} est supprimée, ces mêmes cellules vont plutôt adopter une migration de type amiboïde (Berton et al., 2009). De façon similaire, l'utilisation d'inhibiteurs contre les protéases ou contre la voie Rho/ROCK peut amener les cellules tumorales à s'adapter et utiliser l'autre mode migratoire (Pankova et al., 2010; Van Goethem et al., 2010; Wolf et al., 2003). Il est toutefois important de noter que ces transitions n'ont été observées que dans le collagène fibrillaire dénaturé. A l'inverse, l'inhibition de la voie Rho/ROCK dans des cellules de mélanome A375m2, des cellules tumorales amiboïdes, fut le premier mécanisme observé pour induire une transition d'une migration amiboïde vers une migration mésenchymateuse dans du Matrigel™ (Sahai & Marshall, 2003).

2.2.4 La migration collective

La migration cellulaire collective a lieu lorsque deux cellules ou plus migrent à travers un environnement 3D tout en maintenant leurs jonctions cellule-cellule (Friedl & Gilmour, 2009; Friedl, Hegerfeldt, & Tusch, 2004; Lecaudey & Gilmour, 2006; Rorth, 2007). Une comparaison entre la migration individuelle et collective peut être trouvée sur la [figure 26](#) (Friedl & Wolf, 2003). Elle semble être impliquée dans de nombreux processus tels que la morphogénèse, la réparation tissulaire, l'invasion tumorale et la formation de métastases (Christiansen & Rajasekaran, 2006; Friedl et al., 1995; Lecaudey & Gilmour, 2006; Vaughan & Trinkaus, 1966; Weijer, 2009). En effet, elle est à l'origine des changements complexes dans les structures tissulaires multicellulaires dont la régénération épithéliale, la formation de nouveaux vaisseaux pendant l'angiogenèse, et l'invasion dérégulée de masses cellulaires pendant la progression cancéreuse et la destruction tissulaire consécutive. En revanche, notre équipe n'a jusqu'à présent jamais pu l'observer *in vitro* (Guiet et al., 2011; Van Goethem et al., 2010) ni *in vivo* (voir les [résultats](#)) chez les macrophages.

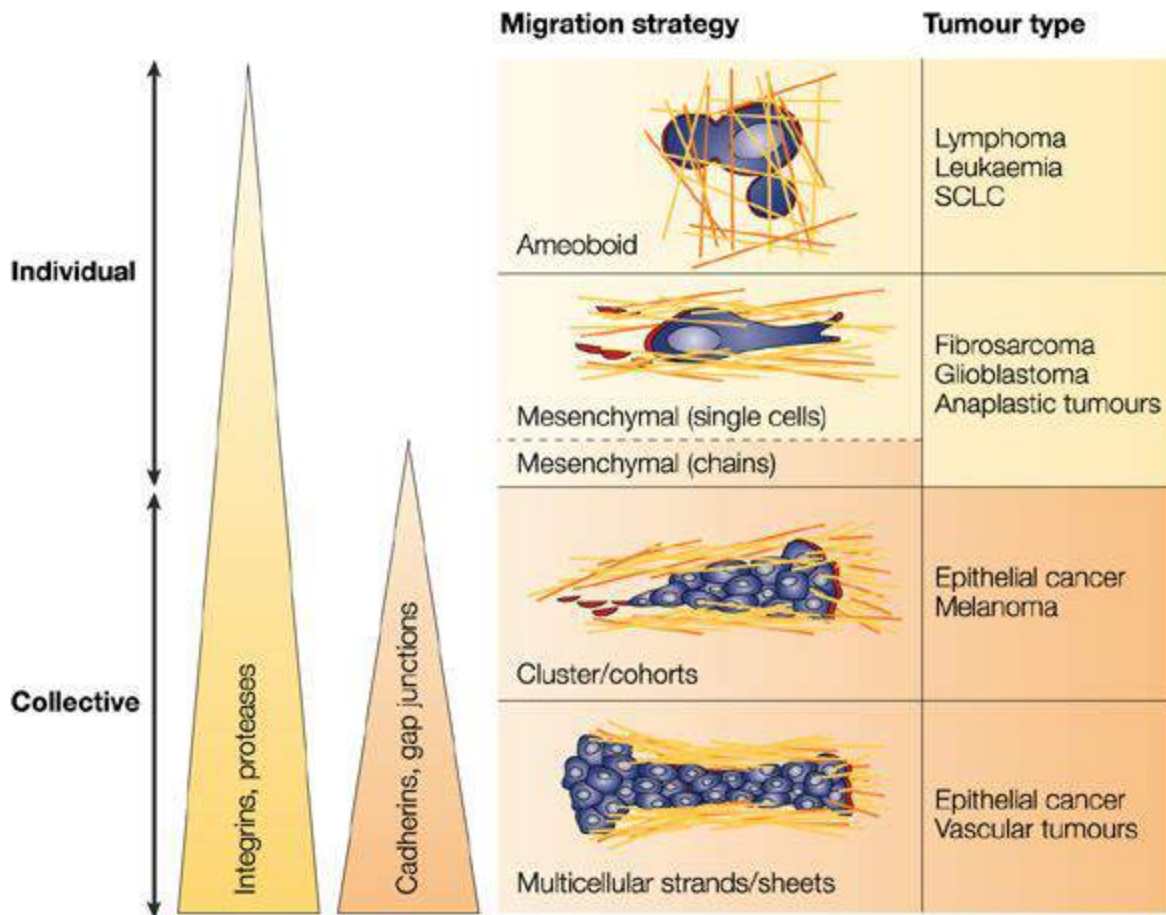


Figure 26 : Les migrations individuelle et collective (adapté de Friedl and Wolf, 2003)

Le mouvement collectif de cellules fait appel à des mécanismes similaires à ceux de la migration individuelle : polarisation, protrusion d'un *leading edge*, adhérence au substrat, dégradation et contraction pour avancer. La différence majeure réside dans le fait que les cellules restent liées les unes aux autres aussi bien au *leading edge* que sur les régions latérales ou qu'au sein même du groupe (Friedl, 2004; Lecaudey & Gilmour, 2006; Rorth, 2007). Il a été démontré que la migration collective des cellules cancéreuses A431 était dépendante de la liaison entre les cadhérines E et P exprimées à la surface des cellules (Macpherson et al., 2007).

D'autre part, lorsqu'une cellule tumorale migre selon le mode mésenchymateux et dégrade au fur et à mesure de sa migration la matrice (« *leading cell* » ou « *forerunner cell* »), elle génère un tunnel formé par le réalignement des fibres de collagène clivées parallèlement à son corps et dans lequel peuvent s'engouffrer d'autres cellules (« *following cells* »), ce qui peut augmenter le diamètre du tunnel (Friedl & Gilmour, 2009; Friedl et al., 1997; Friedl & Wolf, 2008; Wolf et al., 2007). Le rapprochement des cellules peut alors induire des

adhérences cellule/cellule transitoires menant à la formation d'une chaîne de migration qui, à mesure que le tunnel s'élargit et que les contacts cellule/cellule s'amplifient, peut aboutir à la génération d'un tube multicellulaire, plus ou moins régulier (Friedl & Wolf, 2010). Peu à peu les régions internes de la masse deviennent dépourvues de matrice laissant place uniquement à des jonctions cellule/cellule, tandis que la région corticale reste en contact avec le tissu. Les cellules à l'intérieur de la masse perdent leurs capacités migratoires tandis que la migration de l'ensemble se fait comme si la masse était une cellule unique. En effet, les cellules « *leader* » à l'avant de la cohorte montrent une grande polarisation avec l'extension de pseudopodes, l'engagement d'adhérences fortes avec la matrice, et sa dégradation. La traction de la cohorte serait permise par le renforcement et la tension de l'actine corticale des cellules en contact avec la matrice extracellulaire tandis que l'arrière de la masse et les cellules internes sont tirées vers l'avant (Biname, Pawlak, Roux, & Hibner, 2010; Friedl & Gilmour, 2009). Il a été montré par immunohistochimie sur des coupes de tumeurs humaines responsables d'un cancer colo-rectal que la fascine-1 (protéine impliquée dans l'assemblage des filaments d'actine en faisceaux dans les filopodes) était fortement exprimée au niveau des cellules au front de migration de la cohorte. De plus, l'expression de cette protéine dans des cellules qui ne l'expriment pas naturellement induit *in vivo* la formation de métastases. L'ensemble de ces résultats montre un rôle majeur de cette protéine dans la progression tumorale dans le cancer colorectal, *via* la formation de filopodes exploratoires qui guident la migration (Vignjevic et al., 2007). Par ailleurs, à mesure que le groupe de cellules migre, d'autres cellules présentes dans l'environnement peuvent venir aider les cellules tumorales à évoluer, notamment par leur activité protéolytique. C'est le cas des fibroblastes qui viennent s'ajouter au *leading edge* du groupe de cellules tumorales (Biname et al., 2010; Gaggioli et al., 2007).

Pour résumer, les cellules possèdent plusieurs mécanismes différents afin de migrer à travers leur microenvironnement tri-dimensionnel. Ces mécanismes sont non seulement régulés et façonnés par les paramètres physiques et moléculaires de la cellule elle-même, mais également par ceux du tissu 3D qui, ensemble, déterminent comment migre une cellule. Ainsi, il est pertinent de s'interroger sur ces paramètres qui influencent le choix du mode de migration utilisé par les cellules.

2.3 L'influence de la matrice extracellulaire sur la migration 3D cellulaire

Comme nous l'avons déjà évoqué dans les paragraphes précédents, de nombreux paramètres influencent la migration cellulaire. En plus des déterminants intrinsèques au type

cellulaire, il existe de nombreux paramètres physiques et chimiques liés à la matrice extracellulaire dans laquelle évolue la cellule qui influenceront sa migration. En effet, l'environnement extracellulaire aura un impact fondamental sur le mode et l'efficacité de la migration cellulaire, en présentant des ligands matriciels de différentes organisations macromoléculaires et structurales qui vont jouer sur divers paramètres, notamment la densité et la porosité, la rigidité, l'orientation et la composition. En réponse à ces facteurs extracellulaires, le cytosquelette d'acto-myosine s'adapte de manière dynamique et génère en réponse différentes géométries dans le temps et l'espace permettant une migration optimale selon les différents paramètres rencontrés.

2.3.1 La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire représente le composant non-cellulaire présent au sein de tous les tissus et organes. Elle constitue non seulement un support physique essentiel pour les composants cellulaires, mais elle initie aussi plusieurs étapes requises pour la morphogenèse, la différenciation et l'homéostasie tissulaire. Bien que, fondamentalement, la matrice extracellulaire soit composée d'eau, de protéines et de polysaccharides, chaque tissu possède une matrice dont la composition et la topologie lui est propre, générée au cours du développement tissulaire à partir d'un dialogue dynamique et réciproque, biochimique et biophysique, entre les divers composants cellulaires et du microenvironnement. De plus, la matrice extracellulaire est une structure très dynamique qui est constamment soumise au remodelage, soit enzymatique, soit non-enzymatique, et ses composants moléculaires sont sujets à une myriade de modifications post-traductionnelles. Ainsi, il est possible de retrouver à travers l'organisme une très grande hétérogénéité de la matrice non seulement entre les différents tissus, mais également au sein d'un même tissu, ce qui a un impact décisif sur la migration cellulaire ([figure 27](#)).

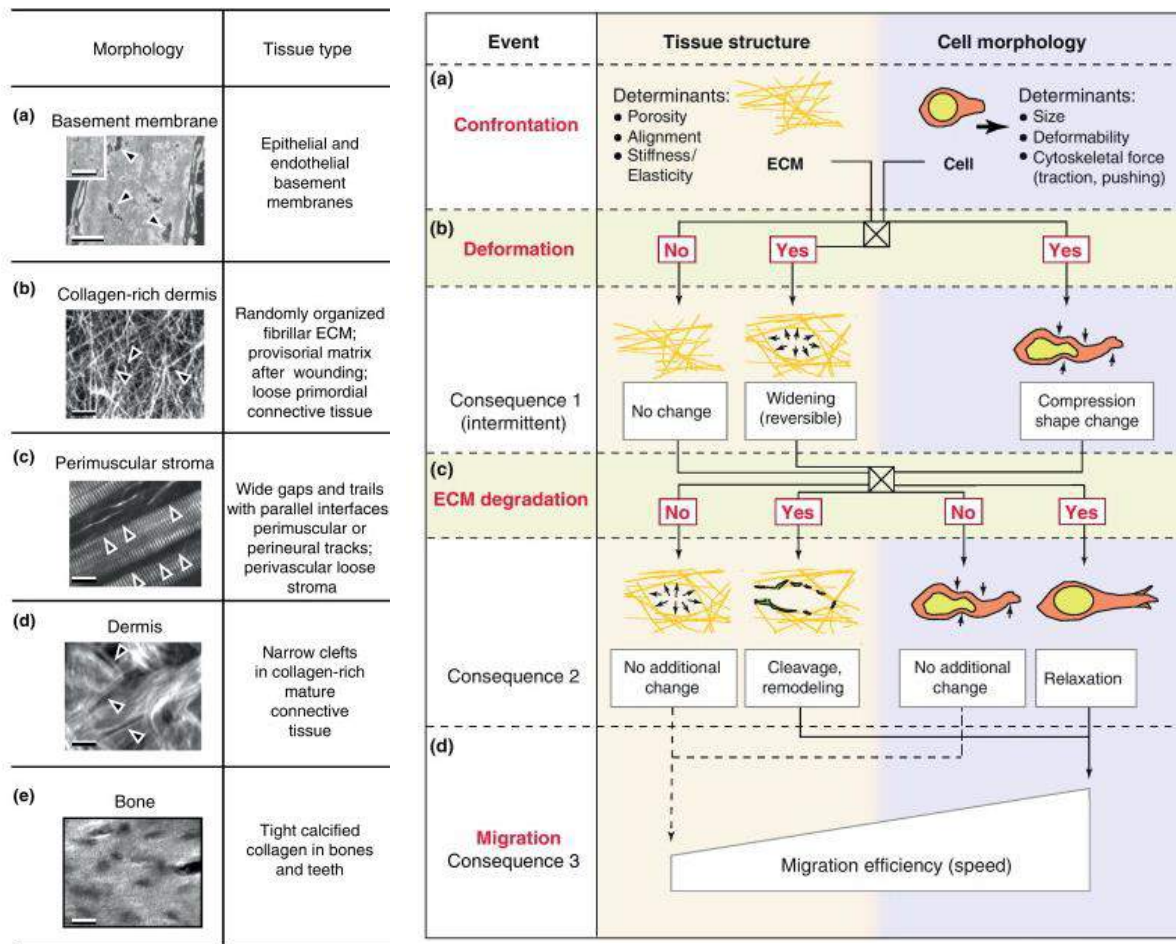


Figure 27 : Les différentes structures *in vivo* de la matrice extracellulaire et les facteurs modulant le choix du mode migratoire dans les tissus (adapté de Friedl and Wolf, 2011)

2.3.2 La densité et la porosité

In vivo, les tissus interstitiels varient grandement dans leur organisation structurale, par exemple en termes de contenu en collagène, de texture et d'épaisseur des fibres, et de porosité. L'efficacité de la migration semble être optimale lorsque le diamètre des pores à franchir est équivalent ou légèrement en-dessous du diamètre des cellules polarisées en migration. Si la taille de l'interstice tissulaire est supérieure à la taille de la cellule, la vitesse de migration a tendance à ralentir (Harley et al., 2008; Haston, Shields, & Wilkinson, 1982) à cause de la perte de la majorité des interactions cellule-fibre. En revanche, si les pores sont beaucoup plus restreints par rapport à la taille de la cellule, celle-ci peut également être contrainte à ralentir et pourrait même être complètement freinée face à cet obstacle physique (Harley et al., 2008; Haston et al., 1982). En réponse à ce confinement extracellulaire, les cellules en migration s'allongent en forme de tige et s'étirent afin de réduire leur diamètre ;

tandis que des pores de taille importante vont plutôt favoriser un arrondissement de la cellule, une caractéristique de la migration amiboïde.

La déformabilité de la cellule et de son compartiment le plus rigide, le noyau, est contrôlée par les lamines nucléaires A/C, qui stabilisent la membrane nucléaire et pourraient potentiellement déterminer l'ouverture minimale pouvant être traversée (Dahl, Ribeiro, & Lammerding, 2008; Lammerding et al., 2006). En plus de l'adaptation de la morphologie cellulaire, les cellules peuvent également utiliser la protéolyse de la matrice extracellulaire, caractéristique du phénotype mésenchymateux, pour lutter contre le confinement physique en élargissant les pores et en formant des tunnels dont les dimensions correspondent à la taille cellulaire et sont donc optimales pour la migration.

2.3.3 La rigidité

La rigidité de la matrice extracellulaire, ou son élasticité pouvant être représentée par son module élastique (le module d'Young), dépend des propriétés moléculaires du tissu, dont le contenu en collagène, l'épaisseur des fibres et le degré de réticulation entre les fibres. Ensemble, ces propriétés définissent la stabilité et la déformabilité du support tissulaire (Shoulders & Raines, 2009). Les cellules sont capables de détecter la rigidité du substrat grâce à des adhérences constituées autour des complexes d'intégrines et à des voies de signalisation initiées par des protéines de mécano-sensibilité (par exemple, la taline et p130Cas, (Giannone & Sheetz, 2006). Une augmentation de la rigidité du substrat a pour effet le renforcement des protrusions cellulaires ainsi que des adhérences focales, par le biais de l'augmentation de la contractilité acto-myosine contrôlée par Rho/ROCK, ce qui conduit à l'étalement cellulaire, la génération d'une force de traction plus élevée et un mouvement cellulaire allongé (Peyton, Kim, Ghajar, Seliktar, & Putnam, 2008; Ulrich, Jain, Tanner, MacKay, & Kumar, 2010). Au contraire, une matrice peu rigide ne favorise pas la formation d'adhérences focales et la contractilité du cytosquelette, mais plutôt l'arrondissement cellulaire (Ulrich et al., 2010). Ainsi, la rigidité matricielle peut stimuler la migration dirigée des cellules, similairement à la chimiotaxie, afin que les cellules migrent vers une région de rigidité plus importante dans un processus appelée la durotaxie (Lo, Wang, Dembo, & Wang, 2000).

2.3.4 L'architecture et l'orientation

Les tissus conjonctifs sont constitués d'un large éventail de textures physiques, qui vont d'une architecture lâche et désordonnée à des structures bien alignées (Petrie, Doyle, & Yamada, 2009; Wolf et al., 2009). Il a été observé que toutes les cellules motiles ont une tendance à s'aligner parallèlement à l'orientation des structures tissulaires, par exemple au

niveau des fibres musculaires, des vaisseaux sanguins et des fibres de la matrice extracellulaire, qui peuvent être réorganisées par les cellules mésenchymateuses elles-mêmes afin de faciliter leur migration (Petrie et al., 2009; Provenzano, Inman, Eliceiri, Trier, & Keely, 2008). De plus, lorsque ces deux situations sont reconstituées dans un modèle *in vitro*, l'invasion des cellules tumorales mésenchymateuses MDA-MB-231 ne se produit que lorsque les fibres de collagène sont alignées perpendiculairement à la tumeur (Provenzano et al., 2008). Dans cette idée, par microscopie intravitale, il a également été observé que les cellules tumorales amiboïdes invasives et des cellules hôtes (comme des macrophages) utilisaient les fibres de collagène pour migrer rapidement (Sidani, Wyckoff, Xue, Segall, & Condeelis, 2006). Ainsi il apparaît que les cellules, quel que soit leur mode migratoire, utilisent les fibres de la matrice extracellulaire pour se guider dans leur migration. Si pour les cellules mésenchymateuses, cela requiert un réarrangement, les cellules amiboïdes se contentent de suivre un chemin « pré-tracé ».

Ce phénomène de réagencement pourrait donc participer à l'invasion (en servant de guide aux cellules) et à la directionnalité du mouvement (Petrie et al., 2009). L'orientation par contact le long de ces structures est guidée par des intégrines mécano-sensorielles qui, avec la rigidification du cytosquelette par Rho/ROCK, induit une persistance directionnelle (Dickinson, Guido, & Tranquillo, 1994; Petrie et al., 2009; Provenzano et al., 2008). Bien que l'orientation en fibres alignées de matrices extracellulaires riches en collagène ne semble pas avoir un impact sur la morphologie cellulaire (Provenzano et al., 2008), elle semble favoriser un flux multicellulaire dans une configuration « à la queue-leu-leu » dans les tissus 3D (Friedl & Wolf, 2008).

2.3.5 La composition

Dans les modèles de matrices 3D les plus couramment utilisés, le composant principal est le collagène I et généralement il est utilisé seul. Or *in vivo*, si le collagène de type I est effectivement le constituant majeur des tissus, d'autres molécules sont présentes. En effet, le tissu interstitiel est composé d'un réseau de fibres de collagène de type I (glycoprotéine) et d'élastine responsables de la structure et de son élasticité et auxquelles sont liées de façon non-covalente des glycoprotéines telles que la fibronectine, ou encore des protéoglycanes. La lame basale (mimée *in vitro* par le Matrigel™) est, elle, constituée essentiellement d'un réseau de collagène de type IV, de la glycoprotéine laminine et du perlécane (protéoglycane) et contient beaucoup de facteurs de croissance. Dans les tissus interstitiels, c'est essentiellement au collagène et à la fibronectine que s'accrochent les cellules. De plus, ces

protéines de la matrice extracellulaire peuvent lier des facteurs de croissance, réguler leur distribution et leur présentation aux cellules et ainsi influencer le mode migratoire (Hynes, 2009), notamment *via* un « *cross-talk* » entre facteurs de croissance et intégrines (Alam et al., 2007). Les liaisons matrice-cellules sont essentiellement dirigées par les intégrines présentes en surface des cellules. Il est fort probable que selon le type cellulaire et selon l'environnement dans lequel elle se trouve, il y ait activation de tel ou tel récepteur intégrine (par exemple, la fibronectine se lie préférentiellement à la famille des intégrines $\beta 1$ et la vitronectine à $\alpha v\beta 3$ et $\alpha v\beta 5$) et donc activation de signaux cellulaires différents. Ainsi la composition de la matrice extracellulaire et les interactions cellule/matrice qui en découlent jouent un rôle clé dans la migration cellulaire.

2.3.6 Les modifications pathologiques de la matrice extracellulaire

Au cours du vieillissement tissulaire, différents événements vont contribuer à rendre la matrice plus rigide et mécaniquement plus faible. Ces événements sont principalement une réticulation inappropriée du collagène par glycation, par des sous-produits de l'oxydation lipidique et par exposition à la lumière UV, un affaiblissement des jonctions par diminution d'expression de protéines telles que la cadhérine, et un amincissement de la membrane basale dû à la senescence des fibroblastes.

Les blessures et les pathologies ont souvent pour conséquence une accélération de cette rigidification. Un exemple est la fibrose, qui est le résultat de réponses anormales à la blessure tissulaire et est typiquement caractérisée par une hyper-prolifération des fibroblastes, leur différenciation en myofibroblastes, et un excès de synthèse et de sécrétion de matrice extracellulaire. Au cours de maladies telles que la fibrose pulmonaire, la cirrhose hépatique, des maladies cardiovasculaires et la sclérodémie systémique, cette sécrétion excessive de matrice mène à une augmentation de la rigidité tissulaire et des dysfonctionnements de l'organe. Cette rigidification est induite par une activation accrue des fibroblastes du stroma et leur différenciation en myofibroblastes. Ceux-ci vont exacerber la desmoplasie tissulaire en déposant de larges quantités de protéines matricielles (collagène, laminine, fibronectine) (Levental et al., 2009), en sécrétant des facteurs de croissance et en exerçant des forces de contractions sur la matrice extracellulaire. Ceci a pour conséquence la réorientation et la réticulation de nouvelles fibres de collagène et d'élastine, remodelées en des fibrilles plus larges et plus raides qui rigidifient d'avantage le tissu. La sécrétion de facteurs de croissance contribue quant à elle à une plus grande perméabilité vasculaire et une angiogenèse accrue, générant une pression tissulaire interstitielle. Dans le cas du cancer, les tumeurs ont souvent

été liées à des blessures qui n'ont pas pu cicatriser (Schafer & Werner, 2008) et ainsi, le stroma tumoral présente des similarités avec une blessure non-résolue (Bissell & Radisky, 2001), présentant de nombreuses similarités avec une fibrose. Ainsi, la composition matricielle du stroma autour d'une tumeur est clairement différente de celui du tissu sain environnant et typiquement plus rigide (~400 Pa comparé à 150 Pa, respectivement) (Kass, Erler, Dembo, & Weaver, 2007). Cette modification de composition et de rigidité favorise la croissance tumorale. En effet, il a été montré dans un modèle 3D *in vitro*, que si la rigidité de la matrice (mélange de collagène I et de Matrigel™) était augmentée à un niveau comparable à celui rencontré dans l'environnement d'une tumeur mammaire (il y a un facteur 6 entre le tissu d'une glande mammaire saine et le stroma lié à une tumeur mammaire), il y avait induction de la croissance tumorale, du regroupement d'intégrines, de la formation d'adhérences focales et de la contractilité *via* le chemin Rho/ROCK (Paszek et al., 2005). Ainsi les auteurs proposent que la rigidité de la matrice déclenche la formation d'adhérences focales (rôle mécano-sensoriel des intégrines) ce qui augmente la tension du cytosquelette *via* Rho/ROCK. Le chemin Rho/ROCK activerait la voie de signalisation Erk qui régule la prolifération cellulaire. De plus, l'augmentation de la contractilité cellulaire favorise l'accroissement de la rigidité du substrat. Ainsi cette boucle auto-entretenu favoriserait la croissance tumorale (Huang & Ingber, 2005). De plus, la rigidification de la matrice extracellulaire à l'intérieur et autour de la tumeur mène à une augmentation du regroupement d'intégrines (Paszek et al., 2005). Ceci résulte en une meilleure transduction du signal mécanique qui va favoriser la migration cellulaire.

Malgré l'impact majeur des propriétés de la matrice extracellulaire sur le phénotype de migration 3D utilisé par les cellules, il a été montré qu'au sein de la même matrice reconstituée *in vitro* (Matrigel™), certaines cellules tumorales évoluaient selon un mode amiboïde mais d'autres selon un mode mésenchymateux (Sahai & Marshall, 2003). Ainsi la matrice extracellulaire seule n'est pas suffisante pour prédire le mode migratoire des cellules tumorales puisque les capacités intrinsèques de la cellule à se déformer et/ou à dégrader sont également importantes.

2.4 La migration 3D *in vitro* des macrophages

Comme nous l'avons vu à travers cette introduction bibliographique, le recrutement et la présence des macrophages, rendus possibles par leur grande capacité migratoire, sont impliqués dans de nombreuses maladies telles que le cancer. Ainsi, la migration des macrophages représente une cible de fort intérêt dans ces pathologies. Toutefois, la grande

majorité des connaissances sur ce sujet ont été obtenues en 2D. Ce n'est que depuis récemment que des études sur la migration 3D des macrophages ont émergé, notamment grâce au travail de l'équipe qui est pionnière dans ce domaine. Dans ce dernier paragraphe, je vais résumer les travaux effectués jusqu'à présent.

2.4.1 Les modes migratoires utilisés par les macrophages

Grâce au modèle de migration 3D avec *Transwell* (voir le [paragraphe 2.1.1](#)), l'équipe a montré que les macrophages humains dérivés de monocytes ainsi que les macrophages murins dérivés de la moelle osseuse sont capables d'utiliser les deux modes de migration 3D décrits, à savoir le mode amiboïde et le mode mésenchymateux (Van Goethem et al., 2010). Contrairement à ce qui était décrit dans les cellules tumorales, le mode de migration utilisé est largement dépendant de la matrice rencontrée, et semble influencé plutôt par son architecture, que par sa composition. En effet, dans une matrice poreuse telle que le collagène I polymérisé sous forme de fibres (avec une concentration entre 2 à 4 mg/ml), les macrophages utilisent le mode amiboïde, avec les différentes caractéristiques qui le définissent, à savoir une morphologie ronde, une motilité rapide (environ 40 $\mu\text{m}/\text{h}$) et une dépendance de la voie de signalisation Rho/ROCK, démontrée par des expériences d'inhibition pharmacologique de ROCK avec le Y27632 ([figure 28](#)). En revanche, lorsque le même collagène I est polymérisé en gel (concentration de 5 mg/ml), ce qui produit une matrice dense et faiblement poreuse (diamètre des pores inférieur à 1 μm), les macrophages adoptent la migration de type mésenchymateux. Cet effet est observé également dans des matrices de Matrigel™ d'architecture comparable (concentration de 8 à 12 mg/ml). Ainsi, les macrophages présentent bien une morphologie allongée et protrusive et une vitesse lente de migration (10 $\mu\text{m}/\text{h}$). Toutefois, la caractéristique majeure est le rôle essentiel des protéases qui permettent aux cellules de compacter, dégrader et ingérer la matrice extracellulaire et donc de créer des tunnels afin d'avancer à l'intérieur de la matrice. Ces tunnels pourraient se refermer plus ou moins vite après le passage des macrophages, en fonction des propriétés viscoélastiques de la matrice. L'implication de la dégradation de la matrice par les macrophages a été démontrée grâce à l'utilisation d'un mélange d'inhibiteurs de protéases ([figure 28](#)).

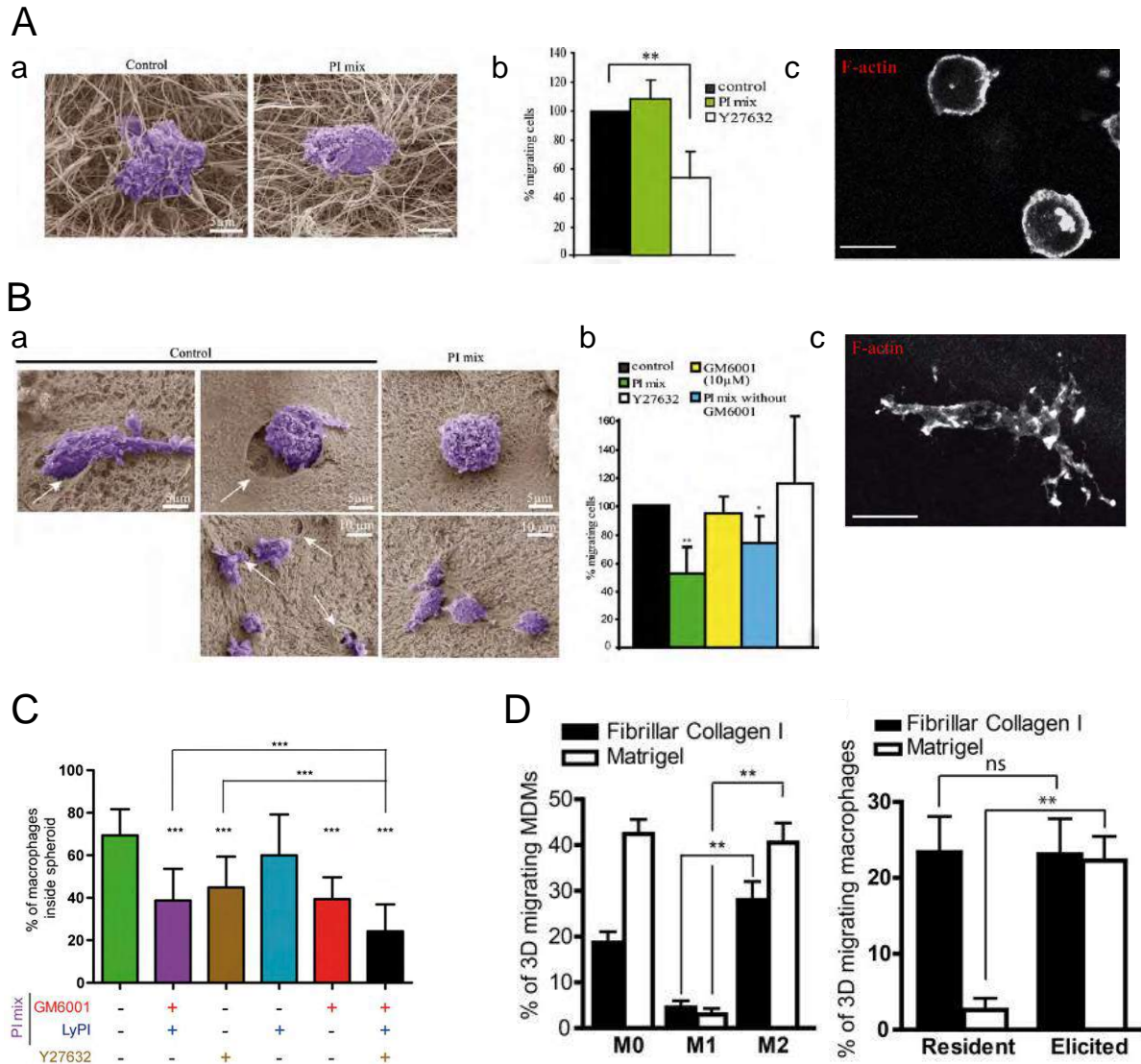


Figure 28 : La migration 3D *in vitro* des macrophages (extrait de Van Goethem et al., 2010, Guiet et al., 2011 et Cougoule et al., 2012). (A) (a) Microscopie électronique à balayage de macrophages infiltrant une matrice fibrillaire de collagène de type I. (b) Pourcentage de cellules infiltrant la matrice, en présence d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Pi mix) ou de l'inhibiteur de ROCK (Y27632). (c) Le marquage de la F-actine montre une morphologie arrondie. (B) Microscopie électronique à balayage de macrophages infiltrant une matrice de Matrigel™. (b) Pourcentage de cellules infiltrant la matrice, en présence d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Pi mix), de l'inhibiteur de MMP (GM6001), du cocktail d'inhibiteurs de protéases sans GM6001 (Pi mix sans GM6001) ou de l'inhibiteur de ROCK (Y27632). (c) Le marquage de la F-actine montre une morphologie protrusive. (C) Pourcentage de macrophages infiltrant un sphéroïde de tumeur, en présence d'inhibiteurs. (D) Pourcentage de macrophages infiltrant les matrices (collagène fibrillaire I pour la migration amiboïde et le Matrigel™ pour la migration mésenchymateuse), en fonction de la polarisation et l'origine des cellules.

L'équipe a également réalisé des expériences d'infiltration de macrophages avec un autre modèle décrit précédemment, les sphéroïdes de cellules tumorales. Pour rappel, les cellules tumorales cultivées dans ces structures 3D permettent d'obtenir des sphères cohésives comportant de nombreuses protéines de la matrice extracellulaire sécrétées par les cellules tumorales, imitant ainsi un tissu (Guiet et al., 2011). Les macrophages co-cultivés avec ces

sphéroïdes de 0,5 mm de diamètre sont capables d'infiltrer les sphéroïdes en utilisant les deux modes de migration.

Les macrophages infiltrant le Matrigel™ ou le collagène I gélifié utilisent différents types de protéases afin de dégrader la matrice. En effet, contrairement à la migration mésenchymateuse des cellules tumorales, seule une inhibition simultanée des protéases lysosomales et des MMPs permet une inhibition efficace de la migration mésenchymateuse des macrophages (Van Goethem et al., 2010). Les inhibiteurs de MMPs seuls n'inhibent pas la migration et les inhibiteurs de protéases lysosomales ne l'inhibent que partiellement, suggérant que les MMPs seraient nécessaires mais pas suffisantes dans ce modèle et qu'un effet synergique des deux familles de protéases a lieu. Toutefois, dans le collagène natif, la migration mésenchymateuse des macrophages est totalement dépendante des MMPs. Lorsque les macrophages infiltrent des sphéroïdes de cellules tumorales, les inhibiteurs de MMPs peuvent inhiber la migration autant que les inhibiteurs de protéases lysosomales (figure 28). Il est probable que les macrophages ont la possibilité d'exprimer certains récepteurs ou voies de signalisation particuliers en réponse aux propriétés biochimiques, biophysiques et architecturales de l'environnement extracellulaire, conduisant à la sécrétion de différents types de protéases. Le mode migratoire utilisé reste encore à être déterminé, de même que les protéases impliquées selon les tissus *in vivo* infiltrés par les macrophages.

Il est important de noter que la migration mésenchymateuse des macrophages n'est pas partagée par les autres leucocytes motiles (neutrophiles, lymphocytes T) qui sont incompetents pour la protéolyse de la matrice (Cougoule et al., 2012; Friedl & Weigelin, 2008; Rowe & Weiss, 2009) et donc incapables d'infiltrer les matrices denses *in vitro*. Une étude récente montre également que, *in vivo* et *ex vivo*, les lymphocytes T sont incapables d'infiltrer les zones denses de collagène aux alentours de tumeurs humaines (Salmon et al., 2012). Cette observation corrobore donc l'idée que ces cellules ne peuvent utiliser la migration mésenchymateuse nécessaire pour l'infiltration de ces régions. Cependant, il reste encore à déterminer si les leucocytes, notamment les macrophages, peuvent adopter ce mode de migration dans un contexte *in vivo*.

2.4.2 Les capacités migratoires selon la polarisation des macrophages

L'équipe a étudié l'influence de la polarisation des macrophages sur leur migration 3D (Cougoule et al., 2012). Les résultats montrent que les macrophages humains M1 polarisés *in vitro* avec l'IFN- γ ou le TNF- α n'effectuent aucune migration à la fois dans les matrices denses et poreuses. En revanche, les macrophages M2 obtenus par incubation avec l'IL-4 sont

capables d'utiliser les modes amiboïde et mésenchymateux, tout comme des macrophages dérivés de monocytes (incubés avec du M-CSF uniquement). Des résultats similaires ont été obtenus avec des macrophages murins dérivés de la moelle osseuse. De plus, des macrophages résidents isolés à partir de la cavité péritonéale de souris saines peuvent utiliser la migration amiboïde, mais sont incapables d'infiltrer le Matrigel™ et donc de migrer avec le mode mésenchymateux. En revanche, des macrophages inflammatoires obtenus suite à une injection de thioglycollate dans la cavité péritonéale sont compétents pour les deux modes de migration. Ainsi, ces observations suggèrent que des macrophages avec des phénotypes distincts sont sujets à des régulations de leur capacité migratoire. Toutefois, il reste encore à déterminer si un même macrophage est capable d'effectuer des transitions entre les deux modes de migration en s'adaptant à l'architecture locale de la matrice.

La capacité des macrophages à utiliser la migration mésenchymateuse est possible grâce à des structures de dégradation de la matrice extracellulaire, les podosomes.

2.4.3 Les podosomes

Le modèle de dégradation de la gélatine permet de visualiser et quantifier les capacités dégradatives des cellules à un niveau subcellulaire au lieu de l'analyse du comportement migratoire de cellules entières. Le principe consiste à déposer les cellules au-dessus d'une fine couche de matrice marquée par fluorescence, d'observer précisément là où les cellules ont effectué de la dégradation, identifiées par des zones où la fluorescence a disparu. La résolution augmentée de cette méthode a permis la découverte, parmi des cellules invasives à forte capacité migratoire, de structures particulières d'adhérence constituées d'intégrines associées à des protrusions cellulaires qui dégradent la matrice, appelées invadosomes (Linder, 2009).

Les invadosomes sont des structures riches en actine qui possèdent des capacités de dégradation protéolytique de la matrice ([figure 29](#)) (Murphy & Courtneidge, 2011). Ils regroupent les podosomes, structures en forme d'anneau constitutivement assemblées dans des cellules de la lignée monocyttaire, dont les macrophages, les cellules dendritiques et les ostéoclastes (Linder, Wiesner, & Himmel, 2011) ; et les invadopodes, structures protrusives riches en actine observée dans des cellules cancéreuses invasives. Tout récemment, les podosomes ont également été retrouvés sur des cellules endothéliales (Seano, Chiaverina, et al., 2014; Seano, Daubon, Genot, & Primo, 2014). La relation entre podosomes et invadopodes n'est pas encore clairement établie, cependant leur architecture est définie par un cœur riche en filaments d'actine organisés en faisceau, dans lequel la machinerie de

polymérisation d'actine et ses protéines régulatrices opèrent pour générer des protrusions membranaires. Dans les podosomes, mais pas les invadopodes, ce cœur est entouré par une structure en anneau comprenant des protéines de signalisation et des protéines adaptatrices, dont des protéines des adhérences focales telles que la taline et la paxilline ([figure 29](#)) (van den Dries et al., 2013). Contrairement aux adhérences focales, les invadosomes ne sont pas associés à de larges complexes de filaments d'actine mais correspondent à des sites de polymérisation rapide de l'actine plus réduits en taille et contiennent des protéines régulatrices telles que la cortactine, la gelsoline, WASP, des GTPases Rho et Arp2/3. Des intégrines $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 3$ se localisent aux invadosomes et sont présents à la fois dans le cœur et dans la structure en anneau qui l'entoure.

Les podosomes sont impliqués dans des mécanismes de dégradation de la matrice extracellulaire, d'adhérence et de mécano-sensibilité (Collin et al., 2008; Collin et al., 2006). Ce sont des structures très dynamiques qui réalisent des fusions et fissions, présentant une durée de vie variant entre 2 et 10 min. Leurs capacités mécano-sensorielles sont assurées par des contractions d'acto-myosine et des élongations de filaments d'actine, et sont sujets à des fluctuations périodiques de leur rigidité (Labernadie, Thibault, Vieu, Maridonneau-Parini, & Charriere, 2010). La hauteur et rigidité moyenne des podosomes ne semblent être pas influencées par la nature de la protéine matricielle. Les podosomes peuvent s'organiser en « super-structures », appelées « *sealing zones* » (zones d'étanchéité) dans les ostéoclastes (Duplat et al., 2007; Jurdic, Saltel, Chabadel, & Destaing, 2006; Teitelbaum & Ross, 2003) et rosettes de podosomes (ou anneaux de podosomes) dans les macrophages activés (Cougoule et al., 2010; Poincloux et al., 2006), qui exercent une activité de protéolyse matricielle sur de larges surfaces.

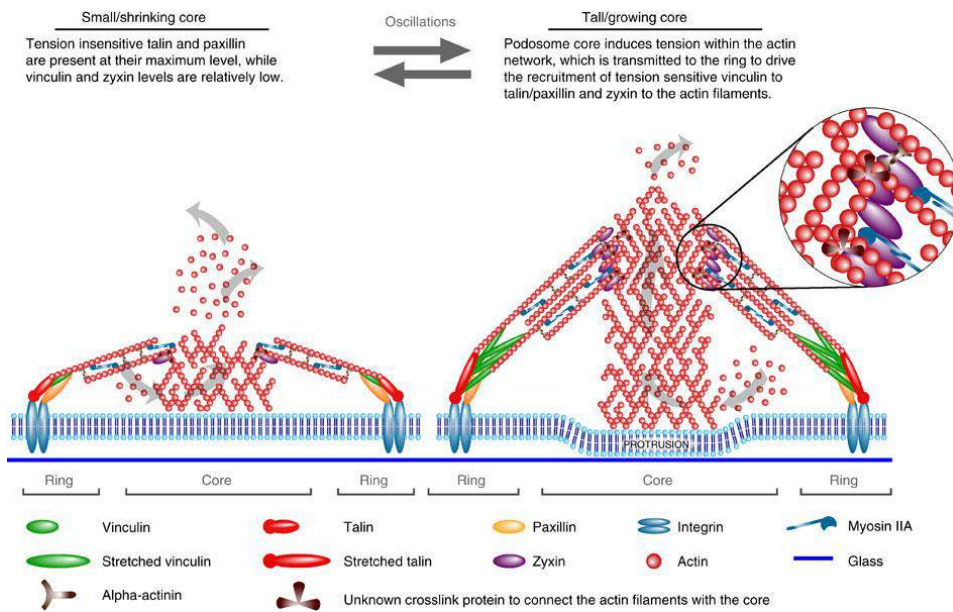
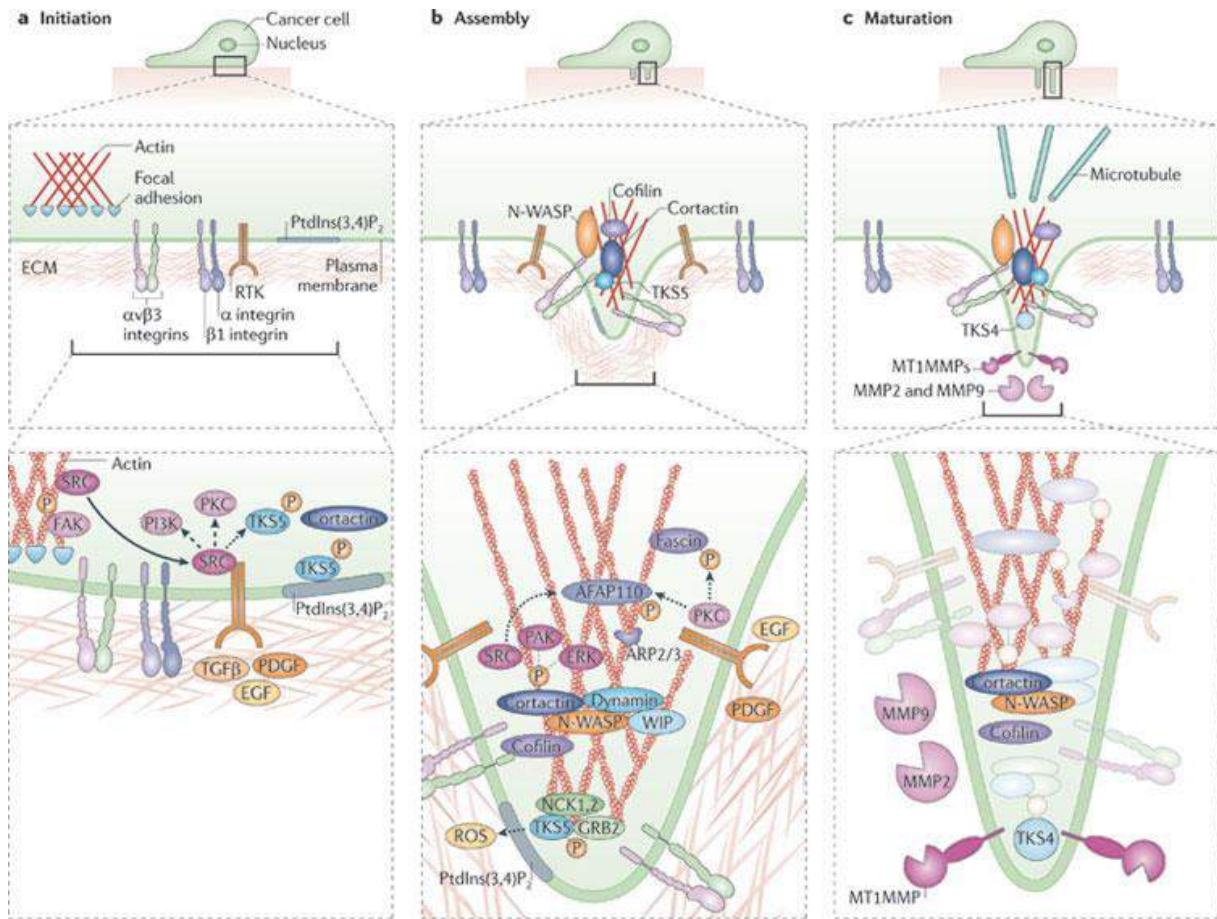


Figure 29 : La formation des invadosomes et la structure des podosomes (extrait de de Murphy and Courtneidge, 2011 et van den Dries et al., 2010)

Dans les environnements 3D, lorsque les macrophages migrent en utilisant le mode mésenchymateux, ils forment des protrusions cellulaires aux extrémités desquelles

s'accumulent l'actine filamenteuse, ainsi qu'un ensemble de protéines identifiées dans les podosomes telles que la paxiline, la vinculine, la taline, la gelsoline, des β -intégrines, etc. (Van Goethem et al., 2011; Van Goethem et al., 2010). De plus, l'activité protéolytique au niveau de ces protrusions a été mise en évidence par le signal fluorescent du collagène-DQTM et par la présence de trous dans la matrice extracellulaire en microscopie électronique à balayage. Du fait de ces observations, les protrusions formées par les macrophages pendant la migration mésenchymateuse furent appelées des « podosomes 3D » (figure 30) (Van Goethem et al., 2011; Wiesner et al., 2014). Au contraire, les macrophages utilisant le mode amiboïde ne présentaient ni de protrusions cellulaires, ni de co-accumulation particulière de constituants des podosomes avec l'actine filamenteuse.

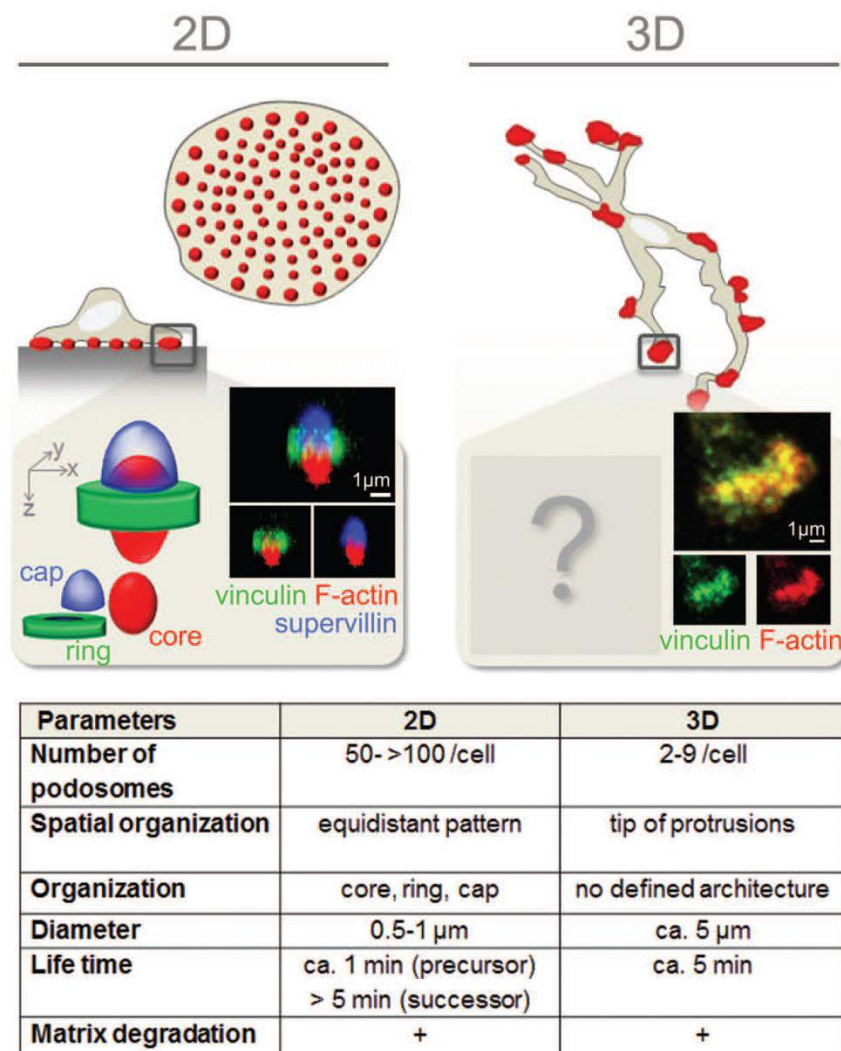


Figure 30 : Les podosomes 2D et 3D des macrophages (extrait de Wiesner et al., 2014)

Trois protéines identifiées dans l'équipe qui jouent des rôles importants dans la formation et la stabilité des podosomes sont Hck (*Hematopoietic cell kinase*), WASP et la filamine A, toutes les trois étant impliquées dans la migration mésenchymateuse. Hck est une tyrosine kinase de la famille Src exprimée spécifiquement par les phagocytes (Guiet et al., 2008). Dans les macrophages, Hck est exprimée au niveau des cœurs des podosomes (Cougoule et al., 2005) et son invalidation provoque d'une part une diminution nette de la formation, la stabilité, l'activité protéolytique et l'organisation en rosettes des podosomes (Guiet et al., 2012), et d'autre part une inhibition de la migration mésenchymateuse, suggérant l'importance de ces structures dans ce mode migratoire 3D. Hck, étant un composant de la voie de signalisation IL-4, est associée à une polarisation M2 des macrophages (Bhattacharjee, Pal, Feldman, & Cathcart, 2011). Par conséquent, les macrophages M2 présentent une formation des podosomes et migration mésenchymateuse améliorées par rapport aux macrophages non-polarisés. La filamine A est un *cross-linker* (agent réticulant) des filaments d'actine. Elle se lie également à différents partenaires, incluant des récepteurs membranaires, des enzymes et des intermédiaires de signalisation (Nakamura, Stossel, & Hartwig, 2011). Dans les macrophages, la filamine A se localise au niveau des anneaux des podosomes et des rosettes de podosomes et contrôle leur durée de vie et leur organisation, et par conséquent leur capacité de dégradation de la matrice extracellulaire. Comme pour Hck, l'invalidation de la filamine A a pour effet une migration mésenchymateuse moins efficace, sans affecter la migration amiboïde (Guiet et al., 2012).

Des maladies associées à une formation anormale des podosomes soulignent leur rôle essentiel dans les réponses immunitaires *in vivo*. Les macrophages et cellules dendritiques de patients atteints du Syndrome de Wiscott-Aldrich (causé par une mutation du gène codant pour WASP) ne forment pas de podosomes. En effet, WASP joue un rôle critique dans la régulation de la dynamique des podosomes, la dégradation de la matrice et la chimiotaxie. Les macrophages de patients atteints de la maladie auto-inflammatoire PAPA (*pyogenic sterile arthritis, pyoderma gangrenosum, and acne*) présentent également des défauts de formation de podosomes et des capacités migratoires diminuées.

Ainsi, jusqu'à présent, seuls trois effecteurs de la régulation des podosomes et de la migration mésenchymateuse ont été identifiés.

La migration cellulaire représente ainsi un processus fondamental impliqué dans une grande variété de fonctions biologiques, notamment au cours de la réponse immunitaire. Les macrophages, du fait de leur importante hétérogénéité et de leur plasticité, sont à ce jour les seuls leucocytes capables d'utiliser le mode de migration mésenchymateux. Aussi, cibler ce mode migratoire spécifiquement paraît être une stratégie intéressante pour le contrôle spécifique de la migration trans-tissulaire des macrophages. Toutefois, les mécanismes moléculaires et cellulaires de ce mode migratoire dans les macrophages restent encore mal connus et l'observation des deux types de migration n'a été effectuée que dans des contextes de modèles *in vitro*. Leur existence dans un environnement *in vivo*, les mécanismes mis en jeu dans ces environnements et leur rôle dans les maladies impliquant les macrophages restent encore à être déterminés.

Bilan bibliographique et projets de thèse

Pour résumer, nous venons de voir que les macrophages sont des cellules présentant une hétérogénéité et une plasticité formidable, leur permettant d'assurer de nombreuses fonctions telles que le maintien de l'homéostasie de l'organisme, la réparation tissulaire et le développement, pour en citer quelques-uns. Toutefois, nous avons également vu que le recrutement et la migration des monocytes et macrophages pouvaient participer activement à la progression de diverses pathologies. Aussi, une meilleure compréhension de ce processus afin de mieux pouvoir le contrôler est devenue une évidence thérapeutique. C'est pourquoi notre équipe s'est focalisée sur cette thématique. En effet, alors que la majorité des études sur la migration 3D a été menée sur des cellules tumorales, l'équipe s'est spécialisée dans la caractérisation des capacités migratoires des macrophages dans des environnements 3D *in vitro*, mimant plus fidèlement leur comportement *in vivo*. Ainsi, il a pu être observé que les macrophages adaptent leur mode migratoire selon l'environnement rencontré puisqu'ils utilisent le mode amiboïde dépendante de la voie ROCK dans les matrices poreuses et le mode mésenchymateux dépendant de protéases dans les matrices denses. La migration mésenchymateuse présente un intérêt tout particulier puisque les macrophages sont les seuls leucocytes décrits à ce jour comme étant capables d'utiliser ce mode migratoire afin de dégrader les matrices denses *in vitro* pour se créer des chemins.

A ce stade des travaux, et au début de mon travail, plusieurs questions restaient en suspens :

- Etant donné la grande diversité des populations de macrophages, il est encore impossible d'affirmer que tous les macrophages sont capables d'utiliser la migration amiboïde et la migration mésenchymateuse, ou à l'inverse que ces modes sont restreints à différentes populations de macrophages.

- L'identification des mécanismes moléculaires qui favorisent la mise en place de la migration amiboïde et la migration mésenchymateuse des macrophages pourrait certainement fournir des outils importants pour la régulation de la migration de ces cellules. Toutefois, peu de connaissances sur les mécanismes moléculaires et cellulaires mis en jeu au cours de la migration 3D des macrophages existent aujourd'hui.
- Les résultats obtenus jusqu'à présent sur la migration 3D des macrophages proviennent d'études *in vitro* utilisant des matrices purifiées. Bien que ces modèles fournissent des indices sur le phénomène de migration, ils ne permettent pas de reproduire un véritable environnement *in vivo*. Ainsi, il reste encore à déterminer si le comportement *in vitro* des macrophages représente réellement leur comportement *in vivo*, et donc déterminer si les deux modes migratoires existent dans de vrais tissus.
- De plus, s'il s'avère que la migration amiboïde et la migration mésenchymateuse sont pertinentes *in vivo*, il est possible de s'interroger sur les conditions de mise en place de ces phénotypes. En effet, une possibilité serait que la migration mésenchymateuse, comme il a été observé *in vitro*, soit restreinte à des tissus de plus grande densité et rigidité, par exemple dans le cas d'une tumeur où une rigidification du stroma est souvent observée.

Mon travail de thèse a consisté à apporter des réponses à ces interrogations et hypothèses. Pour cela, grâce à des analyses comparatives de transcriptomique effectuées sur des macrophages en cours de migration 3D, j'ai cherché à identifier un nouveau mécanisme impliqué dans la mise en place de la migration mésenchymateuse *in vitro*. Ceci m'a conduit à identifier un nouvel effecteur de la migration 3D des macrophages ([chapitre 1 des résultats](#)). En parallèle, j'ai caractérisé la migration 3D des macrophages dans des tissus vivants en développant au sein de l'équipe deux approches que sont les explants tissulaires *ex vivo* et la microscopie intravitale *in vivo* ([chapitre 2 des résultats](#)). Finalement, le [chapitre 3](#) sera consacré à des résultats supplémentaires, notamment dans la mesure des propriétés biophysiques des tissus, en corrélation avec le mode migratoire des macrophages dans ces tissus. Ces projets m'ont ainsi permis d'avancer dans la caractérisation des mécanismes moléculaires et cellulaires de la migration 3D des macrophages, notamment dans un contexte *in vivo*.

Résultats

Chapitre 1

Identification de p27^{kip1} comme nouvel effecteur de la migration mésenchymateuse des macrophages

1 Introduction

Les précédents résultats de l'équipe ont montré que les macrophages pouvaient réaliser deux modes de migration différents selon les propriétés de la matrice dans laquelle ils évoluent (Van Goethem et al., 2010). Toutefois, à mon arrivée dans l'équipe, de nombreuses questions n'avaient pas encore de réponses. Plusieurs effecteurs de la migration mésenchymateuse des macrophages avaient été identifiés, à savoir WASP, Hck et la filamine A (Cougoule et al., 2005; Dovas et al., 2009; Guiet et al., 2012). Tous ces effecteurs semblent participer à la migration mésenchymateuse *via* leur action sur les podosomes et notamment l'activité de dégradation de la matrice extracellulaire. L'équipe était donc à la recherche d'autres mécanismes moléculaires et cellulaires participant à la migration 3D des macrophages, et en particulier à la migration mésenchymateuse.

Afin d'y parvenir, l'équipe avait entrepris avant mon arrivée une analyse transcriptomique comparative de macrophages migrant en 2D et en 3D, utilisant l'un ou l'autre mode de migration, afin d'identifier les gènes régulés spécifiquement au cours de ces processus. Pour ce faire, les ARN totaux de macrophages sous les différentes conditions de migration ont été extraits et analysés sur des puces « *microarray* » comportant 44,000 sondes (4x44K *Whole Human Genome*). Les résultats complets de cette étude sont actuellement en cours de préparation pour un manuscrit dont je suis co-signataire. Brièvement, les analyses

ont montré que la migration mésenchymateuse module l'expression d'un plus grand nombre de gènes comparé à la migration amiboïde (930 gènes contre 185 gènes, respectivement). Ceci pourrait expliquer pourquoi un temps de latence d'environ 24 heures est observé lorsque les macrophages sont déposés à la surface d'une matrice dense qu'ils doivent infiltrer en utilisant la migration mésenchymateuse : ils doivent mettre en place un vaste programme transcriptionnel avant de pouvoir migrer. Les gènes régulés au cours de cette migration ont pu être classés en quatre groupes fonctionnels majeurs : 1) la régulation de la croissance, la prolifération, la différenciation cellulaire et l'apoptose ; 2) la régulation de la migration cellulaire et les fonctions immunitaires (phagocytose, dégranulation et réponse immunitaire) ; 3) la régulation du métabolisme cellulaire (métabolisme des acides nucléiques, des lipides, de l'ATP et des carbohydrates) ; et 4) la régulation de l'expression génique et de la synthèse, de la dégradation et du trafic de protéines. Parmi ces groupes, le premier fut le plus large, notamment les gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire. Nous avons ainsi pu identifier le gène codant pour la protéine p27^{kip1}, un inhibiteur de kinase dépendante des cyclines, dont l'expression est régulée à la hausse au cours de la migration mésenchymateuse. Cette protéine avait auparavant été identifiée dans la migration 2D des cellules tumorales *via* l'inhibition de la voie Rho/ROCK (Berton et al., 2009; Besson, Gurian-West, Schmidt, Hall, & Roberts, 2004). Ainsi, grâce à des approches pharmacologiques, d'inhibition par interférence ARN et de souris transgéniques exprimant des mutants de cette protéine, j'ai pu étudier le rôle de p27^{kip1} et l'inhibition de la voie Rho/ROCK dans la migration 3D des macrophages.

Par ailleurs, cette étude permet de répondre à une autre question restée sans réponse : tous les macrophages sont-ils capables d'utiliser la migration amiboïde et la migration mésenchymateuse, ou alors ces modes sont-ils restreints à différentes populations de macrophages ? Autrement dit, un macrophage en cours de migration 3D est-il capable, lorsqu'il rencontre une matrice possédant des propriétés différentes, de réaliser une transition d'un mode migratoire à un autre ? Grâce à l'utilisation d'une matrice composite constituée d'une couche de matrice induisant la migration mésenchymateuse des macrophages (le collagène I polymérisé sous forme de gel) au-dessus d'une matrice déclenchant la migration amiboïde (le collagène I fibrillaire), nous avons pu répondre à cette question.

Les résultats obtenus suite à cette étude ont été publiés dans le *Journal of Cell Science* et ont ainsi montré 1) qu'un macrophage unique est capable de réaliser les deux modes de

migration 3D et 2) que l'inhibition de la migration amiboïde, *via* l'inhibition de Rho/ROCK par p27^{kip1}, participe à la mise en place de la migration mésenchymateuse des macrophages.

2 Résultats

RESEARCH ARTICLE

Rho/ROCK pathway inhibition by the CDK inhibitor p27^{kip1} participates in the onset of macrophage 3D-mesenchymal migration

Philippe Gui^{1,2}, Arnaud Labrousse^{1,2}, Emeline Van Goethem^{1,2}, Arnaud Besson³,
Isabelle Maridonneau-Parini^{1,2,*} and Véronique Le Cabec^{1,2}

ABSTRACT

Infiltration of macrophages into tissue can promote tumour development. Depending on the extracellular matrix architecture, macrophages can adopt two migration modes: amoeboid migration – common to all leukocytes, and mesenchymal migration – restricted to macrophages and certain tumour cells. Here, we investigate the initiating mechanisms involved in macrophage mesenchymal migration. We show that a single macrophage is able to use both migration modes. Macrophage mesenchymal migration is correlated with decreased activity of Rho/Rho-associated protein kinase (ROCK) and is potentiated when ROCK is inhibited, suggesting that amoeboid inhibition participates in mechanisms that initiate mesenchymal migration. We identify the cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor p27^{kip1} (also known as CDKN1B) as a new effector of macrophage 3D-migration. By using p27^{kip1} mutant mice and small interfering RNA targeting p27^{kip1}, we show that p27^{kip1} promotes mesenchymal migration and hinders amoeboid migration upstream of the Rho/ROCK pathway, a process associated with a relocation of the protein from the nucleus to the cytoplasm. Finally, we observe that cytoplasmic p27^{kip1} is required for *in vivo* infiltration of macrophages within induced tumours in mice. This study provides the first evidence that silencing of amoeboid migration through inhibition of the Rho/ROCK pathway by p27^{kip1} participates in the onset of macrophage mesenchymal migration.

KEY WORDS: Macrophage, 3D-migration, Amoeboid, Mesenchymal, Rho/ROCK pathway, p27^{kip1}, CDKN1B

INTRODUCTION

Tissue infiltration by macrophages plays a central role in initiation and progression of immune and inflammatory responses, clearance of microorganisms and tissue repair. However, macrophages also promote the development of pathologies, such as chronic inflammatory diseases (Elkington and Friedland, 2006; Maruotti et al., 2007), atherosclerosis (Weber et al., 2008) and cancer (Porta et al., 2011), by causing tissue lesions (Luster et al., 2005; Pollard, 2009) or by enhancing

tumour growth and formation of metastases (Pollard, 2009; Porta et al., 2011). Therefore, specific control of macrophage tissue infiltration has been proposed as a new anti-inflammatory and anti-cancer strategy (Mackay, 2008; Qualls and Murray, 2010; Ruhrberg and De Palma, 2010).

When macrophages migrate in order to reach tissue sites, they are confronted with many different environments that can either be two-dimensional (2D) on the vascular endothelium, the lumen of peritoneum and the pleura; or three-dimensional (3D) inside tissues comprising cellular components and extracellular matrix (ECM). The interstitial ECM is primarily composed of collagen I fibres that are crosslinked into a stable mesh (Even-Ram and Yamada, 2005; Schindler et al., 2006), ranging from loose fibrillar regions to densely compacted connective tissue with submicron spacing (Friedl and Weigelin, 2008; Kalluri, 2003; Schindler et al., 2006). In addition, the biophysical properties of tissues can vary during the progression of a disease; for example remodelling of the ECM during tumour development leads to tissue stiffening (DuFort et al., 2011).

It has been established that 2D and 3D cell migration involve distinct mechanisms (Doyle et al., 2009). By using several types of ECM, we have recently shown that, depending on the matrix architecture, human monocyte-derived macrophages (hMDMs) are capable of employing the two modes of 3D-migration originally described for tumour cells (Van Goethem et al., 2010). Amoeboid migration commonly refers to rounded or ellipsoid cells that slide through matrix pores, and show little to no adhesion to the matrix (Friedl and Wolf, 2003; Sahai and Marshall, 2003); it is triggered in macrophages that migrate through loose matrices, such as fibrillar collagen (Van Goethem et al., 2010). In contrast, mesenchymal migration is characterised by an elongated cell shape with membrane protrusions and proteolytic matrix degradation (Friedl and Wolf, 2003; Sahai and Marshall, 2003), and it is only triggered in macrophages migrating through dense matrices such as Matrigel, gelled collagen or native collagen (Van Goethem et al., 2010; Wiesner et al., 2014). Whereas amoeboid migration has been described for all leukocytes, macrophages appear to be the only leukocytes that are able to utilise mesenchymal migration (Cougoule et al., 2012). Therefore, this migration mode represents a promising pharmacological target for specific control of macrophage tissue infiltration and deserves broader characterisation.

Like tumour cell amoeboid migration, macrophage amoeboid migration is dependent on Rho-associated protein kinase (ROCK) activity and independent of protease-mediated ECM degradation (Van Goethem et al., 2010). In contrast, macrophage mesenchymal migration is inhibited by protease inhibitors but not

¹Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), IPBS (Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale), 205 route de Narbonne, BP64182, F-31077 Toulouse, France. ²Université de Toulouse, UPS, IPBS, F-31077 Toulouse, France. ³INSERM UMR1037-Cancer Research Center of Toulouse, Université de Toulouse, CNRS ERL5294, Toulouse, France.

*Author for correspondence (isabelle.maridonneau-parini@ipbs.fr)

by ROCK inhibitors (Van Goethem et al., 2010). In contrast to tumour cell mesenchymal migration, which mainly depends on matrix metalloprotease (MMP) activity, macrophage mesenchymal migration can be mediated by other protease families, including lysosomal cysteine cathepsins (Jevnikar et al., 2012; Van Goethem et al., 2010), in addition to MMPs such as MT1-MMP (Guiet et al., 2011; Wiesner et al., 2013). Macrophage mesenchymal migration, but not amoeboid migration, is also dependent on Hck (Cougoule et al., 2010), Filamin-A (Guiet et al., 2012) and 3D-podosomes (Van Goethem et al., 2011).

To further characterise macrophage 3D-mesenchymal migration, we examined the mechanisms that participate in specifically triggering this migration mode within dense matrices. It has been shown that tumour cells can spontaneously employ mesenchymal or amoeboid migration within porous or dense matrices depending on the cell line (Carragher et al., 2006; Sahai and Marshall, 2003). In addition, typical mesenchymal tumour cell lines, such as HT1080 cells, BE colon carcinoma cells or WM266.4 melanoma cells, can overcome mesenchymal migration inhibitors by switching to amoeboid migration. In contrast, we have shown in a previous study that macrophages adapt their migration mode to the matrix architecture and that, in a given matrix, essentially one migration mode is observed (Van Goethem et al., 2010). In addition, pharmacological inhibition of macrophage mesenchymal migration did not induce a switch to amoeboid migration in dense matrices (Van Goethem et al., 2010) as opposed to tumour cells (Carragher et al., 2006; Friedl and Wolf, 2003; Sahai and Marshall, 2003), suggesting that amoeboid migration is switched off. Finally, in a given matrix, only part of the initial macrophage population was able to migrate; after 72 h, the percentage of macrophage migration rarely exceeded 40%. Altogether, these observations lead us to propose the following: either, 1) triggering of macrophage mesenchymal migration in dense matrices is restricted to one particular macrophage subpopulation or, 2) all migrating macrophages are able to use both migration modes but only activate mesenchymal migration upon contact with dense matrices while silencing amoeboid migration.

In this present study, we investigate these two hypotheses and show that a single macrophage is able to employ both mesenchymal and amoeboid migration. In addition, macrophage mesenchymal migration is correlated with a decreased Rho/ROCK activity and is enhanced by ROCK inhibition, which suggests that amoeboid migration inhibition participates in the onset of macrophage mesenchymal migration. By searching for possible molecular effectors of this process, we took interest in the cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor p27^{kip1} (also known as CDKN1B), because it has been previously shown to be involved in 2D cell migration through inhibition of RhoA (Besson et al., 2004b). Accordingly, we identify p27^{kip1} as a new effector of macrophage 3D-migration *in vitro* and *in vivo* that acts upstream of the Rho/ROCK pathway in order to potentiate mesenchymal migration, probably by inhibiting amoeboid migration.

RESULTS

A single macrophage can employ both amoeboid and mesenchymal migration

We first examined whether a single macrophage can employ both migration modes or whether triggering of mesenchymal migration in dense matrices is restricted to one particular

subpopulation of macrophages that cannot employ amoeboid migration. We, therefore, designed a composite matrix that comprised gelled collagen (pore size <1 µm) polymerised on top of fibrillar collagen (pore size >2 µm) (Fig. 1). We have previously shown that macrophages utilise mesenchymal migration in gelled collagen, like in Matrigel, and amoeboid migration in fibrillar collagen (Van Goethem et al., 2010). hMDMs started to infiltrate gelled collagen 24 h after being seeded on top of the composite matrix, by employing mesenchymal migration – as attested by elongated and protrusive cell morphology that was observed by using time-lapse video-microscopy (Fig. 1, white arrow). Once they reached the interface between the two matrices, hMDMs proceeded to migrate into the fibrillar collagen layer by employing amoeboid migration, as evidenced by their round cell shape (Fig. 1, black arrow). The reverse was observed when hMDMs were seeded on a composite matrix made of fibrillar collagen polymerised on the top of Matrigel (data not shown). These results show that a single hMDM is able to use both modes of migration by adapting to the matrix architecture, and that mesenchymal and amoeboid migration are not restricted to distinct macrophage subpopulations.

Macrophage mesenchymal migration is potentiated by the ROCK inhibitor Y27632 and correlates with decreased Rho/ROCK activity

Since a single macrophage is capable of employing both migration modes but only uses mesenchymal migration in matrices where amoeboid migration is not spontaneously activated, we next hypothesised that silencing of amoeboid migration triggers mesenchymal migration. Therefore, we investigated whether inhibition of a key effector of amoeboid migration facilitates macrophage mesenchymal migration through dense matrices.

Given that amoeboid migration has been defined as a Rho/ROCK-dependent migration mode – as opposed to mesenchymal migration, which is Rho/ROCK-independent – a dose-response assay with the ROCK inhibitor Y27632 on macrophage 3D-migration was performed. The percentage of macrophages migrating inside the matrix was measured at different time points to evaluate the capacity of cells to initiate ECM infiltration. As shown on Fig. 2A, Y27632 inhibited amoeboid migration very efficiently in fibrillar collagen as expected since macrophages cannot employ mesenchymal migration upon inhibition of amoeboid migration in fibrillar collagen (Van Goethem et al., 2010). This is in sharp contrast with some tumor cell lines that can, indeed, employ mesenchymal migration by default in porous matrices (Carragher et al., 2006; Sahai and Marshall, 2003). However, in Matrigel, Y27632 significantly increased the percentage of migrating cells that used mesenchymal migration. A comparable increase was obtained with macrophages that migrated through gelled collagen – another dense matrix that triggers mesenchymal migration (158±16% and 256±101% of control at 20 µM and 40 µM Y27632, respectively; measured after 48 h of migration, mean±s.d., macrophages of three independent donors). This shows that inhibition of the Rho/ROCK pathway increases the percentage of macrophages that infiltrate dense matrices by using mesenchymal migration.

Distance of macrophage migration inside matrices was then used as an indicator of migration efficiency (Fig. 2B). Y27632 strongly decreased the migration distance in fibrillar collagen. In Matrigel, Y27632 did not increase the migration distance concurrently with the percentage of migration, but decreased it

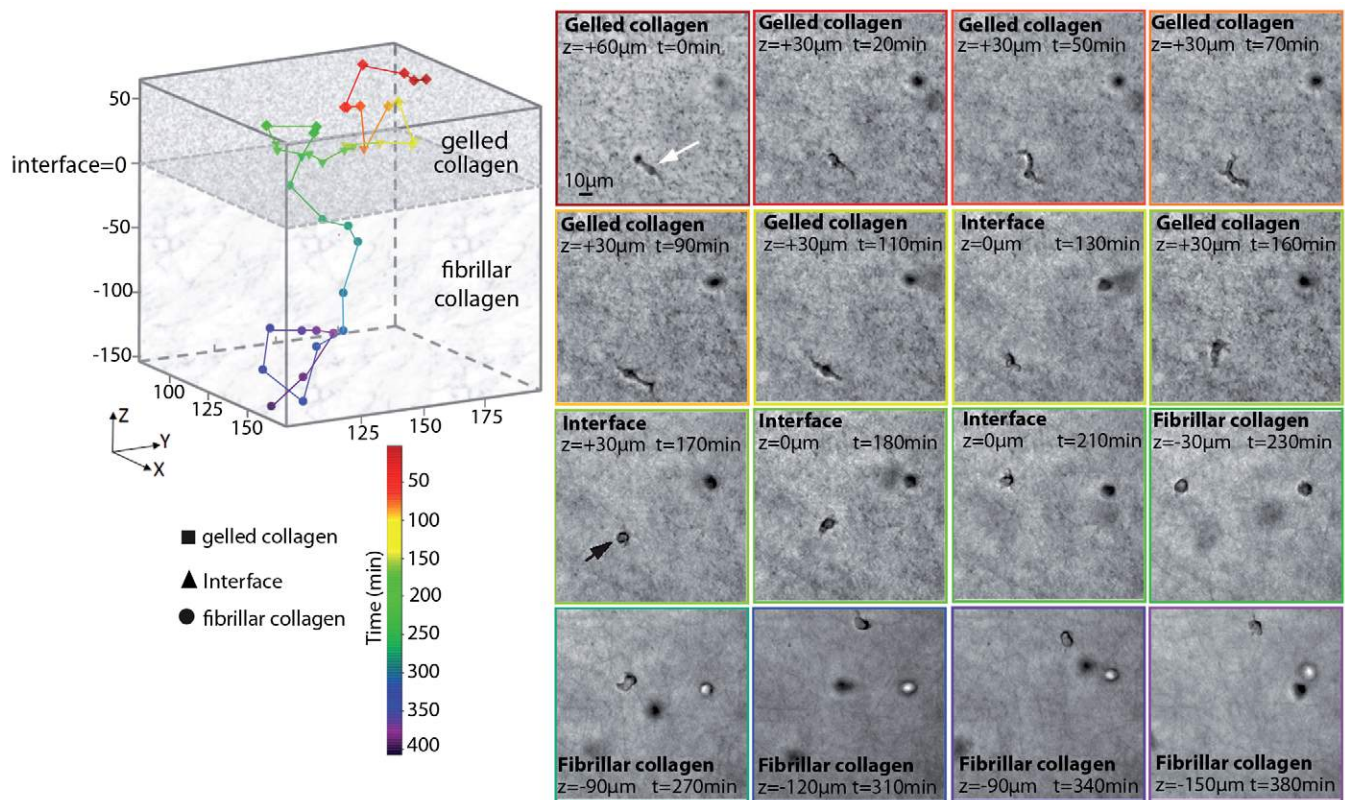


Fig. 1. A single hMDM can undergo both mesenchymal and amoeboid migration. hMDMs were loaded on a thick layer of gelled collagen polymerised on top of fibrillar collagen I. Cell migration was scored on day 3, and photographs of a single representative hMDM (white arrow, first picture) were collected every 10 min for 380 min using an inverted video-microscope, from the gelled collagen layer ($z=+60\ \mu\text{m}$ to $0\ \mu\text{m}$) to the fibrillar collagen layer ($z=0\ \mu\text{m}$ to $-150\ \mu\text{m}$). The x,y,z path followed by the cell in the matrices is shown in the 3D reconstitution diagram. A single hMDM was tracked and each point corresponds to its position at a given time. Squares correspond to the hMDM migrating in gelled collagen, triangles to the hMDM present at the interface between the two matrices and circles to the hMDM migrating through fibrillar collagen. The colour spectre range indicates the time scale. During the first 24 h hMDMs stayed on top of the gelled collagen and then migrated through the dense matrix using mesenchymal migration. At the interface, the hMDMs tended to return to the gelled collagen layer several times before shifting to amoeboid migration (black arrow) into the fibrillar collagen layer.

slightly. This indicates that inhibition of the Rho/ROCK pathway activates dense matrices infiltration by mesenchymal migration but not efficiency of this migration process per se.

Next, we investigated the effect of Y27632 on macrophage morphology in Matrigel (Fig. 2C). Control macrophages mainly show a round morphology when on top of Matrigel and an elongated morphology when inside, with 25% of migrating hMDMs remaining round; a morphology characteristic of amoeboid migration (Fig. 2C, arrows) (Van Goethem et al., 2010). In the presence of Y27632, macrophages on top of the matrix acquired a protrusive phenotype (Fig. 2C, images on the left). It also significantly reduced the percentage of round hMDMs inside Matrigel (Fig. 2C, graph). This suggests that, in addition to its potentiating effect on the number of hMDMs that employ mesenchymal migration, ROCK inhibition decreases the number of hMDMs that utilise Rho/ROCK-dependent amoeboid migration in dense matrices.

We next investigated Rho activity during macrophage 3D-mesenchymal migration and compared it to Rho activity during amoeboid migration, by performing western blot analysis of the phosphorylation states of two reliable markers of this pathway, cofilin and Ezrin–radixin–moesin (ERM) (Fuster et al., 2011; Takai et al., 2001). Migrating macrophages were lysed by boiling Laemmli buffer directly in matrices. Consequently, high amounts of proteins had to be loaded on gels to detect macrophage

proteins, explaining the poorly resolved immunoblots that are shown. The ratios of phospho-cofilin to cofilin and of phospho-ERM to ERM were reduced in macrophages migrating through gelled collagen and Matrigel compared to those migrating through fibrillar collagen (Fig. 2D,E). These results indicate that there is a significant reduction of the Rho/ROCK pathway activity during macrophage mesenchymal migration compared to amoeboid migration, which further suggests that inhibition of this signalling pathway is one of the mechanisms that triggers mesenchymal migration.

p27^{kip1} is a regulator of macrophage 3D-migration that triggers mesenchymal migration in dense matrices and reduces amoeboid migration efficiency in fibrillar collagen

It has previously been shown that the CDK inhibitor p27^{kip1} regulates tumour cell migration (Berton et al., 2009) through inhibition of the Rho/ROCK pathway in 2D environments (Besson et al., 2004b). p27^{kip1} interacts with RhoA, thereby blocking its activation by Rho guanine nucleotide-exchange factors. We, therefore, investigated whether p27^{kip1} is an effector of amoeboid migration inhibition during macrophage mesenchymal migration.

We first analysed p27^{kip1} expression levels in macrophages plated on 2D coverslips, or employing either amoeboid migration or mesenchymal migration in 3D matrices. Western blot analyses showed that p27^{kip1} was upregulated in hMDMs migrating

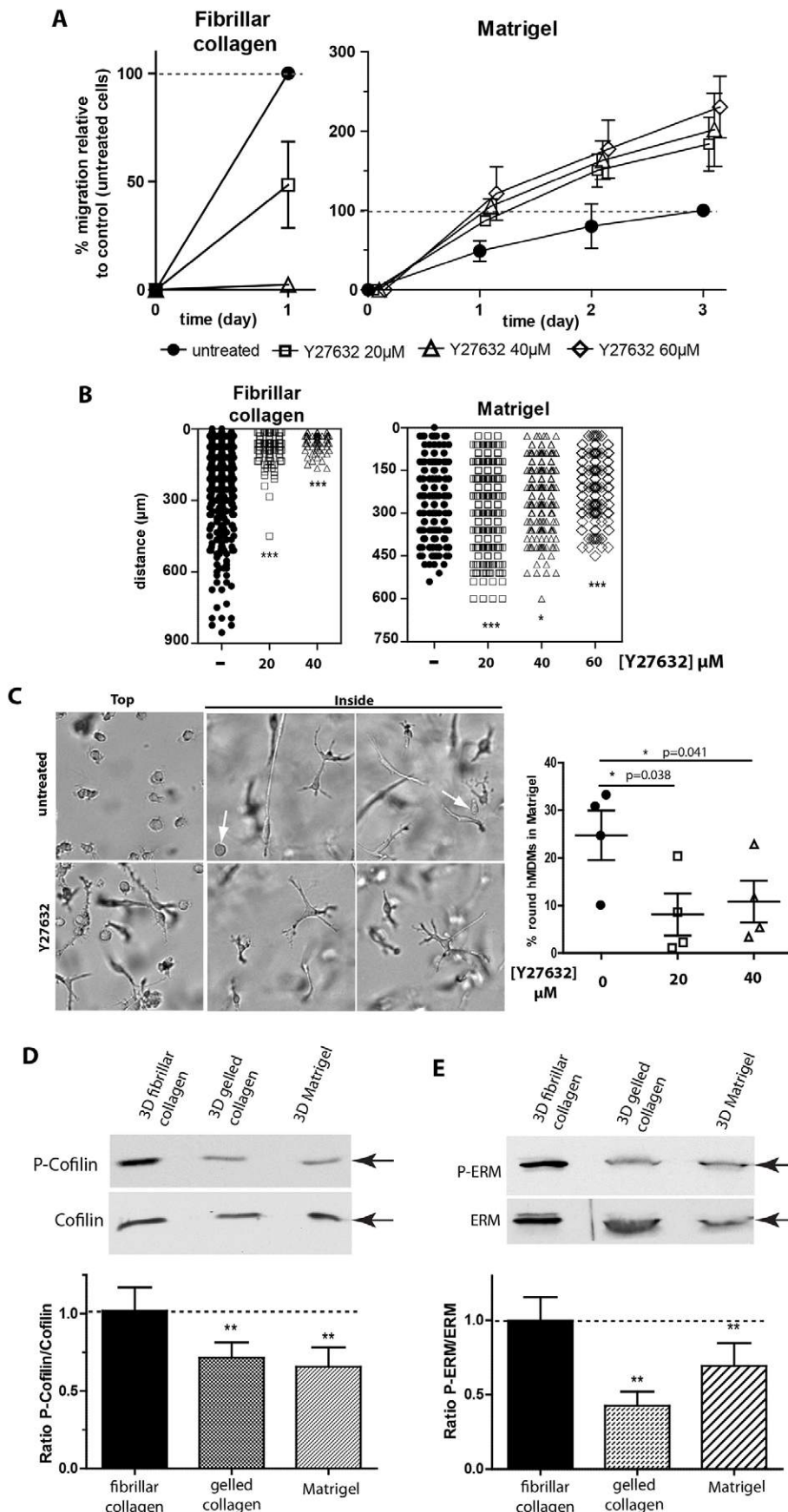


Fig. 2. Macrophage mesenchymal migration is potentiated following treatment with Y27632 and is correlated with decreased Rho/ROCK activity. (A,B) Dose-dependent effect of the ROCK inhibitor Y27632 on the percentage of hMDM migration (A) and the distance of migration (B) through fibrillar collagen or Matrigel. Migration experiments were conducted in the presence of indicated concentrations of Y27632. In A, results were normalised to the percentage of migration obtained with untreated macrophages at 24 h for fibrillar collagen and 72 h for Matrigel. Mean \pm s.d. of four independent donors are shown. For the z-distribution (B), each point represents the z-position (μ m) of one hMDM within the matrix (0 representing the surface of the matrix). Statistics: paired Student's *t*-test, two-tailed, 95% confidence interval. ***P*=0.009 and **P*=0.047 (A); **P*=0.026 and 0.020 (B) in gelled collagen and Matrigel, respectively). (C) The morphology of macrophages migrating through Matrigel in the presence or absence of Y27632 was assessed. The effect of the ROCK inhibitor on cell morphology on the top (left images) or inside Matrigel (middle and right images) is shown. The percentage of macrophages showing a round morphology inside the matrix (arrows) was quantified (graph). (D,E) Western blot analysis of cofilin, phosphorylated cofilin (C), ERM and phosphorylated ERM (D) in hMDMs from eight (D) or ten (C) independent donors, within 3D fibrillar collagen, 3D gelled collagen I and Matrigel following 3D-migration. Ratio of phospho-protein to total protein signal was calculated and normalised to the ratios scored in fibrillar collagen. Mean \pm s.e.m. are shown. Representative immunoblots are shown. Statistics: paired Student's *t*-test, two-tailed, 95% confidence interval. ***P*=0.0015 for gelled collagen and *P*=0.0042 for Matrigel (C); ***P*=0.0012 for gelled collagen and *P*=0.009 for Matrigel (D).

through 3D gelled collagen or Matrigel (mesenchymal migration) compared to 3D fibrillar collagen (amoeboid migration) or 2D coverslips (Fig. 3A). This suggests that p27^{kip1} is specifically required for macrophage mesenchymal migration. It is worth noticing that western blot analyses were performed by using the entire macrophage population, of which ~40% were able to infiltrate the matrix after 72 h, suggesting that the measured p27^{kip1} upregulation is an underestimation.

To investigate the role of p27^{kip1} in macrophage 3D-migration, we next compared the migration capabilities of bone-marrow-derived macrophages (BMDMs) isolated from wild-type (p27^{kip1+/+}) and p27^{kip1}-deficient (p27^{kip1-/-}) mice (Fero et al., 1996). These experiments were performed in either fibrillar collagen or Matrigel, in which mouse BMDMs – similarly to hMDMs – have been shown to use amoeboid or mesenchymal migration, respectively (Guiet et al., 2012). The percentage of cells migrating through Matrigel was significantly reduced in p27^{kip1-/-} BMDMs compared to p27^{kip1+/+} BMDMs (Fig. 3B). We then measured the migration distance of p27^{kip1-/-} BMDMs that were still able to migrate through Matrigel and observed that it was unchanged compared to wild-type cells (Fig. 3C). This indicates that p27^{kip1} – similar to pharmacological ROCK inhibition – increases the percentage of macrophages that are able to trigger mesenchymal migration but not the efficiency of the migration process by itself. In contrast, the percentage of p27^{kip1-/-} BMDMs using amoeboid migration in fibrillar collagen was not significantly different compared to p27^{kip1+/+} BMDMs (Fig. 3D). However, the distance of migration was significantly increased, with the maximal distance being 500 and 800 μm , and the deeper 20th percentile being 255 and 300 μm in p27^{kip1+/+} and p27^{kip1-/-} BMDMs, respectively (Fig. 3E). This suggests that p27^{kip1} does not control the ability of macrophages to employ amoeboid migration in fibrillar collagen but, rather, decreases the migration efficiency of macrophages once inside the matrix.

Comparable results were obtained with hMDMs in which p27^{kip1} expression was reduced by using a specific small interfering RNA (siRNA) targeting p27^{kip1} (Fig. 3F,G). In the timeframe (48–72 h) during which the expression of p27^{kip1} was reduced to 0.6-fold of control levels (Fig. 3F), the percentage of macrophages migrating in Matrigel was found to be decreased compared to cells transfected with a scrambled siRNA as a control (Fig. 3G). Similar results were observed in gelled collagen (Fig. 3G). Together, these results show that p27^{kip1} is part of the macrophage 3D-migration machinery that promotes mesenchymal migration and reduces amoeboid migration efficiency.

p27^{kip1} deficiency is counterbalanced by pharmacological ROCK inhibition and induces a mesenchymal-to-amoeboid migration switch in dense matrices

Given that p27^{kip1} is described as an inhibitor of the Rho/ROCK signalling pathway (Besson et al., 2004b), we hypothesised that its positive effect on macrophage mesenchymal migration through dense matrices occurs through RhoA inhibition and, therefore, amoeboid migration silencing. As a consequence, p27^{kip1} deficiency should have two main effects on macrophage migration: 1) it should promote macrophage amoeboid migration in dense matrices, such as Matrigel and, 2) its inhibitory effect on mesenchymal migration should be reversed by restoring the inhibition of the Rho/ROCK pathway with a ROCK inhibitor.

To explore these hypotheses, we analysed the percentage of migration of p27^{kip1-/-} BMDMs and p27^{kip1+/+} BMDMs in Matrigel and fibrillar collagen in the presence or absence of Y27632. In these experiments, the proportion of round BMDMs migrating through Matrigel was also scored and used as an indicator of amoeboid migration in this dense matrix. In fibrillar collagen, BMDMs from p27^{kip1+/+} and p27^{kip1-/-} mice both adopted the typical round amoeboid-like shape (Fig. 4A, top). In Matrigel, both cell genotypes mainly exhibited an elongated spindle shape, with F-actin clusters being observed at the tips of membrane protrusions, as previously described in human macrophages employing mesenchymal migration (Fig. 4A, bottom, arrowheads). However, we observed a significant increase in the percentage of round BMDMs in p27^{kip1-/-} compared to p27^{kip1+/+} BMDMs in Matrigel (Fig. 4B). Similar results were obtained with hMDMs upon p27^{kip1} silencing (Fig. 4C). This suggests that amoeboid migration is, indeed, activated in macrophages that are still able to migrate through Matrigel in the absence of p27^{kip1}.

As expected, Y27632 (10 μM) efficiently inhibited amoeboid migration (percentage of migration and migration distance) of both p27^{kip1+/+} and p27^{kip1-/-} BMDMs in fibrillar collagen (Fig. 4D). In Matrigel, Y27632 had no significant effect on p27^{kip1+/+} BMDM migration (percentage of migration and percentage of round cells) as predicted (Fig. 4E, left). In contrast, the reduced migration ability of p27^{kip1-/-} BMDMs and the increased number of round p27^{kip1-/-} BMDMs were completely restored to control levels by Y27632 (Fig. 4E, right) showing that pharmacological ROCK inhibition is able to counterbalance p27^{kip1} deficiency.

Altogether, these results show that p27^{kip1} deficiency, in addition to its inhibitory effect on macrophage mesenchymal migration through dense matrices, prompts macrophages to adopt amoeboid migration as an alternative to mesenchymal migration in Matrigel. As all these effects can be reversed by pharmacological inhibition of ROCK, this suggests that p27^{kip1} triggers macrophage mesenchymal migration by switching off amoeboid migration through inhibition of the Rho/ROCK pathway.

p27^{kip1} relocation from the nucleus to the cytoplasm is required for macrophage mesenchymal migration

p27^{kip1} is mainly recognised as a cell cycle regulator and is generally localised in nuclei (Sherr and Roberts, 1999), although other functions and cytoplasmic localisation have also been reported (Besson et al., 2006). In contrast, the Rho/ROCK signalling usually takes place in the cytoplasm, although nuclear localisation of RhoA (Shabo et al., 2008) and ROCK2 (Tanaka et al., 2006) have also been reported. So, we next investigated whether the role of p27^{kip1} in macrophage 3D-migration is associated with its nuclear or cytoplasmic localisation.

We examined the intracellular localisation of p27^{kip1} during macrophage 3D-migration. p27^{kip1} phosphorylation on Ser10, although not sufficient for the nuclear to cytoplasmic redistribution of p27^{kip1}, is necessary for this process (Ishida et al., 2000; Kotake et al., 2005; Rodier et al., 2001). Therefore, pSer10-p27^{kip1} can be present in both the cytoplasm and the nucleus, but the fraction of p27^{kip1} which is effectively exported to the cytoplasm is necessarily phosphorylated on Ser10. We first performed western blot analysis of pSer10-p27^{kip1} and total p27^{kip1} in macrophages plated in 2D or migrating in 3D through fibrillar collagen, gelled collagen or Matrigel (Fig. 5A). The

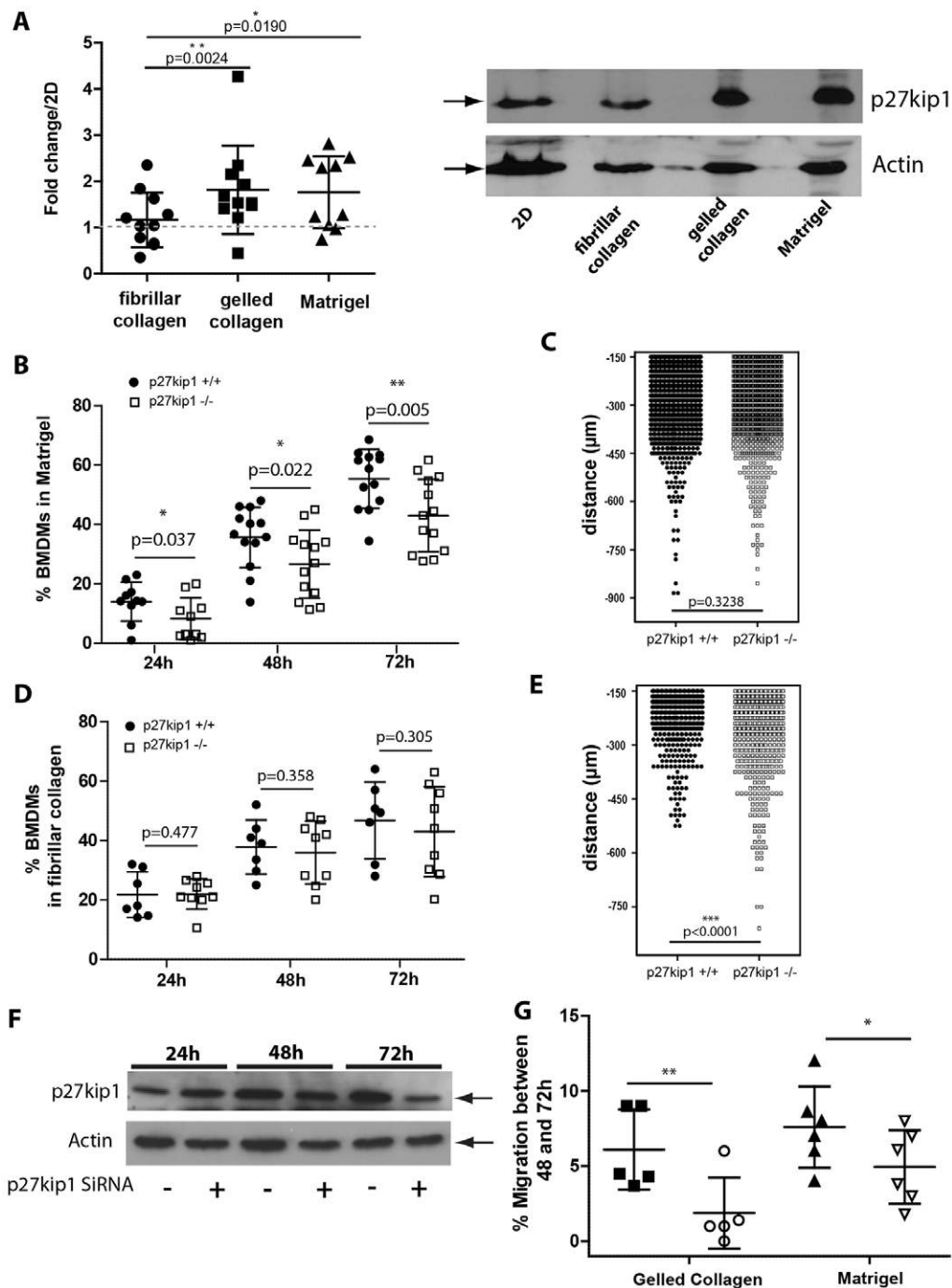


Fig. 3. p27^{kip1} promotes macrophage 3D-mesenchymal migration and reduces amoeboid migration efficiency. (A) p27^{kip1} is upregulated during macrophage mesenchymal but not amoeboid migration. Western blot analysis of p27^{kip1} expression levels in hMDMs from 10 independent donors in a 2D environment, and 3D Matrigel, fibrillar- and gelled collagen I following 72 h of migration. Fold changes compared to a 2D environment after normalisation to actin (loading control) are shown. A representative immunoblot is shown. Actin was used as a loading control. Statistics: two-tailed paired Student's *t*-test, 95% confidence interval (**P*=0.019; ***P*=0.0024). (B–E) p27^{kip1} deficiency inhibits triggering of macrophage mesenchymal migration and increases amoeboid migration efficiency. p27^{kip1}^{+/+} (black circles) and p27^{kip1}^{-/-} (white squares) BMDMs were allowed to migrate through Matrigel (B,C) or fibrillar collagen (D,E). The percentage of BMDM migration (B,D) and the z-distribution within the matrix (C,E) were measured. In the graph displaying the percentage of BMDM migration, each point represents an individual mouse (mean value of migration inserts performed in triplicate). The mean ± s.d. of 7–13 mice is shown. For the z-distribution, each point represents the z-position (μm) of a BMDM within the matrix (the surface of the matrix is at 0). The migration distances of 3126 and 688 p27^{kip1}^{+/+} BMDMs and 2806 and 945 p27^{kip1}^{-/-} BMDMs (from 3–5 mice) were measured in Matrigel (C) and in fibrillar collagen (E), respectively. Statistics: unpaired Student's *t*-test, two-tailed, 99% confidence interval; *P*=0.010 (B), *P*=0.3238 (C), *P*=0.477 (D), *P*<0.0001 (E). (F,G) p27^{kip1} silencing in hMDMs affects mesenchymal migration. (F) p27^{kip1} depletion in control or p27^{kip1} siRNA-transfected hMDMs was monitored by western blotting at 24, 48 or 72 h post-transfection. One representative experiment is shown. (G) hMDMs transfected with a control siRNA (dark) or p27^{kip1} siRNA (white) were loaded on top of thick layers of gelled-collagen I or Matrigel immediately after transfection. Cell migration was monitored at 24, 48 and 72 h, and the percentage of migrating cells was measured. The results are expressed as the percentage of cell migration between 48 and 72 h when p27^{kip1} silencing was efficient. Each point represents one independent blood donor (mean value of migration inserts performed in triplicates). The mean ± s.d. of five to six independent donors is shown. Statistics: paired Student's *t*-test, one-tailed, 99% confidence interval (***P*=0.0067, **P*=0.018).

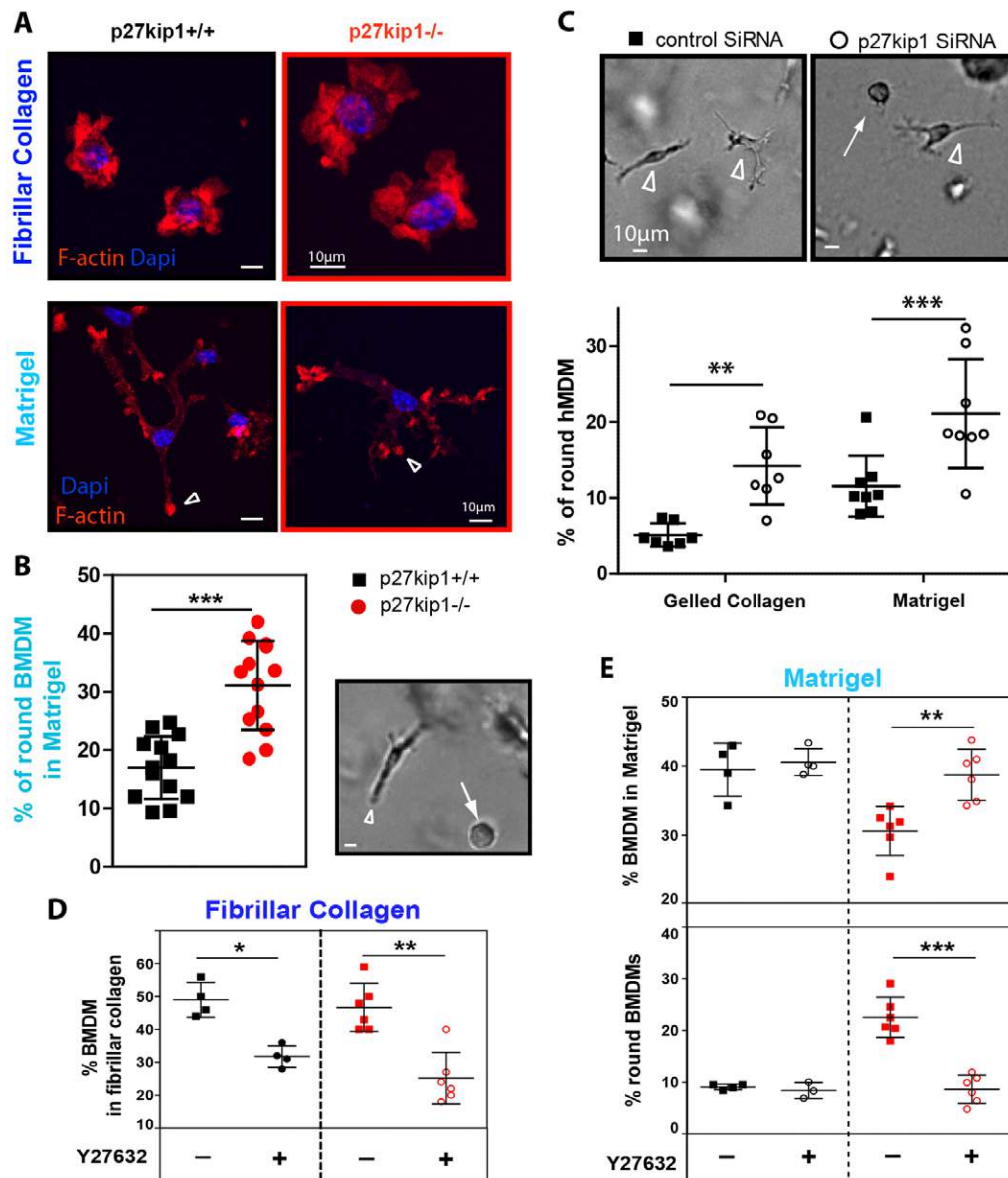


Fig. 4. p27^{kip1} deficiency promotes amoeboid migration instead of mesenchymal migration in dense matrices and is counterbalanced by ROCK inhibition. (A,B) The morphology of p27^{kip1}^{+/+} (black) and p27^{kip1}^{-/-} (red) BMDMs in matrices was observed by confocal microscopy following F-actin (phalloidin–Texas-Red) and DAPI staining (A) and brightfield transmission microscopy (B). Representative images are shown. Arrowheads in A indicate F-actin-rich 3D-podosomes. Elongated (B, arrowheads) and round (B, arrow) BMDMs were counted after 72 h of migration, and the percentage of round BMDMs within Matrigel was calculated (B, graph). Each point represents an individual mouse (mean value of migration inserts performed in triplicate). The mean \pm s.d. of 12 to 13 mice is shown. Statistics: unpaired Student's *t*-test, one-tailed, 99% confidence interval; $P < 0.0001$ (B). (C) p27^{kip1} silencing in hMDMs induces a shift from an elongated to a round phenotype. hMDMs transfected with control siRNA (dark) or p27^{kip1} siRNA (white) were loaded on top of thick layers of gelled-collagen or Matrigel immediately after transfection. The morphology of hMDMs in matrices was observed by using phase contrast microscopy, and elongated (arrowheads) and round (arrow) hMDMs were counted after 72 h of migration. The results are expressed as the percentage of round hMDMs in the matrices. Each point represents one independent blood donor (mean value of migration inserts performed in triplicates). The mean \pm s.d. of seven independent donors is shown. Statistics: Paired Student's *t*-test, one-tailed, 99% confidence interval (** $P = 0.002$, *** $P = 0.001$). (D,E) The percentage of migrating p27^{kip1}^{+/+} (black) and p27^{kip1}^{-/-} (red) BMDMs and the percentage of round BMDMs were measured for untreated (–) or Y27632 (10 μ M)-treated (+) cells migrating within fibrillar collagen (D) and Matrigel (E). Statistics: paired Student's *t*-test, two-tailed, 95% confidence interval; * $P = 0.011$, ** $P = 0.001$ (D); *** $P = 0.001$, **** $P = 0.0007$ (E). In E, differences between untreated and Y27632-treated p27^{kip1}^{+/+} BMDMs were not significant ($P = 0.613$ top panel and $P = 0.173$ bottom panel).

pSer10-p27^{kip1} to p27^{kip1} ratio was increased in macrophages migrating through gelled collagen and Matrigel compared to those migrating through fibrillar collagen, indicating that the pool of p27^{kip1} that can be exported to the cytoplasm is increased during mesenchymal migration compared to amoeboid migration. Immunofluorescence analysis of macrophages in 3D matrices showed that pSer10-p27^{kip1} was mainly localised in the

cytoplasm of hMDMs during mesenchymal migration (Fig. 5B, arrows), whereas it was concentrated into the nucleus during amoeboid migration (Fig. 5B, arrowheads). A significant decrease in the nuclear-to-cytoplasmic signal ratio of pSer10-p27^{kip1} was calculated in mesenchymal hMDMs compared to amoeboid hMDMs (Fig. 5C). This indicated that macrophage mesenchymal migration is correlated with the

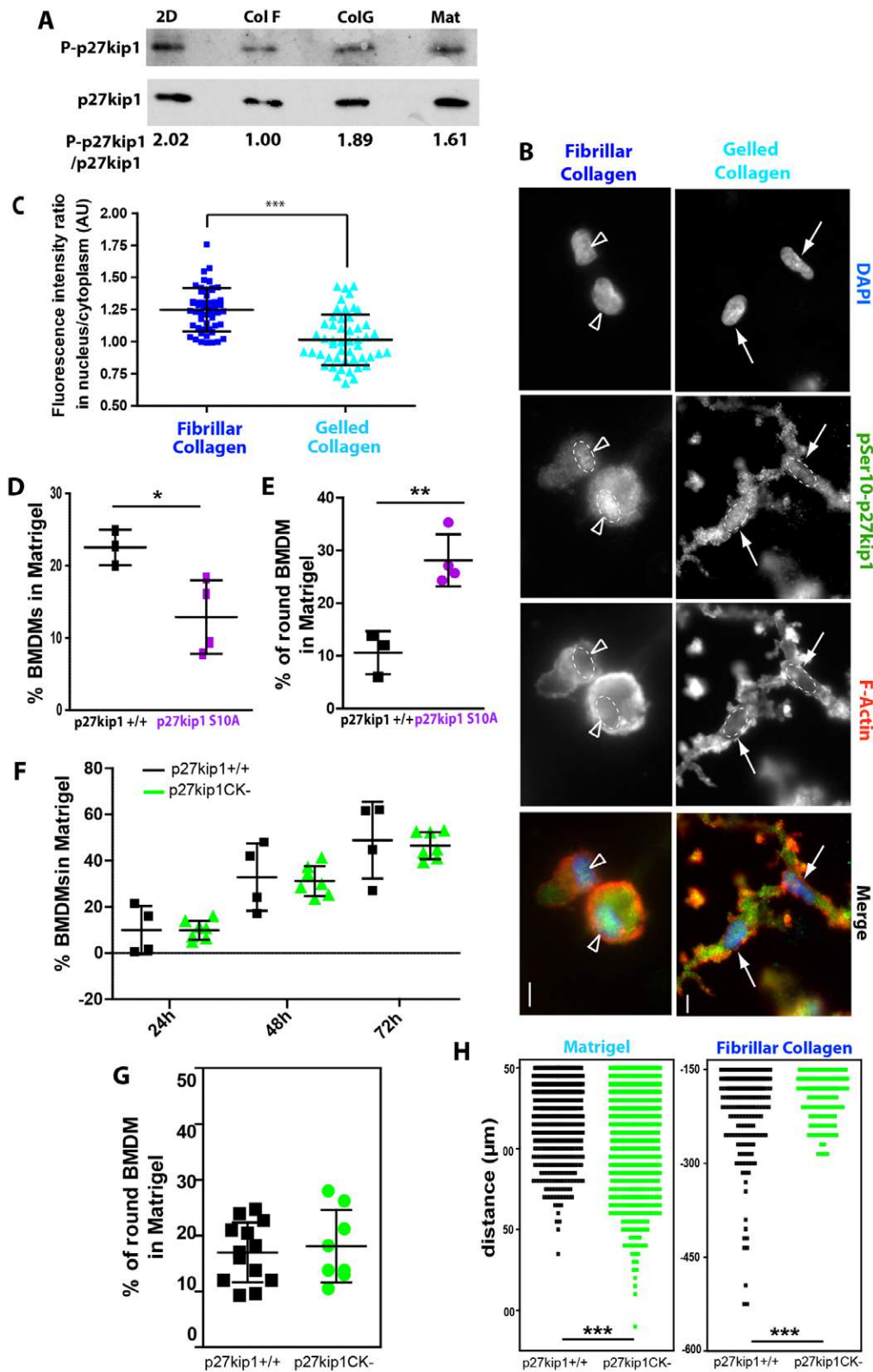


Fig. 5. See next page for legend.

phosphorylation-dependent relocation of p27^{kip1} from the nucleus to the cytoplasm.

Next, we used BMDMs from mutant mice that each express a mutant of p27^{kip1} protein that is known to mislocalise. The first

type of mutant BMDMs, expresses p27^{kip1} of which Ser10 is mutated to Ala, yielding mutant protein p27^{kip1}Ser10Ala (Besson et al., 2006). In p27^{kip1}Ser10Ala mice, total expression level of p27^{kip1}Ser10Ala in macrophages is reduced compared to

Fig. 5. p27^{kip1} promotes 3D-mesenchymal migration in a way dependent on its phosphorylation and its relocation from the nucleus to the cytoplasm. (A) The relative amount of pSer10-p27^{kip1} (P-p27^{kip1}) is increased during macrophage mesenchymal migration. Western blot analysis of pSer10-p27^{kip1} level in parallel to p27^{kip1} expression levels was performed in hMDMs in a 2D environment, and 3D Matrigel, fibrillar- and gelled collagen following 72 h of migration. Ratio of pSer10-p27^{kip1} to total p27^{kip1} signal was calculated. Experiments were performed on hMDMs isolated from three independent donors and one representative experiment is shown. (B,C) p27^{kip1} (pSer10-p27^{kip1}) is exported to the cytoplasm during macrophage mesenchymal migration. After 72 h of migration, hMDMs in 3D matrices (fibrillar- or gelled collagen) were fixed, permeabilised and stained with antibody against phosphorylated Ser10 in p27^{kip1}, phalloidin–Texas-Red for F-actin and DAPI for nuclei. (B) Representative images obtained by epifluorescence acquisition are shown. Scale bars: 10 μ m. Cells that are out of focus are macrophages inside the matrix that are either above or below the hMDMs which in focus. The cytoplasmic localisation of p27^{kip1} and the lack of nuclear labelling in gelled collagen are indicated by arrows. Nuclear accumulation of p27^{kip1} is indicated by arrowheads. Nuclei are surrounded by dashed lines. Fluorescence intensities were measured and ratios between the nucleus and cytoplasm (C) were calculated in at least 50 hMDMs during five independent experiments (mean \pm s.d.). Statistics: paired Student's *t*-test, two-tailed, 95% confidence interval, $P < 0.0001$ (B). (D,E) The p27^{kip1}Ser10Ala (p27^{kip1} S10A) mutant has a nuclear export defect and leads to an impaired triggering of macrophage mesenchymal migration. p27^{kip1}^{+/+} (black) and p27^{kip1}Ser10Ala (purple) BMDMs were allowed to migrate through Matrigel. The percentage of cell migration (D) and the number of round BMDMs (E) were quantified. Each point represents an individual mouse (mean value of migration inserts performed in triplicates). Mean \pm s.d. of three to four mice are shown. Statistics: unpaired student *t*-test, two-tailed, 99% confidence interval. $P = 0.0154$ (D), $P = 0.002$ (E). (F–H) The cytoplasmic localisation of p27^{kip1}CK- correlates with enhanced mesenchymal and diminished amoeboid migration. p27^{kip1}^{+/+} (black) and p27^{kip1}CK- (green) BMDMs were allowed to migrate through Matrigel (F–H) or fibrillar collagen (H). The percentage of BMDM migration (F), the percentage of round BMDMs (G) and the z-distribution within the matrices (H) were measured. In F and G, each point represents an individual mouse (mean value of migration performed in triplicates). The mean \pm s.d. of at least four mice is shown. In H, each point represents the z-position (μ m) of a BMDM within the matrix (0 representing the surface of the matrix). A total of 763 and 232 BMDMs from three p27^{kip1}^{+/+} mice and 1470 and 170 from three p27^{kip1}CK- mice were analysed in Matrigel and fibrillar collagen, respectively. Statistics: unpaired Student's *t*-test, two-tailed, 99% confidence interval. $P = 0.50$ at 24 h, $P = 0.40$ at 48 h and $P = 0.37$ at 72 h (F), $P = 0.67$ (G), $P < 0.0001$ (H).

p27^{kip1}^{+/+} macrophages, but its nuclear localisation is increased (Fuster et al., 2011). The percentage of migration of p27^{kip1}Ser10Ala BMDMs inside Matrigel was reduced by 43% \pm 5 at 24 h compared to p27^{kip1}^{+/+} cells (Fig. 5D), and the percentage of round cells was increased (Fig. 5E) showing that, in Matrigel, mesenchymal migration triggering was reduced similarly to p27^{kip1}-deficient macrophages and amoeboid migration was equally stimulated. Again, the migration distance of p27^{kip1}Ser10Ala BMDMs that could still migrate was unchanged compared to wild-type cells (data not shown), suggesting that a defect in p27^{kip1} nuclear export correlates with reduced mesenchymal migration triggering but not migration efficiency.

The second type of mutant BMDMs originated from p27^{kip1}CK- knock-in mice that carry point mutations in the cyclin- and CDK-binding domains of p27^{kip1}. The expressed mutant protein has lost its cell cycle functions (Besson et al., 2006; Vlach et al., 1997) and its quantity in the cytoplasm is increased in resting cells compared to wild-type p27^{kip1} (Serres et al., 2011). In addition, p27^{kip1}CK- knock-in mice have increased overall expression levels of the mutant protein

compared to the level of p27^{kip1} observed in wild-type mice (Besson et al., 2006). We found that a similar percentage of p27^{kip1}CK- BMDMs migrated within Matrigel compared to p27^{kip1}^{+/+} BMDMs, even at longer migration times (Fig. 5F); and the percentage of round BMDMs was not affected (Fig. 5G). Interestingly, as shown on Fig. 5H, the migration distances of p27^{kip1}CK- BMDMs were significantly increased in Matrigel and reduced in fibrillar collagen. This further demonstrates that the effect of p27^{kip1} on 3D-migration is correlated with its cytoplasmic localisation and shows that potentiation of mesenchymal migration is correlated with diminished amoeboid migration efficiency. We conclude from these observations that the role of p27^{kip1} in triggering mesenchymal migration is correlated with its export from the nucleus to the cytoplasm.

Tissue recruitment of macrophages is dependent on the cytoplasmic localisation of p27^{kip1}

Finally, to determine the role of p27^{kip1} in macrophage tissue infiltration *in vivo*, we compared macrophage recruitment into tumours that had been induced in p27^{kip1}^{-/-} and p27^{kip1}CK- mice. In these two mice genotypes, the cell cycle activity of p27^{kip1} is abolished; it is intact in p27^{kip1}^{+/+} mice. Consequently, p27^{kip1}^{-/-} and p27^{kip1}CK- mice are phenotypically very close to each other and very distant to p27^{kip1}^{+/+} mice: they both develop hyperplasia of several organs, and are taller and bigger than p27^{kip1}^{+/+} mice (Besson et al., 2007; Fero et al., 1996). Experiments were also performed on wild-type mice but we decided to compare the two genotypes devoid of p27^{kip1} cell cycle activity as a priority to avoid bias.

Urethane is a potent carcinogen that induces lung tumours in mice that are frequently infiltrated with macrophages (Ishigami et al., 2011; Serres et al., 2011). We used previously described lung tissues from urethane-treated p27^{kip1}^{-/-} and p27^{kip1}CK- mouse cohorts to carry out F4/80 labelling to stain macrophages (Serres et al., 2011). Interestingly, macrophage recruitment in lung tumours and the surrounding tissue was markedly reduced in p27^{kip1}^{-/-} mice compared to p27^{kip1}CK- mice (Fig. 6A,B). In wild-type mice, the number of F4/80-positive cells in surrounding healthy tissue was comparable to p27^{kip1}^{-/-} mice and lower than in p27^{kip1}CK- mice (Fig. 7). The number of macrophages recruited into lung tumours was equally increased in p27^{kip1}^{+/+} and p27^{kip1}CK- mice compared to p27^{kip1}^{-/-} mice (Fig. 7). These differences could not be attributed to a higher number of circulating monocytes in p27^{kip1}CK- mice, as the percentages of circulating monocytes in p27^{kip1}^{-/-}, p27^{kip1}CK- and p27^{kip1}^{+/+} mice were 9.61% \pm 4.18, 11.45% \pm 1.06 and 8.95% \pm 3.80, respectively (mean \pm s.d. of three mice). The subcellular localisation of p27^{kip1}CK- was mainly cytosolic in tissue macrophages, which is in marked contrast to its nuclear accumulation in F4/80-negative, SPC-positive cells (Fig. 6C,D).

We conclude that, *in vivo*, the tissue recruitment of macrophages is controlled by p27^{kip1} that accumulates in their cytoplasm, thus corroborating our *in vitro* data. In addition, our results suggest that part of the migration process towards tumour tissues involves mesenchymal motility, as we have previously shown that this mode of migration is hindered by p27^{kip1} deficiency.

DISCUSSION

Characterisation of macrophage 3D-migration represents a challenging research field that could potentially provide pharmacological tools for the control of the deleterious tissue

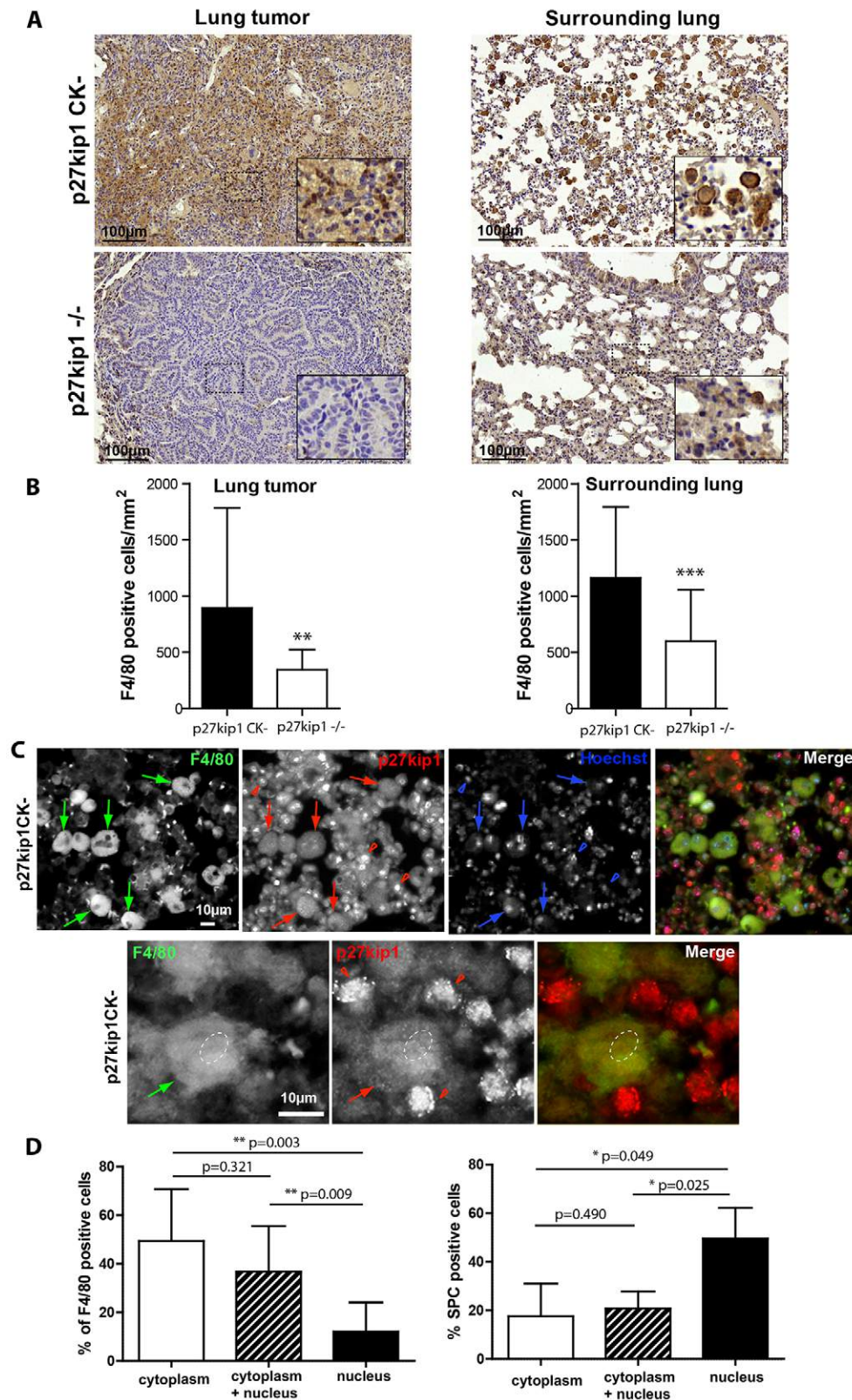


Fig. 6. The recruitment of macrophages into lung tumours is dependent on p27^{kip1} localised to the cytoplasm. Lung sections of urethane-treated p27^{kip1}^{-/-} and p27^{kip1}CK- mice were prepared and labelled. (A) Lung tumours (left) and surrounding healthy tissues (right) immunohistochemistry sections stained with anti-F4/80 antibody to evaluate macrophage tissue infiltration. (B) Quantification of F4/80-positive cells per mm² of lung tumor (left) and surrounding healthy tissue (right). Statistics: One-way ANOVA: ** $P=0.006$, *** $P<0.0001$. (C) Lung tumour immunohistochemistry sections labelled with anti-F4/80 (macrophages, green), anti-p27^{kip1} (red), anti-SP-C antibodies (alveolar type II and adenocarcinoma cells, purple) and Hoechst 33304 (nuclei, blue) to assess cytoplasmic localisation of p27^{kip1}. A higher magnification of lung slices from p27^{kip1}CK- mice is also shown. Arrows indicate macrophages with cytoplasmic localisation of p27^{kip1}, and arrowheads indicate adjacent F4/80-negative cells showing nuclear localisation of p27^{kip1}. Hoechst staining was used to define nuclei position (not shown on bottom pictures but replaced by a dashed circle for clarity). (D) Quantification of the proportion of F4/80-positive cells (left graph) or F4/80-negative cells (right graph: SPC positive cells) with cytoplasmic and/or nuclear localisation of p27^{kip1}. Statistics: paired Student's *t*-test, two-tailed, 95% confidence interval.

infiltration of these cells in inflammatory diseases and cancers. Macrophages are the only leukocytes known to adopt a mesenchymal mode when migrating through dense matrices (Cougoule et al., 2012; Van Goethem et al., 2010). Our existing findings on macrophage mesenchymal migration are based on the formation and organisation of podosomes, which are implicated

in ECM proteolysis (Cougoule et al., 2010; Guet et al., 2012; Van Goethem et al., 2011; Van Goethem et al., 2010). In the present study, we uncover another mechanism regulating macrophage mesenchymal migration, based on the finding that a single macrophage is equipped to employ both amoeboid and mesenchymal migration, and that hindering of amoeboid

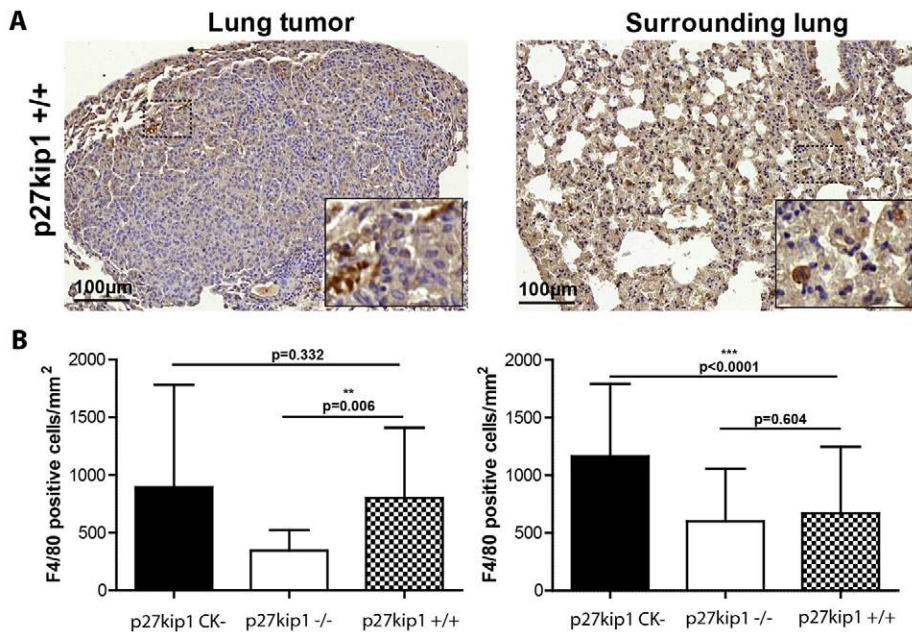


Fig. 7. The recruitment of macrophages into lung tumours is equally increased in p27^{kip1+/+} and p27^{kip1}CK⁻ mice compared to p27^{kip1-/-} mice. (A) Lung tumour and surrounding healthy tissue immunohistochemistry sections from p27^{kip1+/+} mice stained with anti-F4/80 antibody to evaluate macrophage tissue infiltration. (B) Quantification of F4/80-positive cells per mm² of tissue from p27^{kip1+/+} is compared to the quantifications obtained on p27^{kip1-/-} and p27^{kip1}CK⁻ mice (presented in Fig. 6). Statistics: One-way ANOVA.

migration through inhibition of the Rho/ROCK pathway participates in mesenchymal migration triggering (Fig. 8).

The present findings suggest that RhoA inhibition is a requisite for switching off amoeboid migration, thus prompting cells to use mesenchymal migration in dense matrices. Rho-GTPases have largely been involved in the remodelling of actin-cytoskeleton during cell migration (Sahai and Marshall, 2003). In tumour cell lines, activation of Rho-ROCK signalling is necessary to promote the round morphology with bleb-like structures characteristic of amoeboid migration, and to antagonise the formation of elongated protrusions (Sahai and Marshall, 2003). In line with this, we observed that ROCK inhibition induces a change in macrophage morphology both on the surface and inside Matrigel: macrophages become even more elongated and protrusive after treatment with inhibitor Y27632 compared to untreated cells. We, therefore, propose that macrophages exhibiting this protrusive phenotype are more prone to worm their way into the small holes that they create by proteolysis in a dense matrix during mesenchymal migration. In contrast, the triggering of macrophage mesenchymal migration in fibrillar collagen upon amoeboid migration inhibition was not observed. Indeed, we have clearly shown that ROCK inhibition completely abolishes macrophage migration through fibrillar collagen. One explanation could be that – in contrast to tumour cells such as HT1080, which can employ mesenchymal migration in either loose or dense matrices (Carragher, 2006; Friedl and Wolf, 2003) – amoeboid migration is the default migration mode of macrophages in fibrillar collagen, whereas mesenchymal migration is only triggered by the contact of macrophages with dense matrices and could require additional effectors that are not expressed during amoeboid migration or upon macrophage contact with loose matrices. So, although ROCK inhibition induces an elongated macrophage morphology, this is not sufficient to trigger macrophage mesenchymal migration in fibrillar collagen.

Since amoeboid migration inhibition is likely to participate in the triggering of mesenchymal migration in dense matrices, we considered whether mesenchymal migration inversely participates in amoeboid migration triggering in loose matrices.

However, this seems unlikely because we have never observed any evidence of amoeboid migration activation in macrophages migrating through fibrillar collagen by using pharmacological inhibitors of mesenchymal migration, such as protease inhibitors (Van Goethem et al., 2010).

In this present work, we propose that p27^{kip1} is an upstream trigger of inhibition of the Rho/ROCK pathway during macrophage mesenchymal migration. Until recently, p27^{kip1} was mainly recognised as an inhibitor of the cell cycle as it prevents the activation of cyclin-CDK complexes and, thus, negatively controls cell proliferation by arresting the cell cycle at the G1/S transition (Besson et al., 2004a; Sherr and Roberts, 1999). However, p27^{kip1} has also been shown to participate in the migration of cancer cells (Denicourt et al., 2007; Nagahara et al., 1998), mouse fibroblasts (Besson et al., 2004b) and neuronal progenitor cells (Kawauchi et al., 2006; Ueno et al., 2011), but its function in cell migration is quite conflicting depending on the cellular context. Cytoplasmic p27^{kip1} has been reported to interact with stathmin (a microtubule-destabilising protein) in Src-transformed fibroblasts and RhoA in primary fibroblasts to inhibit and stimulate cell migration, respectively (Baldassarre et al., 2005; Besson et al., 2004b). Our results contribute to consolidate pro- and anti-migratory functions of p27^{kip1} because we show here that p27^{kip1} is pro-migratory regarding mesenchymal migration but is anti-migratory regarding amoeboid migration.

We report for the first time p27^{kip1} upregulation during mesenchymal migration and not amoeboid migration, and this is correlated with the upregulation of the corresponding mRNA (data not shown). We propose that this upregulation participates in the potentiation of mesenchymal migration based on our observation that mesenchymal migration is affected in p27^{kip1}-mutant BMDMs.

Among the potential partners of p27^{kip1}, our results support a causal relationship between the inhibition of the RhoA signalling pathway, the regulation of mesenchymal migration and p27^{kip1} because (i) phosphorylation of markers of the Rho/ROCK pathway activity is diminished during mesenchymal migration

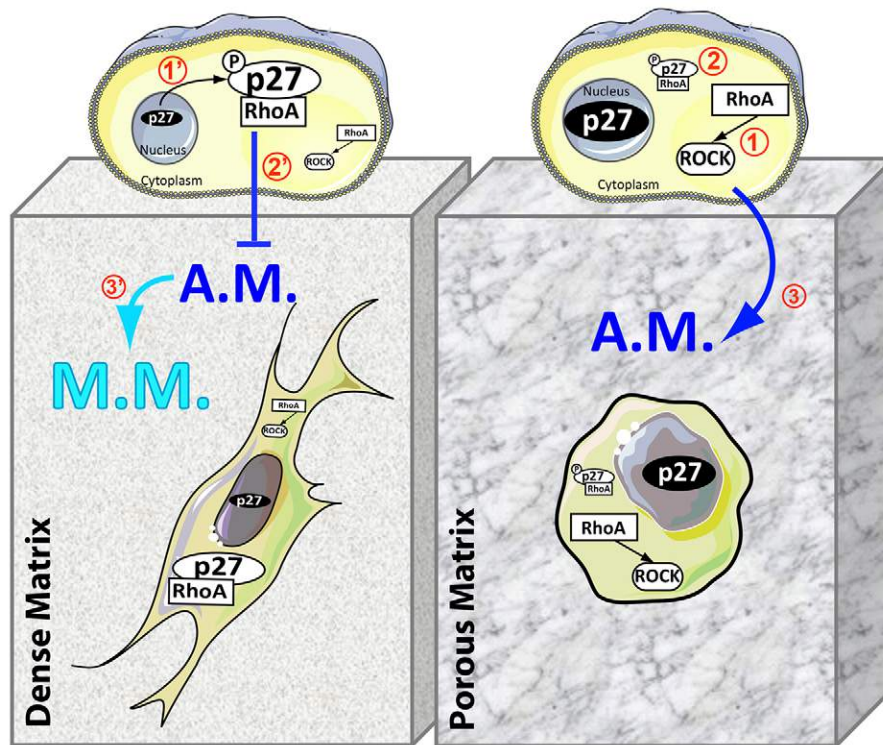


Fig. 8. Proposed model of the regulation of macrophage 3D-migration by p27^{kip1}. When adhering to a porous matrix (right panel), p27^{kip1} status is unchanged compared to its status in 2D (dense matrix). p27^{kip1} expression levels are not increased and remain mostly in macrophage nuclei. Therefore p27^{kip1} does not significantly interfere with the Rho/ROCK signalling pathway (1) which is likely to activate amoeboid migration by generating a ROCK-mediated actomyosin contractile force (3). It is worth noting that in wild-type macrophages a small proportion of p27^{kip1} is present in the cytoplasm and might neutralise part of the cytoplasmic RhoA, therefore restricting full amoeboid migration efficiency (2). This might explain why amoeboid migration efficiency is increased in p27^{kip1-/-} and p27^{kip1}Ser10Ala macrophages. In contrast, upon adhesion on dense matrices (left panel), p27^{kip1} expression levels are increased and the protein is exported from the nucleus to the cytoplasm in a phosphorylation-dependent manner (1'). This induces neutralisation of cytoplasmic RhoA (Besson et al., 2004b) (2') which can no longer activate the ROCK signalling pathway required for amoeboid migration. Consequently, this leads to inhibition of amoeboid migration, which is likely to participate in the triggering of mesenchymal migration (3'). This process is exacerbated in the p27^{kip1}CK⁻ mutant, in which the proportion of cytoplasmic p27^{kip1} is increased compared to wild-type, leading to a more-efficient mesenchymal migration.

and pharmacological inhibition of this pathway activates macrophage mesenchymal migration and, (ii) the ROCK inhibitor Y27632 reverses the effect of p27^{kip1} deficiency on mesenchymal migration. In addition, we show that activation of mesenchymal migration correlates with p27^{kip1} relocation to the cytoplasm, where it is more prone to interact with RhoA. In contrast, during migration through porous matrices, such as fibrillar collagen, p27^{kip1} is neither upregulated nor relocated to the cytoplasm, thus limiting its interference with RhoA as proposed in Fig. 8.

In addition to reduced mesenchymal migration observed in Matrigel, we report that p27^{kip1} deficiency induces partial activation of amoeboid migration, with ~30% of p27^{kip1-/-} BMDMs exhibiting the round amoeboid-like cell shape. Although we have never – as described for tumour cells (Carragher et al., 2006; Friedl and Wolf, 2003; Sahai and Marshall, 2003) – observed a clear mesenchymal–amoeboid transition with macrophages, this observation suggests that, although not complete, partial transition from mesenchymal to amoeboid migration could occur in Matrigel despite its low porosity. This p27^{kip1-/-} BMDM phenotype can be reversed by ROCK inhibition, further supporting a shift from mesenchymal to amoeboid migration. This result was quite surprising in a dense matrix, whose porosity is too low to allow cells to migrate without previous proteolysis. We have previously shown that macrophages create tunnel-like pathways when

progressing into low-porosity matrices such as Matrigel, requiring proteolytic remodelling in order to be infiltrated (Guiet et al., 2011; Van Goethem et al., 2011; Van Goethem et al., 2010). These tunnels can be used by trailing round macrophages (Guiet et al., 2011; Van Goethem et al., 2011; Van Goethem et al., 2010). We propose that, in the absence of p27^{kip1}, BMDMs show a propensity to shift back to non-proteolytic amoeboid migration and migrate using the tunnel-like pathways created by forerunner mesenchymal migrating cells.

Tissue infiltration of macrophages into tumours generally favours tumour growth and invasiveness (Pollard, 2009; Porta et al., 2011), and p27^{kip1} has been shown to be oncogenic (Besson et al., 2007). We show that cytoplasmic p27^{kip1} is required for efficient tumour infiltration by macrophages. We propose that p27^{kip1} achieves this pathophysiological role by stimulating mesenchymal migration of macrophages. Interestingly, in contrast to p27^{kip1-/-} mice, aging p27^{kip1}CK⁻ mice spontaneously develop lung tumours that are infiltrated by macrophages and are locally invasive (Besson et al., 2007). Therefore, macrophages that are competent to employ mesenchymal migration seem to display a greater ability to infiltrate of lung tumours.

This work uncovers p27^{kip1} as a new effector of macrophage 3D-migration, which promotes mesenchymal migration at least partly through inhibition of amoeboid migration. Interestingly, it

also controls tissue infiltration of macrophages in a tumour model, suggesting that targeting an effector of mesenchymal migration is a relevant therapeutic strategy for reducing the presence of macrophages in pathologic tissues.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of monocytes and culture of hMDMs and BMDMs

p27^{kip1+/+}, p27^{kip1-/-}, p27^{kip1}Ser10Ala and p27^{kip1}CK⁻ mice have been previously described (Biswas et al., 2006; Fero et al., 1996). Human monocytes were isolated from blood of healthy donors (buffy coat obtained from Etablissement Français du Sang, Toulouse, France) and differentiated into human monocyte-derived macrophages (hMDMs) as previously described (Van Goethem et al., 2010). Blood samples were obtained following standard ethical procedures and with the approval of the concerned Internal Review Boards.

Bone-marrow-derived macrophages (BMDMs) were isolated from p27^{kip1+/+}, p27^{kip1-/-}, p27^{kip1}Ser10Ala and p27^{kip1}CK⁻ mice and BMDMs were prepared as previously described (Cougoule et al., 2010). All experiments were performed according to animal protocols approved by the Animal Care and Use committee of the Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale.

Extracellular matrix preparation and 3D-migration assay

Fibrillar collagen I, gelled collagen I and Matrigel were prepared as described previously (Van Goethem et al., 2010), except that Nutragen (Advanced BioMatrix, San Diego, CA) was mixed with rat tail collagen I (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) (1 mg/ml final collagen concentration) for fibrillar collagen. Pepsin-extracted denatured collagen was used instead of native collagen because the latter only allows polymerisation into dense gel and, therefore, can only generate MM in macrophages (Van Goethem et al., 2010; Wiesner et al., 2014). Matrices (100 µl) were polymerised in Transwell Invasion Chambers (BD Falcon, Le Pont de Claix, France) placed within 24-well Companion plates (BD Biosciences). 3D migration assays with or without ROCK inhibitor Y27632 were performed as described (Van Goethem et al., 2010). Only Matrigel was used in BMDM migration assays to trigger mesenchymal migration because, in contrast to hMDMs, these cells are unable to migrate through gelled collagen (Cougoule et al., 2010). Migration experiments were conducted for 24–72 h and the percentage of cell migration, the morphology of migrating macrophages and the distance of migration were monitored as described (Van Goethem et al., 2010).

siRNA transfection of hMDMs

hMDMs were transfected with small interfering RNA (siRNA) (sequence information available from the authors on request) by electroporation using the Neon[®] Transfection System (Invitrogen, Saint-Aubin, France). A pellet of 2 × 10⁵ harvested hMDMs per transfection was obtained by centrifugation and resuspended in 10 µl of R buffer [containing 75 nmol of either control non-targeting or p27^{kip1} siRNA (Dharmacon RNA Technologies, Thermo Scientific, Illkirch, France)]. Cells were then electroporated with two 40-ms pulses of 1000 V, immediately transferred to a tube with complete medium and seeded on glass coverslips for further western blot analysis or on 3D matrices polymerised in Transwell inserts for migration assays. Knockdown of p27^{kip1} was assessed 24 h, 48 h and 72 h post-transfection by western blot analysis on transfected macrophages loaded on glass coverslips.

Western blotting

Protein extracts were obtained by homogenising cells adhering to glass coverslips or migrating in 3D ECMs in boiling Laemmli cell lysis buffer (1 × for 2D and 4 × for 3D) until complete dissolution of the matrix. We used primary rabbit anti-p27^{kip1} polyclonal antibodies (1:1000; Cell Signaling), rabbit anti-phosphoSer10-p27^{kip1} monoclonal antibodies (1:500; Abcam, Cambridge UK), rabbit anti-cofilin (1:100; Cell Signaling), rabbit anti-phospho-Ser3-cofilin (1:1000; Cell Signaling), rabbit anti-ERM (1:100; Cell Signaling) and anti-phospho-ERM (1:1000; Cell Signaling) for 16h at 4°C followed by secondary goat anti-rabbit

immunoglobulin G antibodies coupled to horseradish peroxidase (1:10,000; BioRad, Marnes-la-Coquette, France) for 2h at room temperature. Rabbit anti-actin primary antibody (1:10,000; Sigma-Aldrich) was used as loading control. The quantification of western blots was conducted using Image J software and values were normalised to the loading control.

Immunostaining and fluorescent microscopy

Cells on glass coverslips or in matrices were fixed and stained as previously described (Van Goethem et al., 2011; Van Goethem et al., 2010). For p27^{kip1} localisation, cells were stained with primary antibody for 48h, either rabbit anti-p27^{kip1} (1:1000; Ozyme, Cell Signaling, St-Quentin-En-Yvelines, France) or rabbit anti-P-Ser10-p27^{kip1} (1:100; BD Biosciences), followed by an anti-mouse or anti-rabbit secondary antibody conjugated to Alex-Fluor-488 (1:500 or 1:1000, respectively; Cell Signaling), DAPI (1:750; Sigma-Aldrich, Lyon, France) and phalloidin–Texas-Red (1:200; Molecular Probes, Invitrogen) for 2h. Images were acquired using a DM-RB fluorescence microscope (Leica Microsystems, Deerfield, IL) or a confocal FV1000 microscope (Olympus, Hamburg, Germany). The same exposure times were used when images had to be compared. All of the images were prepared with Adobe Photoshop[®]. Fluorescence intensity in circular areas of constant size was measured using Image J software and fluorescence intensity ratio in nucleus over cytoplasm (Arbitrary Units) was calculated for each macrophage. Statistical analysis was performed with GraphPad Prism software.

Immunohistochemistry and immunofluorescence on lung sections

Paraffin-embedded lungs from p27^{kip1+/+}, p27^{kip1-/-} and p27^{kip1}CK⁻ mice treated with urethane to induce lung tumour formation were described elsewhere (Serres et al., 2011). Paraffin sections were cleared and rehydrated tissue sections were steamed for 30 min in sodium citrate pH 6 unmasking solution and blocked in PBS 0.2% Triton-X100, 3% BSA and 10% donkey serum for 30 min at room temperature. For macrophage infiltration quantification assays, sections were stained using a rat anti-F4/80 antibody (AbD Serotec, Oxford, UK). Slides were then scanned using a Panoramic 250 Flash II slide scanner (3DHISTECH, Budapest, Hungary) with a 20 × magnification lens. Automatic quantification of macrophages on virtual slides was performed using a custom-made macro developed in ImageJ software. Briefly, colours were deconvoluted using a plugin by Gabriel Landini (<http://www.mecourse.com/landing/software/cdeconv/cdeconv.html>) to separate staining of peroxidase substrate from hematoxylin coloration. A threshold on staining of peroxidase substrate was chosen manually to dissociate specific signal from the background. The average peroxidase-substrate-positive cell area was evaluated by dividing the peroxidase substrate area by the number of positive cells that were counted manually in an ~5000 µm² region. Tissues of interest were then delimited manually and the area of peroxidase-substrate-positive staining per tissue area was automatically measured. The density of peroxidase-substrate-positive cells was then deduced from the density of staining and the evaluation of average cell area. Statistical tests were performed on SigmaPlot 12.5 using One-Way ANOVA. For p27^{kip1} cellular localisation assays, slides were stained simultaneously with rabbit anti-p27^{kip1} (C-19, Santa-Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX), rat anti-F4/80 pan macrophage marker (BM8, AbD Serotec) and goat anti-surfactant protein-C (SP-C) (M-20, Santa-Cruz Biotechnology Inc.) antibodies as described previously (Besson et al., 2007; Serres et al., 2011). Samples were then incubated with the indicated primary antibodies for 1 h at 37°C. After rinsing, sections were incubated with secondary antibodies conjugated to either of the indicated fluorochromes (Cy2, Cy3 and Cy5) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Suffolk, UK) for 30 min. DNA was labelled with Hoechst 33304 added to the first wash after secondary antibody. After mounting of the slides, images were acquired on a Nikon Eclipse 90i microscope equipped with a CoolSnap HQ2 camera using the NIS-Br software (Nikon, Champigny-sur-Marne, France). The proportion of cells with cytoplasmic and/or nuclear localisation of p27^{kip1} was

quantified on lung sections of three p27^{Kip1}CK^{-/-} and five p27^{Kip1+/+} mice using ImageJ. Statistics were performed using paired Student's *t*-test, two-tailed, 95% confidence interval.

Measurement of monocyte content in mice blood samples

Heparinised circulating blood was collected and the number of monocytes was measured by using the Micros 60 Hematology Analyzer (Horiba, Kyoto, Japan). Statistical analysis was performed with GraphPad Prism software.

Acknowledgements

We acknowledge Toulouse Réseau Imagerie for imaging, Brigitte Raynaud-Messina for critical reading of the manuscript and Annie Béhar for technical assistance.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Author contributions

P.G. and A.L. performed experiments, interpreted results and assisted with writing the manuscript; E.V.G. performed experiments on composite matrices; A.B. supplied mice and performed immunohistochemistry experiments; I.M.P. supervised the project and participated in writing the manuscript; V.L.C. performed experiments, interpreted results, directed the project and wrote the manuscript.

Funding

For this work, I.M.P. was supported by Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer [grant numbers 2010-120-1733 and ARC-Equipement 8505]; Agence Nationale de la Recherche (ANR) [grant number 2010-01301]; and Fédération pour la Recherche Médicale [grant number #FRM-DEQ 20110421312]; V.L.C. was supported by Région Midi-Pyrénées [grant number 10051286]; and Université de Toulouse III; A.B. was supported by Ligue Nationale contre le Cancer and Institut National du Cancer. P.G. was supported by a doctoral fellowship from Université de Toulouse III.

References

- Baldassarre, G., Belletti, B., Nicoloso, M. S., Schiappacassi, M., Vecchione, A., Spessotto, P., Morrione, A., Canzonieri, V. and Colombatti, A. (2005). p27(Kip1)-stathmin interaction influences sarcoma cell migration and invasion. *Cancer Cell* **7**, 51-63.
- Berton, S., Belletti, B., Wolf, K., Canzonieri, V., Lovat, F., Vecchione, A., Colombatti, A., Friedl, P. and Baldassarre, G. (2009). The tumor suppressor functions of p27(Kip1) include control of the mesenchymal/amoeboid transition. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 5031-5045.
- Besson, A., Assoian, R. K. and Roberts, J. M. (2004a). Regulation of the cytoskeleton: an oncogenic function for CDK inhibitors? *Nat. Rev. Cancer* **4**, 948-955.
- Besson, A., Gurian-West, M., Schmidt, A., Hall, A. and Roberts, J. M. (2004b). p27Kip1 modulates cell migration through the regulation of RhoA activation. *Genes Dev.* **18**, 862-876.
- Besson, A., Gurian-West, M., Chen, X., Kelly-Spratt, K. S., Kemp, C. J. and Roberts, J. M. (2006). A pathway in quiescent cells that controls p27Kip1 stability, subcellular localization, and tumor suppression. *Genes Dev.* **20**, 47-64.
- Besson, A., Hwang, H. C., Cicero, S., Donovan, S. L., Gurian-West, M., Johnson, D., Clurman, B. E., Dyer, M. A. and Roberts, J. M. (2007). Discovery of an oncogenic activity in p27Kip1 that causes stem cell expansion and a multiple tumor phenotype. *Genes Dev.* **21**, 1731-1746.
- Biswas, S. K., Gangi, L., Paul, S., Schioppa, T., Saccani, A., Sironi, M., Bottazzi, B., Doni, A., Vincenzo, B., Pasqualini, F. et al. (2006). A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation). *Blood* **107**, 2112-2122.
- Carragher, N. O. (2006). Calpain inhibition: a therapeutic strategy targeting multiple disease states. *Curr. Pharm. Des.* **12**, 615-638.
- Carragher, N. O., Walker, S. M., Scott Carragher, L. A., Harris, F., Sawyer, T. K., Brunton, V. G., Ozanne, B. W. and Frame, M. C. (2006). Calpain 2 and Src dependence distinguishes mesenchymal and amoeboid modes of tumour cell invasion: a link to integrin function. *Oncogene* **25**, 5726-5740.
- Cougoule, C., Le Cabec, V., Poincloux, R., Al Saati, T., Mège, J. L., Tabouret, G., Lowell, C. A., Laviolette-Mailirat, N. and Maridonneau-Parini, I. (2010). Three-dimensional migration of macrophages requires Hck for podosome organization and extracellular matrix proteolysis. *Blood* **115**, 1444-1452.
- Cougoule, C., Van Goethem, E., Le Cabec, V., Lafouresse, F., Dupré, L., Mehraj, V., Mège, J. L., Lastrucci, C. and Maridonneau-Parini, I. (2012). Blood leukocytes and macrophages of various phenotypes have distinct abilities to form podosomes and to migrate in 3D environments. *Eur. J. Cell Biol.* **91**, 938-949.
- Denicourt, C., Saenz, C. C., Datnow, B., Cui, X. S. and Dowdy, S. F. (2007). Relocalized p27Kip1 tumor suppressor functions as a cytoplasmic metastatic oncogene in melanoma. *Cancer Res.* **67**, 9238-9243.
- Doyle, A. D., Wang, F. W., Matsumoto, K. and Yamada, K. M. (2009). One-dimensional topography underlies three-dimensional fibrillar cell migration. *J. Cell Biol.* **184**, 481-490.
- DuFort, C. C., Paszek, M. J. and Weaver, V. M. (2011). Balancing forces: architectural control of mechanotransduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 308-319.
- Elkington, P. T. and Friedland, J. S. (2006). Matrix metalloproteinases in destructive pulmonary pathology. *Thorax* **61**, 259-266.
- Even-Ram, S. and Yamada, K. M. (2005). Cell migration in 3D matrix. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**, 524-532.
- Fero, M. L., Rivkin, M., Tasch, M., Porter, P., Carow, C. E., Firpo, E., Polyak, K., Tsai, L. H., Broudy, V., Perlmutter, R. M. et al. (1996). A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. *Cell* **85**, 733-744.
- Friedl, P. and Weigelin, B. (2008). Interstitial leukocyte migration and immune function. *Nat. Immunol.* **9**, 960-969.
- Friedl, P. and Wolf, K. (2003). Proteolytic and non-proteolytic migration of tumour cells and leucocytes. *Biochem. Soc. Symp.* **70**, 277-285.
- Fuster, J. J., González-Navarro, H., Vinué, A., Molina-Sánchez, P., Andrés-Manzano, M. J., Nakayama, K. I., Nakayama, K., Diez-Juan, A., Bernad, A., Rodríguez, C. et al. (2011). Deficient p27 phosphorylation at serine 10 increases macrophage foam cell formation and aggravates atherosclerosis through a proliferation-independent mechanism. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 2455-2463.
- Guiet, R., Van Goethem, E., Cougoule, C., Balor, S., Valette, A., Al Saati, T., Lowell, C. A., Le Cabec, V. and Maridonneau-Parini, I. (2011). The process of macrophage migration promotes matrix metalloproteinase-independent invasion by tumor cells. *J. Immunol.* **187**, 3806-3814.
- Guiet, R., Vérollet, C., Lamsoul, I., Cougoule, C., Poincloux, R., Labrousse, A., Calderwood, D. A., Glogauer, M., Lutz, P. G. and Maridonneau-Parini, I. (2012). Macrophage mesenchymal migration requires podosome stabilization by filamin A. *J. Biol. Chem.* **287**, 13051-13062.
- Ishida, N., Kitagawa, M., Hatakeyama, S. and Nakayama, K. (2000). Phosphorylation at serine 10, a major phosphorylation site of p27(Kip1), increases its protein stability. *J. Biol. Chem.* **275**, 25146-25154.
- Ishigami, S., Ueno, S., Nishizono, Y., Matsumoto, M., Kurahara, H., Arigami, T., Uchikado, Y., Setoyama, T., Arima, H., Yoshiaki, K. et al. (2011). Prognostic impact of CD168 expression in gastric cancer. *BMC Cancer* **11**, 106.
- Jevnikar, Z., Mirković, B., Fonović, U. P., Zidar, N., Švajger, U. and Kos, J. (2012). Three-dimensional invasion of macrophages is mediated by cysteine cathepsins in protrusive podosomes. *Eur. J. Immunol.* **42**, 3429-3441.
- Kalluri, R. (2003). Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 422-433.
- Kawauchi, T., Chihama, K., Nabeshima, Y. and Hoshino, M. (2006). Cdk5 phosphorylates and stabilizes p27kip1 contributing to actin organization and cortical neuronal migration. *Nat. Cell Biol.* **8**, 17-26.
- Kotake, Y., Nakayama, K., Ishida, N. and Nakayama, K. I. (2005). Role of serine 10 phosphorylation in p27 stabilization revealed by analysis of p27 knock-in mice harboring a serine 10 mutation. *J. Biol. Chem.* **280**, 1095-1102.
- Luster, A. D., Alon, R. and von Andrian, U. H. (2005). Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat. Immunol.* **6**, 1182-1190.
- Mackay, C. R. (2008). Moving targets: cell migration inhibitors as new anti-inflammatory therapies. *Nat. Immunol.* **9**, 988-998.
- Maruotti, N., Cantatore, F. P., Crivellato, E., Vacca, A. and Ribatti, D. (2007). Macrophages in rheumatoid arthritis. *Histol. Histopathol.* **22**, 581-586.
- Nagahara, H., Vocero-Akbani, A. M., Snyder, E. L., Ho, A., Latham, D. G., Lissy, N. A., Becker-Hapak, M., Ezhevsky, S. A. and Dowdy, S. F. (1998). Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27Kip1 induces cell migration. *Nat. Med.* **4**, 1449-1452.
- Pollard, J. W. (2009). Trophic macrophages in development and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 259-270.
- Porta, C., Riboldi, E., Totaro, M. G., Strauss, L., Sica, A. and Mantovani, A. (2011). Macrophages in cancer and infectious diseases: the 'good' and the 'bad'. *Immunotherapy* **3**, 1185-1202.
- Qualls, J. E. and Murray, P. J. (2010). A double agent in cancer: stopping macrophages wounds tumors. *Nat. Med.* **16**, 863-864.
- Rodier, G., Montagnoli, A., Di Marcotullio, L., Coulombe, P., Draetta, G. F., Pagano, M. and Meloche, S. (2001). p27 cytoplasmic localization is regulated by phosphorylation on Ser10 and is not a prerequisite for its proteolysis. *EMBO J.* **20**, 6672-6682.
- Ruhrberg, C. and De Palma, M. (2010). A double agent in cancer: deciphering macrophage roles in human tumors. *Nat. Med.* **16**, 861-862.
- Sahai, E. and Marshall, C. J. (2003). Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat. Cell Biol.* **5**, 711-719.
- Schindler, M., Nur-E-Kamal, A., Ahmed, I., Kamal, J., Liu, H. Y., Amor, N., Ponery, A. S., Crockett, D. P., Grafe, T. H., Chung, H. Y. et al. (2006). Living in three dimensions: 3D nanostructured environments for cell culture and regenerative medicine. *Cell Biochem. Biophys.* **45**, 215-227.
- Serres, M. P., Zlotek-Zlotkiewicz, E., Concha, C., Gurian-West, M., Daburon, V., Roberts, J. M. and Besson, A. (2011). Cytoplasmic p27 is oncogenic and cooperates with Ras both in vivo and in vitro. *Oncogene* **30**, 2846-2858.

- Shabo, I., Stål, O., Olsson, H., Doré, S. and Svanvik, J.** (2008). Breast cancer expression of CD163, a macrophage scavenger receptor, is related to early distant recurrence and reduced patient survival. *Int. J. Cancer* **123**, 780–786.
- Sherr, C. J. and Roberts, J. M.** (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* **13**, 1501–1512.
- Takai, Y., Sasaki, T. and Matozaki, T.** (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol. Rev.* **81**, 153–208.
- Tanaka, T., Nishimura, D., Wu, R. C., Amano, M., Iso, T., Kedes, L., Nishida, H., Kaibuchi, K. and Hamamori, Y.** (2006). Nuclear Rho kinase, ROCK2, targets p300 acetyltransferase. *J. Biol. Chem.* **281**, 15320–15329.
- Ueno, S., Sakoda, M., Kurahara, H., Iino, S., Minami, K., Ando, K., Mataka, Y., Maemura, K., Ishigami, S., Shinchu, H. et al.** (2011). Safety and efficacy of early postoperative hyperbaric oxygen therapy with restriction of transfusions in patients with HCC who have undergone partial hepatectomy. *Langenbecks Arch. Surg.* **396**, 99–106.
- Van Goethem, E., Poincloux, R., Gauffre, F., Maridonneau-Parini, I. and Le Cabec, V.** (2010). Matrix architecture dictates three-dimensional migration modes of human macrophages: differential involvement of proteases and podosome-like structures. *J. Immunol.* **184**, 1049–1061.
- Van Goethem, E., Guiet, R., Balor, S., Charrière, G. M., Poincloux, R., Labrousse, A., Maridonneau-Parini, I. and Le Cabec, V.** (2011). Macrophage podosomes go 3D. *Eur. J. Cell Biol.* **90**, 224–236.
- Vlach, J., Hennecke, S. and Amati, B.** (1997). Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *EMBO J.* **16**, 5334–5344.
- Weber, C., Zerneck, A. and Libby, P.** (2008). The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 802–815.
- Wiesner, C., El Azzouzi, K. and Linder, S.** (2013). A specific subset of RabGTPases controls cell surface exposure of MT1-MMP, extracellular matrix degradation and three-dimensional invasion of macrophages. *J. Cell Sci.* **126**, 2820–2833.
- Wiesner, C., Le-Cabec, V., El Azzouzi, K., Maridonneau-Parini, I. and Linder, S.** (2014). Podosomes in space: Macrophage migration and matrix degradation in 2D and 3D settings. *Cell Adh. Migr.* **8**, 8.

3 Discussion et perspectives

Cette étude a permis d'avancer dans la caractérisation de la migration 3D des macrophages, notamment dans les mécanismes de mise en place de la migration mésenchymateuse. En effet, elle nous a permis de montrer trois choses. Premièrement, nous montrons pour la première fois qu'un macrophage unique peut adopter les deux modes de migration et peut réaliser des transitions entre l'un et l'autre lorsqu'il rencontre un nouvel environnement. Deuxièmement, nous élucidons un nouveau mécanisme cellulaire et moléculaire impliqué dans la mise en place de cette migration mésenchymateuse, à savoir l'inhibition de la migration amiboïde. Troisièmement, cette étude montre qu'une protéine impliquée dans la migration mésenchymateuse des macrophages participe à l'infiltration tissulaire des TAMs, apportant ainsi une nouvelle preuve de l'intérêt pharmacologique de cibler ce mode migratoire grâce à de nouvelles stratégies thérapeutiques. Etant donné que l'article fournit déjà une discussion appropriée des résultats obtenus, je vais consacrer cette partie aux perspectives possibles de ce travail.

La suite immédiate et logique de cette étude est la détermination de l'implication *in vivo* de p27^{kip1} dans la migration des macrophages, en mettant à profit les outils que j'ai développés dans le cadre du deuxième projet sur lequel j'ai travaillé au cours de ma thèse, projet qui sera exposé en détails dans le chapitre suivant des résultats. L'article que nous avons publié contient déjà des résultats *in vivo* avec la quantification de l'infiltration des macrophages dans des tumeurs pulmonaires induites ; toutefois ils ne nous renseignent pas sur les caractéristiques migratoires des macrophages, notamment leur morphologie et leur vitesse. De plus, étant donné que dans les souris transgéniques utilisées (déficiences pour p27^{kip1} ou exprimant sa variation mutante p27^{kip1}CK⁻), toutes les cellules sont affectées au lieu des macrophages spécifiquement, il n'est pas possible de vérifier si des facteurs autres que la modification des capacités migratoires des macrophages pourraient entrer en jeu. En effet, l'absence de p27^{kip1} pourrait affecter des événements en amont de la migration trans-tissulaire des macrophages, comme par exemple l'hématopoïèse au cours de laquelle p27^{kip1} joue un rôle régulateur (Zou et al., 2011). En effet, bien que la mutation de p27^{kip1} n'ait pas provoqué de modification significative sur le nombre de monocytes circulants, il pourrait avoir un effet sur la distribution des sous-populations de monocytes qui, comme indiqué dans l'[introduction bibliographique](#), n'ont pas tous les mêmes capacités de recrutement au cours d'une réponse immunitaire. En outre, l'absence de p27^{kip1} pourrait impacter le processus de diapédèse (Z. Li et al., 2006). Ainsi, afin d'étudier la réelle implication de la protéine sur la migration *in vivo*,

des modèles expérimentaux doivent être utilisés permettant : 1) l'observation dynamique du comportement migratoire des macrophages ; 2) l'étude de leur migration trans-tissulaire indépendamment des événements précédant leur arrivée dans le tissu ; et 3) l'effet d'une mutation de p27^{kip1} uniquement dans les macrophages. Les modèles de microscopie intravitale *in vivo* et de culture d'explants tissulaires *ex vivo* développés au cours de ma thèse pourraient répondre à ces critères. Ceci sera expliqué dans le chapitre suivant.

Nous montrons que la protéine p27^{kip1} participe à la mise en place de la migration mésenchymateuse par inhibition de la voie Rho/ROCK, ainsi qu'à l'infiltration de macrophages dans des tumeurs pulmonaires. Par conséquent, une stratégie potentielle afin de limiter cette infiltration serait l'inhibition de p27^{kip1}. Toutefois, ceci semble difficilement envisageable pour un certain nombre de raisons. Premièrement, p27^{kip1} est exprimée par une grande variété de types cellulaires autres que les macrophages dû à sa fonction critique de régulateur du cycle cellulaire. Donc, une thérapie ciblant p27^{kip1} pourrait avoir des effets néfastes sur l'organisme au vue de cette non-spécificité. En effet, même si elle joue parfois un rôle pro-tumoral, p27^{kip1} est souvent considérée comme un répresseur de tumeur et son niveau d'expression est généralement inversement corrélée à la malignité d'un cancer (Hershko, 2010). Ainsi, plusieurs stratégies anti-tumorales ont été envisagées visant à stabiliser la protéine en empêchant sa dégradation plutôt qu'en diminuant son expression (Nickleit, Zender, Kossatz, & Malek, 2007). Une alternative à ceci serait de ne cibler que la fraction cytoplasmique de p27^{kip1}, sans interférer avec la fraction nucléaire impliquée dans le contrôle de la prolifération cellulaire. En effet, nous montrons que c'est la protéine cytoplasmique qui est impliquée dans la migration mésenchymateuse des macrophages. De plus, des études montrent que cette mauvaise localisation de p27^{kip1} est impliquée dans 40% des cancers humains (Shin et al., 2002; Viglietto et al., 2002). Ainsi, les souris p27^{kip1}CK⁻ possèdent une fraction plus élevée de la protéine cytoplasmique et développent des tumeurs pulmonaires spontanées (Besson et al., 2007). Une explication serait une association de cette protéine avec PKB (*protein kinase B*)-Akt (Shin et al., 2002; Viglietto et al., 2002), qui joue un rôle important dans la régulation de la prolifération et de l'apoptose. A partir de nos résultats, nous proposons que ceci soit également dû à une meilleure infiltration de macrophages dans la tumeur. De plus, les souris ayant des cancers présentant une combinaison d'une faible expression nucléaire et d'une haute expression cytoplasmique de p27^{kip1} ont les taux de survie les plus bas (Ogino et al., 2009). Une stratégie potentielle serait ainsi de cibler uniquement cette fraction cytoplasmique ou alors d'empêcher l'export nucléaire de la protéine. Cependant,

la recherche d'effecteurs plus spécifiques aux macrophages semble être une meilleure stratégie pour l'identification de nouvelles cibles pharmacologiques.

Pour finir, cette étude nous a permis de mettre en lumière un nouveau mécanisme moléculaire qui met en lien l'inhibition de la migration amiboïde au profit de la migration mésenchymateuse. Il serait intéressant de pouvoir confirmer cette hypothèse en testant l'effet d'autres inhibiteurs de la voie Rho/ROCK que le Y-27632 utilisé dans cette étude, ainsi que l'effet de l'inhibition d'autres acteurs clés de la migration amiboïde des macrophages sur leur « *shift* » vers la migration mésenchymateuse. Grâce à l'analyse transcriptomique des macrophages au cours de la migration 3D, de tels effecteurs pourront être identifiés dans un futur proche. Les résultats de cette analyse sont encore en cours d'exploration. Pour rappel, les ARN totaux de macrophages soumis à différentes conditions de migration (couches 2D de collagène ou matrices 3D de collagène) ont été extraits et analysés sur des puces « *microarray* » pour des études comparatives (figure 31). Ces analyses ont pu révéler que la migration 3D amiboïde et la migration 3D mésenchymateuse induisent un remaniement transcriptionnel des macrophages, comparé à la condition 2D (figure 32). De plus, cette étude montre que la migration mésenchymateuse induit une activité transcriptionnelle plus importante que la migration amiboïde. Aussi, l'exploitation de ces résultats s'oriente en priorité vers des effecteurs de la migration mésenchymateuse des macrophages plutôt que vers des effecteurs de la migration amiboïde. Deux effecteurs potentiels sont actuellement envisagés. Ce sont deux récepteurs d'adhérence, AOC3 (*amine oxidase, copper-containing 3*) et l'intégrine $\beta 8$ et le métabolisme lipidique. La protéine AOC3, un récepteur membranaire aussi appelé VAP-1 (*vascular adhesion protein 1*), est une amine-oxydase surtout exprimée sur les cellules endothéliales et dont l'implication a déjà été montrée dans l'adhérence et la diapédèse des leucocytes (Jalkanen & Salmi, 2008). En effet, le traitement de souris avec un anticorps bloquant anti-AOC3 a pour conséquence une augmentation de la vitesse de *rolling* des leucocytes et une diminution de l'adhérence des leucocytes au cours du recrutement vers un site inflammatoire. Cette protéine a aussi été retrouvée sur d'autres types cellulaires tels que les adipocytes, et nos analyses transcriptomiques montrent que le gène *AOC3* est plus fortement exprimé dans les macrophages en cours de migration mésenchymateuse, comparé à des macrophages sur des surfaces en 2D. Nous avons déjà pu confirmer par *western blot* que la protéine est présente en plus grande quantité dans ces macrophages mésenchymateux, ce qui en fait un effecteur potentiel de ce mode migratoire.

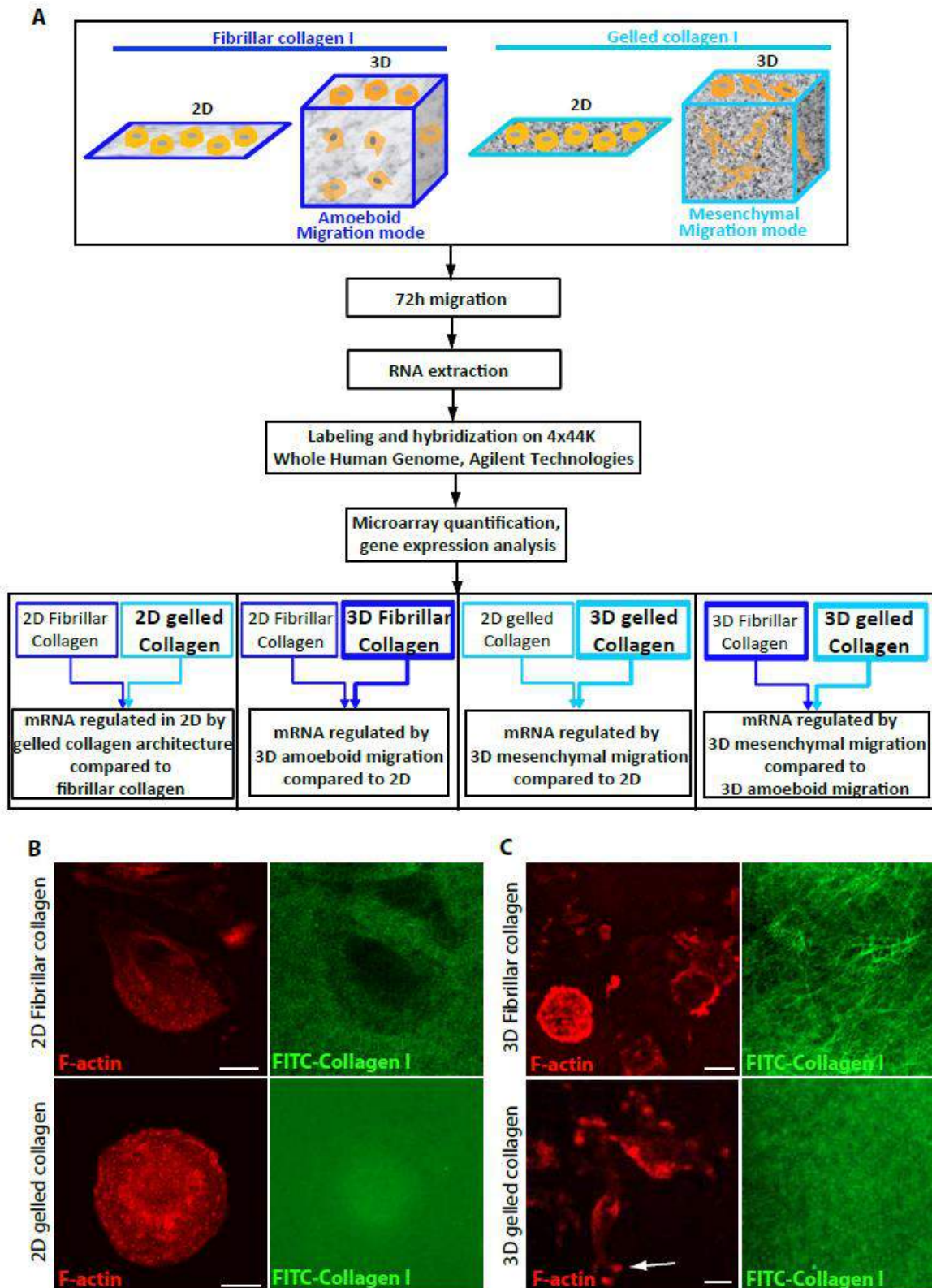


Figure 31 : Protocol expérimental des analyses de transcriptomique des macrophages au cours de la migration 2D et 3D

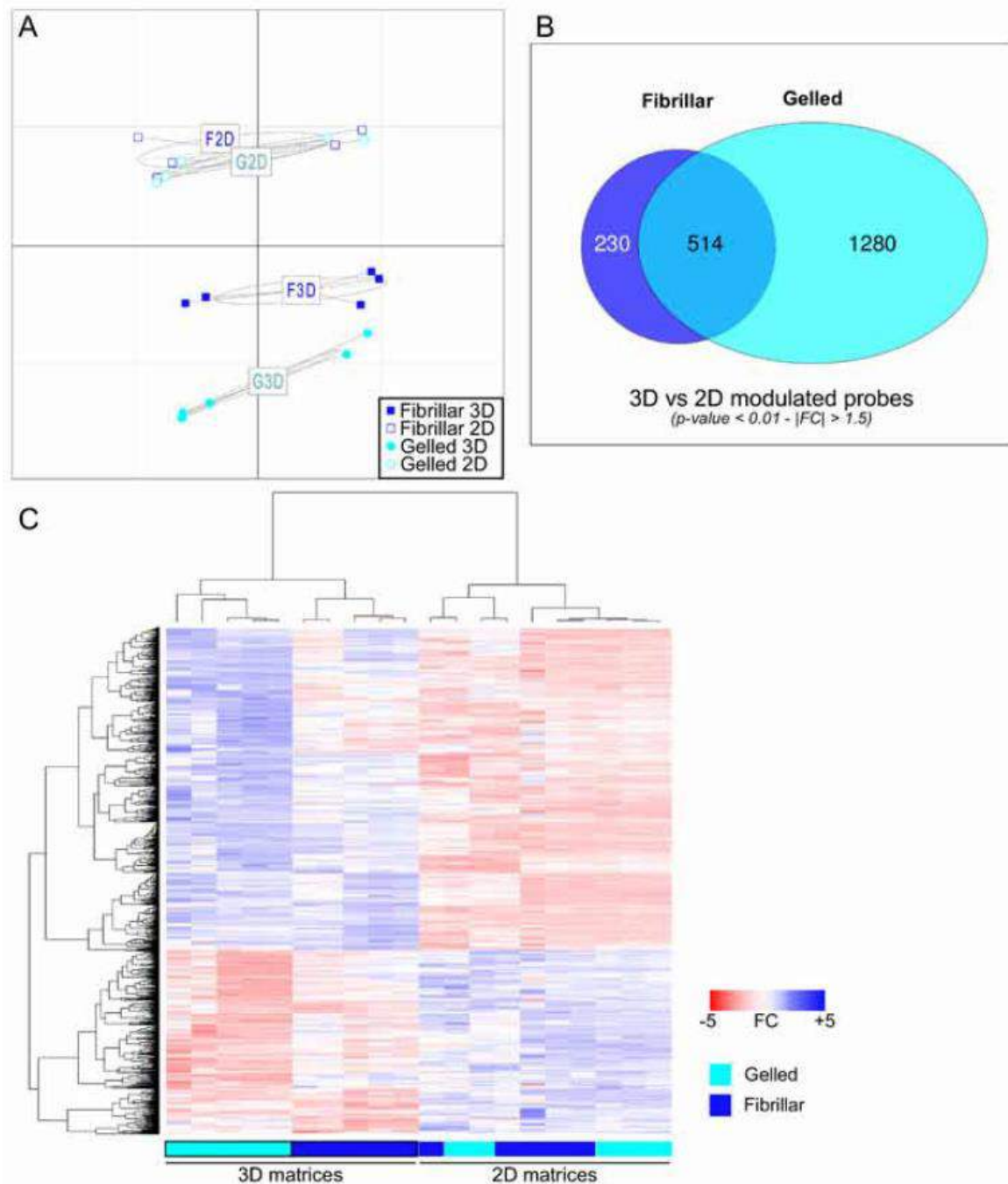


Figure 32 : Régulation de l'expression des gènes au cours de la migration 2D et 3D. (A) Représentation graphique des analyses en composantes principales réalisées sur les données du transcriptome entier, illustrant la grande variance d'expression génique entre des modes de migration 3D et 2D, ainsi qu'entre la migration 3D mésenchymateuse et la migration 3D amiboïde. (B) Diagramme de Venn représentant le nombre de sondes modulées dans le collagène fibrillaire (3D versus 2D, bleu foncé) et le collagène gélatineux (3D versus 2D, bleu clair). (C) Représentation en « heat map » des sondes modulées entre les modes de migration 3D et 2D. Des dendrogrammes furent calculés en utilisant les distances de corrélation (basées sur le coefficient de corrélation de Pearson) et un algorithme de lien moyen. Les sondes sont représentées en rangées et les échantillons en colonnes. Les valeurs d'expression sont codées par couleur de bleu (expression faible) à rouge (expression élevée).

D'autres gènes identifiés sont des gènes codant pour des intégrines. A ce jour, l'adhérence des macrophages au cours de la migration mésenchymateuse et de la migration amiboïde n'a pas été étudiée. Ceci est devenu une des priorités de l'équipe, que je discuterai dans la discussion générale.

Chapitre 2

Caractérisation de la migration trans-tissulaire des macrophages

1 Introduction

En parallèle à l'identification de nouveaux effecteurs de la migration trans-tissulaire des macrophages, je me suis également penché sur une autre question à laquelle il était essentiel, pour l'équipe, de répondre : les résultats de migration 3D des macrophages *in vitro* sont-ils pertinents dans un réel contexte physiologique *in vivo* ? Les matrices reconstituées associées au modèle d'invasion de *Transwell* représentent des outils intéressants pour l'étude de la migration cellulaire 3D, toutefois elles comportent une grosse limite puisqu'elles ne sont que des systèmes rudimentaires d'environnements tissulaires. En effet, elles sont acellulaires et ne représentent qu'une matrice extracellulaire simplifiée. Elles ne sont dans certains cas composées que d'une protéine de la matrice extracellulaire (le collagène I) alors qu'une véritable matrice est bien plus complexe (voir le [chapitre 3 de l'introduction bibliographique](#)). A cause de ces différences majeures, il est impossible de corréler avec certitude les données *in vitro* avec les véritables comportements *in vivo* des macrophages au cours de leur migration. Bien que la migration amiboïde des différents types de leucocytes a été démontrée *in vivo* (lymphocytes, neutrophiles, cellules dendritiques) (Friedl, Borgmann, & Brocker, 2001), le mode migratoire utilisé par les macrophages pour infiltrer les tissus restait inconnu. Notamment, la migration mésenchymateuse *in vivo* des macrophages n'a jusqu'à présent jamais été montrée. L'équipe a développé des études avec des sphéroïdes tumoraux, système *in vitro* de complexité intermédiaire entre les matrices acellulaires et les tissus. Bien que ce système ait permis l'étude des mécanismes de migration

des macrophages dans un contexte cellulaire tumoral en 3D, il ne reste qu'une simplification d'une véritable tumeur qui ne comporte pas seulement des cellules tumorales et des macrophages, mais également des fibroblastes, des adipocytes et d'autres leucocytes qui vont tous jouer un rôle dans l'organisation du tissu.

Ainsi, un deuxième projet sur lequel j'ai travaillé au cours de ma thèse a consisté à développer des modèles de migration cellulaire 3D impliquant des tissus vivants. Ceci m'a conduit à mettre au point deux modèles d'étude complexes. La première technique consiste en l'observation directe de macrophages grâce à la microscopie dynamique intravitale à haute résolution. Grâce à l'obtention de souris transgéniques exprimant des macrophages fluorescents, les souris MacBlue, développées dans le laboratoire de David Hume au Roslin Institute dans le Midlothian en Ecosse (Ovchinnikov et al., 2008), j'ai pu caractériser la migration de ces cellules au sein de chambres dorsales implantées sur des souris dans lesquelles une tumeur est induite. Plusieurs raisons ont mené au choix de travailler sur un tissu tumoral : il s'agit d'un tissu fortement infiltré par des macrophages et ce tissu est dense par altération de la composition matricielle du stroma. Ainsi, notre hypothèse, basée sur les données *in vitro*, serait que dans ce tissu dense, les TAMs utiliseraient la migration mésenchymateuse pour dégrader la matrice afin de se déplacer.

La deuxième technique que j'ai mise au point consiste en la préparation et la culture de coupes d'explants de tumeur *ex vivo*. Le plus gros défi lors de la réalisation de cette technique fut la mise au point des conditions idéales de découpe par microtome et de culture afin d'assurer la survie des explants tout au long de la durée des expériences. Toutefois, une fois les mises au point réalisées, ces explants ont pu être utilisés dans des systèmes de co-culture avec des macrophages, constituant ainsi un modèle d'invasion 3D. Ce modèle, par rapport à la microscopie intravitale, présente deux avantages : il permet, d'une part, de travailler avec des macrophages humains, cellules de prédilection dans l'équipe et, d'autre part, d'explorer avec plus de facilité l'implication de divers effecteurs moléculaires de la migration tissulaire des macrophages, en utilisant des macrophages dérivés de la moelle osseuse de souris mutantes ou des macrophages humains traités avec des ARN interférents ou avec diverses drogues. Aussi, les propriétés biomécaniques de ces explants pourront être analysées parallèlement aux expériences de migration, rendant possible la recherche de corrélation de ces propriétés avec le choix du mode migratoire des macrophages.

Un manuscrit regroupant les résultats issus de ce projet est en cours d'écriture. Ces résultats montrent que les macrophages *in vivo* sont capables de migrer selon deux modes

migratoires différents : dans une tumeur, les TAMs utilisent une migration MMP-dépendante ayant de fortes similarités avec la migration mésenchymateuse alors que dans le derme sain, ils utilisent une migration MMP-indépendante rappelant la migration amiboïde. L'implication des MMPs a également été confirmée avec le modèle d'invasion dans des coupes de tumeur *ex vivo*.

2 Résultats

CLASSIFICATION: Biological Sciences – Cell Biology

**TUMOR-ASSOCIATED MACROPHAGES PERFORM THE MESENCHYMAL
MIGRATION MODE IN VIVO AS REVEALED BY INTRAVITAL MICROSCOPY
AND TUMOR SLICE CULTURES**

Philippe Gui^{*,†}, Elisabeth Bellard^{*,†}, Muriel Golzio^{*,†}, Isabelle Maridonneau-Parini^{*,†},
Véronique Le Cabec^{*,†}

* Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS); IPBS (Institut de Pharmacologie et
de Biologie Structurale); 205 route de Narbonne, BP64182, F-31077 Toulouse, France

† Université de Toulouse; UPS; IPBS; F-31077 Toulouse, France

Corresponding author: Isabelle Maridonneau-Parini^{*,†}

KEYWORDS: macrophage, migration, mesenchymal, tumor, intravital, in vivo, ex vivo

ABSTRACT:

Macrophage tissue infiltration plays a key role in tumor initiation, growth and metastasis. Therefore, the control of macrophage tissue infiltration has become a promising pharmacological strategy. *In vitro* studies have shown that they can use two distinct migration modes depending on the architecture of the extracellular matrix. Although protease-independent amoeboid migration is common to all leukocytes, macrophages are the only ones that can use the protease-dependent mesenchymal mode *in vitro*. However, this migration mode has yet to be shown *in vivo*. Here, we use high resolution intravital microscopy to determine the migration mode used by macrophages to infiltrate subcutaneous fibrosarcoma tumors induced inside dorsal window chambers. We observe that macrophages present in the tumor area migrate while adopting an elongated shape reminiscent of *in vitro* mesenchymal migration whereas macrophages in the surrounding healthy tissue are quicker and round-shaped. Treatment with an MMP inhibitor abolished migration of macrophages inside tumors and changed their shape from protrusive to round, whereas it affected neither the tumor cells nor the macrophages in the surrounding derma. We then confirmed these results with invasion assays using *ex vivo* tumor tissue slices co-cultured with human macrophages. This study reveals for the first time that tumor-associated macrophages (TAMs) are capable of using the mesenchymal mode of migration inside living tissues. In contrast, macrophages in adjacent derma use the amoeboid migration. Since mesenchymal migration is a migration mode exclusive to macrophages among leucocytes and to TAMs in the present model, this mode therefore represents a promising pharmacological target for the control of detrimental macrophage infiltration implicated in pathologies.

SIGNIFICANCE STATEMENT:

Cell migration, the movement of cells in particular directions to specific locations, has been described for several cell types and is fundamental in several processes such as tissue formation, wound healing and immune responses. Errors during this process have serious consequences, and can lead to disease development, such as the involvement of macrophages in tumor development. Therefore, an understanding of the mechanism by which these cells migrate may lead to the development of novel therapeutic strategies. In this study, we show for the first time that macrophage can migrate using a mode which isn't used by other immune cells, especially in a mouse model of fibrosarcoma. This would allow the specific control of macrophage infiltration into tumors, without affecting infiltration of other more benefic immune cells.

INTRODUCTION:

Macrophages are immune cells capable of migrating in the majority of the organism's tissues. Indeed, this migration phenomenon represents an essential physiologic process in the protection of the organism, for example in the case of an injury and/or an infection. However, studies have also shown that macrophage infiltration can be implicated in the development of certain pathologies, such as tumor growth. Indeed, the presence of macrophages in tumors has been associated with poor patient prognosis and the role of tumor-associated macrophages (TAMs) has been extensively documented, as they are involved in several cancer-promoting events such as angiogenesis, tumor growth and metastasis formation. As such, several strategies have been formulated to prevent accumulation of TAMs in tumors, including specific depletion of macrophages and targeting of macrophages recruitment. In this context, studies relating to macrophage migration in tissues, which take place in three-dimensional (3D) environment, seem pertinent. We have previously shown using reconstituted *in vitro* extracellular matrices (ECM) that macrophages were able to migrate in a 3D environment using two distinct modes. Amoeboid migration commonly refers to rounded or ellipsoid cells that slide through matrix pores, showing little to no adhesion to the matrix (1, 2). We previously showed that it is triggered in macrophages migrating through loose matrices such as fibrillar collagen (3). In contrast, mesenchymal migration is characterized by an elongated cell shape with membrane protrusions and proteolytic matrix degradation (1, 2); and it is only triggered in macrophages migrating through dense matrices like Matrigel™ or gelled collagen (3).

While amoeboid migration has been described for all leukocytes, macrophages appear to be the only leukocytes capable of performing mesenchymal migration (4). Therefore, this migration mode represents a promising pharmacological target for specific control of macrophage tissue infiltration and deserves broader characterization. However, to this date it

is still unknown if *in vivo* macrophages can perform mesenchymal migration. Indeed, while our previous results are interesting in an *in vitro* context, they remain speculative as to the physiological migration of macrophages inside actual living tissues. *In vitro* matrices may represent a convenient tool to study 3D cell migration and may succeed in mimicking certain aspects of matrix architectures found in some tissues; they however fail to replicate the complexity of living tissues in terms of the structural, cellular and biochemical composition of the milieu. Also, *ex vivo* differentiated macrophages may not represent actual macrophages differentiated from monocytes *in vivo*. Taken together, these limitations of *in vitro* experimentation have required a new approach to studying macrophage migration in a much more physiological context. This context is of course living tissues in which mesenchymal migration of macrophages has yet to be proven to exist. In this study, we therefore focus on studying the motility and behavior of actual endogenous macrophages in a living tissue from a living animal. Most importantly, we set out to determine if *in vivo* macrophages can indeed perform the mesenchymal migration mode. To do so, we used intravital two-photon microscopy in combination with the dorsal window chamber technique to image and track macrophage motility inside an induced subcutaneous tumor in mice, as well as *ex vivo* tumor slice cultures as invasion assays. A fibrosarcoma tumor model was chosen for two reasons. Firstly, solid tumors are often infiltrated with macrophages, called tumor-associated macrophages (TAMs) which promote tumor survival and growth (5). Indeed, macrophages can often account for more than 50% of the cell mass found in tumors, which in most cases results in poor cancer patient prognosis (6). Therefore, several TAM-targeted strategies have been proposed as cancer therapies, including the inhibition of macrophage recruitment. Secondly, tumors growth is often associated with a densification of the tissue (7, 8). Indeed, tumors undergoes significant extracellular matrix remodeling during growth such that its composition, turnover, processing and orientation change dramatically, resulting in a

progressive stiffening of the stroma that promotes tumor cell invasion and survival (7, 8). As macrophages only perform the mesenchymal mode of migration inside dense *in vitro* matrices, we hypothesized that the solid tumor environment could be a favorable setting to induce and observe this migration mode in macrophages *in vivo*, if it indeed exists.

The results presented in this manuscript show for the very first time that similarly to their *in vitro* 3D migration, macrophages are able to use two distinct migration modes in living tissues, and that TAMs mainly use the mesenchymal migration to infiltrate a fibrosarcoma.

RESULTS:

TAMs perform the mesenchymal migration mode

Our current understanding of macrophage motility has only been derived from *in vitro* studies. To study the *in vivo* migration macrophages in living tissues, we used a transgenic mouse model with ECFP-expressing macrophages (MacBlue) (9) in combination with the dorsal window chamber technique. MacBlue mice were surgically implanted with chambers and fluorescent cells were imaged by high resolution intravital two-photon microscopy. We first investigated macrophage migration inside a tumor tissue structure which was compatible with the dorsal window chamber setup. To do so, we induced the growth of a fibrosarcoma tumor in the derma of dorsal window chamber-equipped MacBlue mice. Tumor progression was monitored by fluorescence microscopy of GFP tumor cells and by assessment of growth. To evaluate leucocyte and macrophage infiltration inside these induced solid tumors, we performed flow cytometry analyses on resected and collagenase-dissociated tumors and determined that almost 85% of infiltrated CD45-positive leucocytes were F4/80-positive macrophages (Fig. S1), making the quantities of other leucocyte populations (such as dendritic cells, lymphocytes, neutrophils...) negligible in comparison.

Five days were needed in order to obtain a 3-mm diameter tumor, at which time we imaged CFP-expressing TAMs and GFP-expressing LPB cells. One to two hour acquisitions were made to assess 3D cell motility in dynamic z-stacks time series. Our first observation was that macrophages had massively infiltrated the tumor mass, which is often observed in tumors (10). After imaging, z-stack time series were analyzed and individual cell tracking and cell roundness measurements were performed. TAMs exhibited a very elongated shape and often had several protrusions, which is a distinctive morphology characteristic of *in vitro* mesenchymal macrophage migration we have previously observed (Fig. 1A) (3). Indeed, measurements of cell width and length show that the average roundness value (calculated as the width over length ratio) was low, at approximately 0.26 (0.01 mean \pm SD from 300 cells in three mice). Motility of TAMs as determined by cell tracking was relatively slow, with an average speed of 1.76 $\mu\text{m}/\text{min}$ (0.09 mean \pm SD from 300 cells in three mice). Although cells were quite motile, most were characterized by a “back and forth” displacement (Fig. 1B). Therefore, TAM migration agrees with two characteristics of *in vitro* mesenchymal migration in regards to cell morphology and motility.

Next, to investigate the mechanisms of TAM migration more closely, we sought to determine whether this migration shared another fundamental characteristic of *in vitro* mesenchymal migrating macrophages inside dense matrices, in addition to morphology and speed. We have previously shown that macrophage mesenchymal migration is dependent on protease-mediated degradation of the extracellular matrix during infiltration of dense *in vitro* Matrigel™ and gelled collagen I matrices. Indeed, migration was completely abolished when cells were treated with a cocktail of protease inhibitors, including inhibitors of matrix metalloproteases (MMPs) and lysosomal proteases (3). Also, our previous results have demonstrated that MMPs are required for macrophage infiltration of tumor cell spheroids and native collagen matrices (11, 12). Therefore, following an initial control imaging of

macrophages inside tumors to confirm the elongated morphology, we injected Batimastat (also known as BB-94) intraperitoneally into the same tumor-bearing mice equipped with dorsal window chambers. Batimastat is a broad spectrum MMP inhibitor which has been shown to inhibit the activity of MMP-1, -2, -7 and -9 *in vivo* (13). Interestingly, we observed that Batimastat treatment drastically modified both TAM morphology and motility, as cells went from an elongated and protrusive shape to a much more rounded one (Fig. 2A). Average roundness value increased from approximately 0.26 (0.01 mean \pm SD from 300 cells in three mice) to just under 0.7 (0.01 mean \pm SD from 300 cells in three mice). This change in morphology was accompanied by a significant reduction of motility, as most cells didn't move far away from their starting point compared to the untreated condition as shown by cell tracks (Fig. 2A), with a significant more than two-fold reduction of their average displacement speed from approximately 1.76 $\mu\text{m}/\text{min}$ (0.09 mean \pm SD from 300 cells in three mice) to 0.77 $\mu\text{m}/\text{min}$ (0.042 mean \pm SD from 300 cells in three mice). Therefore, Batimastat treatment shows that TAMs use a migration mode which is dependent on MMP activity.

To support this conclusion, we verified two major points: 1) does Batimastat affect tumor cell motility and 2) is the observed effect on macrophage motility due to a cytotoxic effect of Batimastat on macrophages *in vivo*. We therefore imaged tumor cells adjacent to TAMs during our experiments and we found that in contrast to macrophages, the treatment had no effect at all on both their morphology and their motility (Fig. S2). Indeed, TAMs remained mostly static over the course of the experiments and preserved their elongated shape. Secondly, we evaluated the phenotype of TAMs once Batimastat was cleared. Therefore, mice used in previous treatment experiments were allowed to recover for four days and then imaged one last time (14). Cells reverted back to an elongated and protrusive shape, identical to macrophages that had never come into contact with the inhibitor (Fig. 2B). Cell tracks and

speed were also back to pre-treatment values (Fig. 2B). Figure 2C features a speed vs roundness plot of TAMs before, during and after Batimastat treatment obtained in one mouse. Figure 2D shows a summary of roundness and speeds of TAMs throughout our experiments (three mice represented). Altogether, these results show that motility of *in vivo* TAMs is affected by inhibition of MMPs, thus sharing an important characteristic with *in vitro* macrophages using the mesenchymal migration mode *in vitro*.

We next sought to confirm our *in vivo* intravital results with human monocyte-derived macrophages (hMDMs). To do so, we had to use a different technical approach which was based on the preparation and *ex vivo* culture of tumor slices. C57Bl/6 mice were injected with LPB tumor cells. Three weeks later, a 1 mm³ tumor was resected and sliced using a microtome dedicated to live tissues (15). After determining the optimal conditions for *ex vivo* culture of tumor slices (viability evaluated by immunohistochemistry, data not shown), macrophage invasion assays into tumors were performed by seeding hMDMs on the top of slices and leaving the co-cultures for three days. To assess macrophage infiltration, slices were cut along their diameter and serial sectioning was performed along this cut (Fig. 3A). Sections were stained with an anti-CD68 antibody, specific to human macrophages. Immunohistochemistry images show that human macrophages are indeed capable of infiltrating the microenvironment provided by tumor slices (Fig. 3B). Many infiltrated macrophages displayed an elongated morphology. To investigate the effect of MMP inhibition on infiltration, parallel co-cultures using the same mouse tumor sample and the same donor of human macrophages were incubated with Batimastat-containing medium. Interestingly, Batimastat treatment inhibited macrophage infiltration and as cells remained at the surface of the tumor slice with a round morphology (Fig. 3C). These observations therefore show that similarly to *in vivo* mouse TAMs, inhibition of MMPs abolishes human macrophage migration within a living tissue environment. This also suggests that the

migration mode used by macrophages inside these tumors is the mesenchymal migration, since it is the one that has been shown to be affected by MMP inhibition *in vitro* (3, 11, 12).

***In vivo* macrophages can use an MMP-independent mode of migration in non-tumoral derma**

We next wanted to determine if the migration mode we observed in TAMs could also be observed in a different tissue or if it is specific to this subpopulation of macrophages. To do so, we imaged macrophages in the derma of mice carrying a dorsal chamber in which a tumor was not induced. Of note, despite the absence of a tumor tissue, macrophages were still highly recruited to the skin following the surgery process due to the inevitable inflammation it provoked. They could still be found in high numbers as long as two weeks following surgery. These macrophages displayed a drastically different phenotype than those previously imaged in the tumor. Indeed, whereas TAMs displayed an elongated mesenchymal-like morphology in the tumor, macrophages in the derma were much more rounded and exhibited very little to no protrusions, which is a distinctive morphology characteristic of *in vitro* amoeboid macrophage migration we have observed in previous studies (Fig. 4A) (3). Also, their motility was noticeably faster than that of TAMs, with an average speed of approximately 3.16 $\mu\text{m}/\text{min}$ (0.1 mean \pm SD from 300 cells in three mice), almost twice as TAMs.

To insure that the difference observed in tissue macrophage morphology was not due to the presence of a tumor in one case and its absence in the other, similar experiments were performed by imaging macrophage motility in the healthy derma surrounding an induced tumor in mice carrying a dorsal chamber as described earlier. As shown on Fig. 4B, macrophages in the healthy derma didn't seem to be affected by the adjacent tumor since they displayed the same morphology and motility characteristics as those in the derma of chambers

without a tumor. Therefore, macrophages in the derma seem to migrate using a phenotype that is reminiscent of the amoeboid migration observed *in vitro*.

We also found that Batimastat treatment had very little effect on macrophages in the derma surrounding the tumor, as displacement track profiles were similar with and without Batimastat treatment (Fig. 4C). Fig. 4D shows a summary of cell morphologies and speeds of macrophages in the derma throughout our experiments (data from three mice included). We did however observe a very slight increase in cell roundness (0.61 [0.01 mean \pm SD from 300 cells in three mice] to 0.66 [0.01 mean \pm SD from 300 cells in three mice]) and a small decrease in average speed (3.16 $\mu\text{m}/\text{min}$ [0.1 mean \pm SD from 300 cells in three mice] to 2.73 $\mu\text{m}/\text{min}$ [2.04 mean \pm SD from 300 cells in three mice]), though not as pronounced as for macrophages in the tumor mass. This could be attributed to the fact that some elongated cells could also be observed in the derma, although in small numbers. These cells could be TAMs that have migrated away from the tumor mass and therefore Batimastat treatment should have affected these cells, explaining the slight shifts in average roundness and speed.

Finally, to assess if the amoeboid-like migration of macrophages we previously observed can be found in another skin tissue independently of the surgical implantation of the window chamber, we observed *in vivo* macrophage behavior inside a mouse ear skin in resting condition. In the absence of any local insult, fluorescent macrophages were very few as expected and most exhibited a very protrusive morphology, characteristic of the resident macrophage/dendritic cell population in the skin called Langerhans cells. These cells displayed very little to no motility (Fig. 5A). Next, we wanted to observe migration of newly recruited monocytes and macrophages. To do so, we irritated MacBlue mice ear with dinitrofluorobenzene (DNFB) in order to trigger a local inflammation. As anticipated, a pronounced recruitment of monocytes/macrophages could be observed in the inflamed ear skin following irritation. Unlike resident cells, these newly recruited macrophages displayed a

similar phenotype to macrophages recruited to the derma following dorsal window chamber surgery, exhibiting a round shape and a fast motility (Fig. 5B). Therefore, *in vivo* macrophages use an amoeboid-like migration in different skin tissues.

Altogether, our results show that *in vivo* macrophages are able to adopt two different migration modes depending on their tissue environment. In tumors, TAMs use an MMP-dependent mesenchymal-like migration whereas in the inflamed ear skin and the dorsal derma, newly-recruited macrophages adopt an amoeboid-like migration which doesn't involve MMP activity.

DISCUSSION:

Macrophage tissue infiltration *in vivo* has been studied in different pathological contexts such as tumors (10). However, our present work represents the first investigation of the modes of migration used by *in vivo* macrophages inside the 3D environment of living tissues. Macrophages are highly motile cells that are crucial to develop a proper immune response and mediate adequate wound healing. Their implication in several widespread and deadly diseases has however been extensively evidenced and has made them the target of many therapeutic strategies. One such strategy is the inhibition of the recruitment of monocytes and macrophages to the pathological site. Several strategies have been proposed; mainly by depletion of important macrophage biology growth factors and chemokines such as CCL2 (16) and M-CSF (17). However, these treatments have insufficient specificity since they do not only target harmful macrophage populations (such as TAMs), but also every other macrophage populations whether they're tissue resident macrophages or newly recruited pro-inflammatory macrophages and regardless of their beneficial or detrimental contribution to the organism's homeostasis. An as of yet unexplored approach to prevent macrophage

recruitment is the targeting of their transtissular migration. Our previous studies have provided several clues as to the mechanisms used by macrophages to infiltrate matrices of different compositions and architectures, both in acellular (3) and cellular models (11). However, their physiological relevance was unknown up until now since marked discrepancies in cell behavior have been reported between *in vitro* and *in vivo* contexts (18, 19). Therefore, there was an urgent need to complement our existing data on the 3D migration of macrophages with *in vivo* results, and this is where the importance of the present work comes into focus. Indeed, macrophages are the only leucocytes known to this day to be able to use the mesenchymal migration mode *in vitro*, originally described for tumor cells (3, 20). In order to validate this method of 3D migration as a potential therapeutic target, its existence in macrophages *in vivo* had to be determined. By using two techniques involving real live tissues, we reveal for the first time that macrophages are able to migrate and infiltrate tumors using a phenotype with similar characteristics to *in vitro* mesenchymal migration we have previously shown: TAM motility within tumors was slow, involved an elongated and protrusive cell morphology and was abolished by MMP inhibition. Several studies have reported extensive alterations of the extracellular matrix of tissues during tumor progression resulting in a drastic densification. Therefore it is likely that motility within this dense tumor stroma requires its degradation in order to advance. Previous *in vitro* and *in vivo* studies have shown that cells that are incapable of performing the protease-dependent mesenchymal migration are unable to infiltrate dense matrices (4) or the tumor stroma, such is the case of lymphocytes which are constrained to low density regions where they are unable to reach tumor cells thus having limited anti-tumor efficiency (contributing to the immunosuppressive tumor microenvironment) (21). Macrophages are well known for their pro-tumor effects and close proximity with tumor cells, assisting them in several ways such as increased invasiveness. Here, we report that macrophage infiltration of the tumor stroma involves the

release of MMPs since inhibition of these proteases results in a striking inhibition of their motility. Similar to human macrophages on top of a dense *in vitro* matrix incubated with protease inhibitors, we also observed that immobilized TAMs treated with Batimastat adopted a round morphology. We also confirmed the observations made with motility within tumors with a second live tissue approach. Using *ex vivo* cultured mouse tumor slices, we were able to develop an invasion assay which could be used with human macrophages since most of our previous findings were obtained using these cells. Concurring with our intravital data, our experiments show that MMPs are required for human macrophage infiltration of tumors, adding evidence to macrophage mesenchymal migration.

Our results are consistent with our previous studies of *in vitro* macrophage migration depending on their polarization and studies which have characterized TAM phenotype. We have previously shown that human and mouse *in vitro* alternatively activated M2 macrophages obtained by incubation with IL-4 can efficiently use the mesenchymal migration mode on dense matrices, as opposed to classically activated M1 macrophages polarized with IFN- γ or TNF- α which remain motionless (4). In M2 macrophages, the formation of protrusion structures called podosomes is enhanced, which participate in matrix degradation (4, 22, 23). It is commonly known that the tumor microenvironment is dominated by Th2-type cytokines such as IL-4, TGF- β 1 and arginase 1, which drive macrophages towards an M2 polarization (24). This allows TAMs to ensure pro-tumoral functions which are characteristic of M2 macrophages such as tissue remodeling and angiogenesis. Therefore, the tumor-induced polarization of TAMs may be responsible for their enhanced mesenchymal migration capabilities, allowing them to populate the dense tumor mass and exert their pro-tumoral activities.

The complete inhibition of TAM motility by MMP inhibitors is an interesting observation since we have previously shown that treatment of hMDMs in *in vitro* invasion assays with

MMP inhibitor such as GM6001 and Batimastat had little to no effect on macrophage mesenchymal migration (3). In Matrigel™ and gelled collagen, inhibition of lysosomal proteases results in only a partial inhibition of migration, and only a simultaneous inhibition of MMPs and lysosomal proteases yielded an effective inhibition. However, we report here that inhibition of MMPs seems sufficient to effectively immobilize *in vivo* TAMs. Although the reasons for these discrepancies have yet to be determined, one could argue that purified acellular matrices represent strikingly different microenvironments than living tissues. This is especially the case in a tumor microenvironment where several different cell types, extracellular matrix components, growth factors and cytokines are present and interact with each other. Although the exact composition of LPB tumor stroma hasn't been determined, it could require a different set of MMPs than in Matrigel™ or collagen I infiltration. Also, we have previously shown that MMPs are required for macrophage infiltration of SUM159PT tumor cell spheroids (11) which corroborates our present data. This again highlights the discrepancies between *in vitro* and *in vivo* models, and therefore the importance of *in vivo* models of cell migration. However, since inhibition of MMPs is capable of effectively inhibit TAM migration, it would have to be confirmed whether lysosomal proteases are dispensable.

Intravital observations also show that *in vivo* macrophages do not use only one migration mode, but seem to use two as macrophages in the derma surrounding the tumor are rounded-shaped, migrate with much higher speeds and do not seem to be affected by inhibition of MMPs. This supports the notion that macrophages can perform both the amoeboid and mesenchymal migration modes *in vivo*, depending on the environment they're in. Whereas proteolysis is needed in the dense tumor stroma as previously discussed, it may be dispensable in the looser connective tissue of the derma where cells can simply glide through the matrix fibers. Although there is enough evidence to affirm that this type of motility is indeed different from the type that happens inside the tumor, it is not yet known if it is in fact an

amoeboid migration. Only treatment with a Rho/ROCK inhibitor, shown to completely inhibit amoeboid migration in porous *in vitro* fibrillar collagen I matrices (3), could confirm this. Moreover, we have recently shown that inhibition of the Rho/ROCK pathway, *via* the upstream protein p27^{kip1}, also participates in promoting mesenchymal migration of macrophages while hindering amoeboid migration. We also showed that this inhibition is required for macrophage infiltration in induced lung tumors (25). Therefore it would be interesting to assess whether inhibition of Rho/ROCK in TAMs would have an effect on their motility and hypothetically enhance their mesenchymal-like motility as we have observed *in vitro*.

A number of key questions still remain. Our experiments were performed using Batimastat which is a broad MMP inhibitor. Therefore, identification of the specific MMPs involved in TAMs migration remains to be done. Likely candidates are MMPs which have been reported to be inhibited by Batimastat (MMP-1, -2, -3, -7 and -9) as well as MMPs reported to be implicated in the motility of other cell types (26) such as MT1-MMP. Also, the possible contribution of MMPs released by the tumor cells themselves has to be taken into account. Although intravital observations revealed that tumor cells have very little motility in our model, the fact that these cells are also capable of matrix degradation should not be ignored.

Finally, an important question is whether the mesenchymal migration mode is specific to certain pathological states or can it be used by macrophage in healthy tissues. Our present data show that TAMs require a mesenchymal-like protease-dependent mode of migration to move within the dense tumor mass. We have also previously shown that macrophages can sense the mechanical properties of the environment *via* their podosomes (3, 23). However, is the density of the stroma sufficient to trigger proteolysis or are there other factors inherent to the tumor environment that are at play? It is well known that TAMs and tumor cells interact closely with each other and promote their survival (27, 28). TAMs have been shown to

promote tumor cell invasiveness (28), and the other way around may also be true. If it is true, the identification of the cytokines or growth factors which promote mesenchymal migration of macrophages could represent an entire new path of investigation which may lead to interesting therapeutic strategies. Moreover, this migration mode could not only be relevant in the pathological context of tumors but also several other diseases that involve macrophage recruitment such as inflammatory diseases and granuloma formation during a *Mycobacterium tuberculosis* infection. However, the other hypothesis is that tissue density could be enough to promote mesenchymal migration, as it is the case in gelled collagen I *in vitro* matrices. Overall, a better understanding of the environmental cues which dictate macrophage migration in different tissues, healthy or pathological, would provide immense insight to better control it.

In conclusion, we used two different technical approaches involving live tissues to show that *in vivo* macrophages are capable of performing at least two modes of migration, similarly to our *in vitro* data. Most importantly, inside tumors, TAMs use a mesenchymal-like migration mode to migrate within fibrosarcoma tumors. By showing that this mode of migration not only exists *in vivo*, but is relevant in the tumor context, it could represent a potential target for new anti-cancer therapies.

MATERIALS AND METHODS:

Animal treatment

MacBlue (*Csf1r*-Gal4VP16/UAS-ECFP) mice were obtained from David A. Hume at The Roslin Institute (Midlothian, Scotland) (9). Mice ear were depilated and imaged before and after irritation with 10 μ L of 0.15% dinitrofluorobenzene (Sigma Aldrich, Lyon, France) in a 4:1 acetone and olive oil mix. When indicated, Batimastat (Sigma-Aldrich) was injected

intraperitoneally 6 days after (30 mg/kg) and 7 days after (15 mg/kg) dorsal window chamber surgery. All experiments were performed according to animal protocols approved by the Animal Care and Use committee of the Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale.

Dorsal window chamber surgery and tumor induction

Surgery was carried out under general anesthesia using intraperitoneal injection of Ketamine (100 mg/kg, Virbac, Carros, France) and Xylazine (16 mg/kg, Bayer, Puteaux, France). The back of the mouse was shaved and depilated with depilatory cream (Veet, Reckitt Benckiser, Slough, UK) and the eyes were kept hydrated throughout the surgery with Ocry-gel (TVM, Lempdes, France). The chamber consisted of two symmetrical titanium frames (APJ Trading Co., Ventura, CA, USA). These frames sandwiched an extended double layer of dorsal skin with the use of stainless steel screws and sutures. After the implantation of the frames, one layer of the skin (12 mm diameter) was surgically removed and all fat and connective tissues from the lower layer were dissected away under a stereomicroscope (Leica Microsystems, Deerfield, IL) to ensure optimal microscopic observation. After addition of sterile PBS, a sterile glass coverslip (Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim, Germany) was attached to the open frame with a stainless steel snap ring to cover the surgical site and provide visual access to the skin tissue. Right after the surgery and on the following day, Profenid (10 mg/kg, 50 μ L in each thigh, Sanofi-Aventis, Paris, France) was injected intramuscularly to provide analgesia and to prevent inflammation.

Fibrosarcoma-derived LPB-GFP cells are described elsewhere (29). Before attachment of the coverslip onto the window frame, 5 million cells in 20 μ L of DMEM (Life Technologies, Saint Aubin, France) were injected subcutaneously in the remaining connective tissue of the

lower skin layer. Tumor growth was monitored daily. A 3 mm-diameter tumor was obtained 5 days later.

Intravital microscopy and image acquisition

Intravital microscopy was carried out on a customized stage for holding mice using an upright multiphoton microscope LSM 7 MP (Zeiss, Marly le Roi, France) equipped with a 20x / 1.0 DIC (df=1.8mm) objective and a Chameleon Vision II laser (Coherent, Courtaboeuf, France). Animals were anaesthetized by isoflurane inhalation (Belamont, Neuilly-sur-Seine, France) throughout the imaging session. Animal temperature was maintained at 37°C with an Air-Therm-heated environmental chamber and a heating blanket placed under the mouse.

EFCP-fluorescent macrophages and collagen by second-harmonic generation were observed using an LP 495 filter (435-485 nm) and LPB-GFP tumor cells were observed using a 500-550 nm mirror. Qtracker 565 Vascular Labels (Life Technologies, Saint-Aubin, France) was injected retro-orbitally in the mouse just before image acquisition to label blood vessels. The tumor portion of the window was positioned under the objective and imaged with the laser set at a 940 nm excitation.

Image analysis

Imaris (BitPlane, Zurich, Switzerland) software was used to process acquired images, track cells and measure cell roundness. Due to the high number of cells, cell tracking had to be performed manually using the spots function of Imaris and skipping the automatic mode. For each image, 100 randomly-chosen cells were tracked for at least 30 minutes. Cell roundness was then determined in 2D slice mode. Roundness of tracked cells was obtained by calculating the average value of the width over length ratio at three time points (start, middle

and end). Width was taken at the cell's mid-length. Statistical analysis was performed with GraphPad Prism software.

Isolation of human monocyte-derived macrophages

Human monocytes were isolated from blood of healthy donors (buffy coat obtained from Etablissement Français du Sang, Toulouse, France) and differentiated into human monocyte-derived macrophages (hMDMs) as previously described (3). Blood samples were obtained following standard ethical procedures and with the approval of the concerned Internal Review Boards.

***Ex vivo* tumor slice preparation and co-culture with human macrophages**

Tumor induction was performed in C57BL/6 mice identically to induction in dorsal window chamber-equipped mice. However, tumor growth was monitored for three weeks in order to obtain an approximately 1 mm³ tissue. Tumor were resected and embedded in 3% low gelling temperature agarose, type VII-A (Sigma-Aldrich, Lyon, France) prepared in PBS to allow for easier slicing. 500- μ m slices were obtained with a Krumdieck tissue slicer (TSE Systems, Bad Homburg, Germany) filled with ice-cold PBS (Life Technologies) set to medium blade and arm speeds. Slices were cultured on 30-mm cell culture insert featuring a hydrophilic PTFE membrane with pore size of 0.4 μ m (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) placed inside 6-well plates containing 1.1 mL of DMEM with or without 10 μ M Batimastat. The same day, co-cultures were performed by seeding 5×10^5 hMDMs on top tumor slices and left in a 37°C 5% CO₂ environment. Culture medium was replaced daily for three days before overnight fixation with formalin at 4°C (Sigma-Aldrich).

Immunohistochemistry on tumor slices

Tumor slices used in co-cultures with hMDMs were embedded in paraffin. For macrophage infiltration quantification assays, slices were then cut along the diameter and serial sectioning was performed along the cut. Sections were stained using a KP1 mouse anti-human CD68 monoclonal antibody (Abcam, Paris, France). To determine viability of slices, sections were stained with hematoxylin and eosin to assess cell apoptosis and necrosis. Slides were then scanned using a Panoramic 250 Flash II slide scanner (3DHISTECH, Budapest, Hungary) with a 20× magnification lens.

Digestion and flow cytometry analysis of tumors

Subcutaneous GFP-expressing fibrosarcoma tumors were resected, cut into small 1 mm³ pieces and incubated in digestion medium containing 0.34 mg/mL Collagenase IV (Life Technologies) in complete RPMI (Life Technologies) for 2 hours at 37°C. Digestion products were then filtered through a cell strainer (BD, Le Pont de Claix, France) and homogenized using the plunger of a 1 mL syringe. Homogenate was resuspended in complete RPMI and centrifuged 10 min at 1,000 rpm. Pellet was then resuspended and filtered again through a cell strainer before a second round of centrifugation. Cell pellet was resuspended in sorting buffer (1 mM EDTA, 25 mM HEPES at pH 7.0 in PBS [Life Technologies]). 5 × 10⁵ cells in 100 μL buffer were incubated with 1 μL Fc block (Biolegend, San Diego, CA), 0.5 μL Pacific Blue anti-CD45 antibody (Biolegend) and 1 μL APC anti-F4/80 antibody (Biolegend) for 30 min at

4°C. Cells were then centrifuged, resuspended in 300 µL sorting buffer and analyzed with a LSR II Flow Cytometer (BD).

ACKNOWLEDGMENTS:

We would like to acknowledge Toulouse Réseau Imagerie for imaging and the immunohistochemistry platform of the Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan.

FINANCIAL SUPPORTS:

For this work, I.M.P. was supported by Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer [grant numbers 2010-120-1733 and ARC-Equipement 8505]; Agence Nationale de la Recherche (ANR) [grant number 2010-01301]; and Fédération pour la Recherche Médicale [grant number #FRM-DEQ 20110421312]; V.L.C. was supported by Région Midi-Pyrénées [grant number 10051286]; and Université de Toulouse III; P.G. was supported by a doctoral fellowship from Université de Toulouse III.

REFERENCES:

1. Friedl P & Wolf K (2003) Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 3(5):362-374.
2. Sahai E & Marshall CJ (2003) Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nature cell biology* 5(8):711-719.
3. Van Goethem E, Poincloux R, Gauffre F, Maridonneau-Parini I, & Le Cabec V (2010) Matrix architecture dictates three-dimensional migration modes of human macrophages: differential involvement of proteases and podosome-like structures. *Journal of immunology* 184(2):1049-1061.
4. Cougoule C, *et al.* (2012) Blood leukocytes and macrophages of various phenotypes have distinct abilities to form podosomes and to migrate in 3D environments. *European journal of cell biology* 91(11-12):938-949.
5. Pollard JW (2004) Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 4(1):71-78.
6. Bingle L, Brown NJ, & Lewis CE (2002) The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *The Journal of pathology* 196(3):254-265.
7. Paszek MJ, *et al.* (2005) Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer cell* 8(3):241-254.
8. Kass L, Erler JT, Dembo M, & Weaver VM (2007) Mammary epithelial cell: influence of extracellular matrix composition and organization during development and tumorigenesis. *The international journal of biochemistry & cell biology* 39(11):1987-1994.
9. Ovchinnikov DA, *et al.* (2008) Expression of Gal4-dependent transgenes in cells of the mononuclear phagocyte system labeled with enhanced cyan fluorescent protein using Csf1r-Gal4VP16/UAS-ECFP double-transgenic mice. *Journal of leukocyte biology* 83(2):430-433.
10. Biswas SK, Allavena P, & Mantovani A (2013) Tumor-associated macrophages: functional diversity, clinical significance, and open questions. *Seminars in immunopathology* 35(5):585-600.
11. Guet R, *et al.* (2011) The process of macrophage migration promotes matrix metalloproteinase-independent invasion by tumor cells. *Journal of immunology* 187(7):3806-3814.
12. Wiesner C, El Azzouzi K, & Linder S (2013) A specific subset of RabGTPases controls cell surface exposure of MT1-MMP, extracellular matrix degradation and three-dimensional invasion of macrophages. *Journal of cell science* 126(Pt 13):2820-2833.
13. Hidalgo M & Eckhardt SG (2001) Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *Journal of the National Cancer Institute* 93(3):178-193.
14. Wang X, Fu X, Brown PD, Crimmin MJ, & Hoffman RM (1994) Matrix metalloproteinase inhibitor BB-94 (batimastat) inhibits human colon tumor growth and spread in a patient-like orthotopic model in nude mice. *Cancer research* 54(17):4726-4728.
15. Krumdieck CL (2013) Development of a live tissue microtome: reflections of an amateur machinist. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* 43(1):2-7.

16. Zijlmans HJ, *et al.* (2006) The absence of CCL2 expression in cervical carcinoma is associated with increased survival and loss of heterozygosity at 17q11.2. *The Journal of pathology* 208(4):507-517.
17. Lin EY, Nguyen AV, Russell RG, & Pollard JW (2001) Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *The Journal of experimental medicine* 193(6):727-740.
18. Griffith LG & Swartz MA (2006) Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nature reviews. Molecular cell biology* 7(3):211-224.
19. Nelson CM & Bissell MJ (2006) Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. *Annual review of cell and developmental biology* 22:287-309.
20. Pankova K, Rosel D, Novotny M, & Brabek J (2010) The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 67(1):63-71.
21. Salmon H, *et al.* (2012) Matrix architecture defines the preferential localization and migration of T cells into the stroma of human lung tumors. *The Journal of clinical investigation* 122(3):899-910.
22. Linder S, Wiesner C, & Himmel M (2011) Degrading devices: invadosomes in proteolytic cell invasion. *Annual review of cell and developmental biology* 27:185-211.
23. Van Goethem E, *et al.* (2011) Macrophage podosomes go 3D. *European journal of cell biology* 90(2-3):224-236.
24. Sica A, *et al.* (2008) Macrophage polarization in tumour progression. *Seminars in cancer biology* 18(5):349-355.
25. Gui P, *et al.* (2014) Rho/ROCK pathway inhibition by the CDK inhibitor p27kip1 participates in the onset of macrophage 3D-mesenchymal migration. *Journal of cell science* 127(Pt 18):4009-4023.
26. Deryugina EI & Quigley JP (2006) Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer metastasis reviews* 25(1):9-34.
27. Sica A, Allavena P, & Mantovani A (2008) Cancer related inflammation: the macrophage connection. *Cancer letters* 267(2):204-215.
28. Goswami S, *et al.* (2005) Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1/epidermal growth factor paracrine loop. *Cancer research* 65(12):5278-5283.
29. Belehradek J, Jr., Barski G, & Thonier M (1972) Evolution of cell-mediated antitumor immunity in mice bearing a syngeneic chemically induced tumor. Influence of tumor growth, surgical removal and treatment with irradiated tumor cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 9(3):461-469.

FIGURE LEGENDS:

Fig. 1: Tumor-associated macrophages adopt an elongated morphology and have a slow motility

MacBlue mice were surgically implanted with a dorsal window chamber and were injected subcutaneously with tumor cells to induce tumor growth. (A) Images show a montage of the dynamics of a TAM inside the tumor mass 5 days after tumor induction in a 3D representation. Images are 3 min apart. (B) 3D map of tracks of individual TAMs within the tumor. Cell tracking was performed on intravital dynamic z-stack time series. Tracks from 100 cells and from one mouse are shown. Blue designates the start of the track whereas red designates the end.

Fig. 2: Inhibition of MMP induces an impairment of TAM motility

Tumor-bearing MacBlue mice with dorsal window chambers were treated with MMP inhibitor Batimastat. Morphologies of TAMs in a 3D representation and 3D map of tracks of individual TAMs during (A) and 4 days after (B) Batimastat treatment. Tracks from 100 cells and from one mouse are shown. (C) Plot of average cell speed versus cell morphology of TAMs within the tumor before, during and 4 days after Batimastat treatment (results from only one mouse representative of three mice is represented). (D) Summary of TAM cell roundness and average cell speeds throughout Batimastat experiments. The mean \pm SD from three mice are shown. Statistics: paired Student's t-test, two-tailed, 95% confidence interval.

Fig. 3: Invasion of human macrophages into tumor explants is inhibited by MMP inhibitor

Human monocyte-derived macrophages were seeded on top of *ex vivo* cultures of tumor slices. Invasion assay was performed over a period of three days, after which slices were fixed and analyzed by immunohistochemistry. (A) Experimental scheme of the experiments. Human macrophages are seeded on top of tumor slices and co-cultures were left for 3 days (1). Following fixing, slices are cut along their diameter (2) and serial sectioning was performed along the cut (3). (B-C) Sections of slices following invasion assay were stained with anti-CD68 antibody to evaluate macrophage tissue infiltration. Slices from 2 donors of human macrophages (on tumor slices obtained from 2 mice), incubated without Batimastat (B) or incubated with Batimastat (C) are shown. Red arrows indicate macrophages that have infiltrated the tumor tissue.

Fig. 4: Macrophages in the derma of dorsal window chamber-equipped mice are round and have an MMP-independent rapid migration

(A) Dynamics of newly-recruited macrophages in the dorsal derma of mice without an induced tumor in a 3D representation. Images are 2 min part. Tracks on motile macrophages are shown in red. (B) Dynamics of newly-recruited macrophages in the dorsal derma of mice surrounding an induced tumor in a 3D representation. Images are 3 min part. Tracks on motile macrophages are shown in red. (C) 3D map of tracks of individual macrophages within the derma surrounding an induced tumor. Cell tracking was performed on intravital dynamic z-stack time series acquired with and without Batimastat treatment. Tracks from 100 cells and from one mouse are shown. Blue designates the start of the track whereas red designates the end. (D) Summary of cell roundness and average cell speeds of macrophages in the derma throughout Batimastat experiments. The mean \pm SD from three mice are shown. Statistics: paired Student's t-test, two-tailed, 95% confidence interval.

Fig. 5: Newly recruited macrophages in the inflamed ear skin display a similar phenotype to macrophages in the dorsal derma

Ear skin of MacBlue mice was imaged by intravital microscopy. (A) Dynamics of a resident macrophage in the ear skin in a 3D representation. Images are 3 min apart. (B) Dynamics of newly-recruited macrophages in the inflamed ear skin during an irritation-mediated inflammation. Images are 3 min apart. Tracks on motile macrophages are shown in red.

Fig. S1: Flow cytometry analysis of cells retrieved from tumor digestion

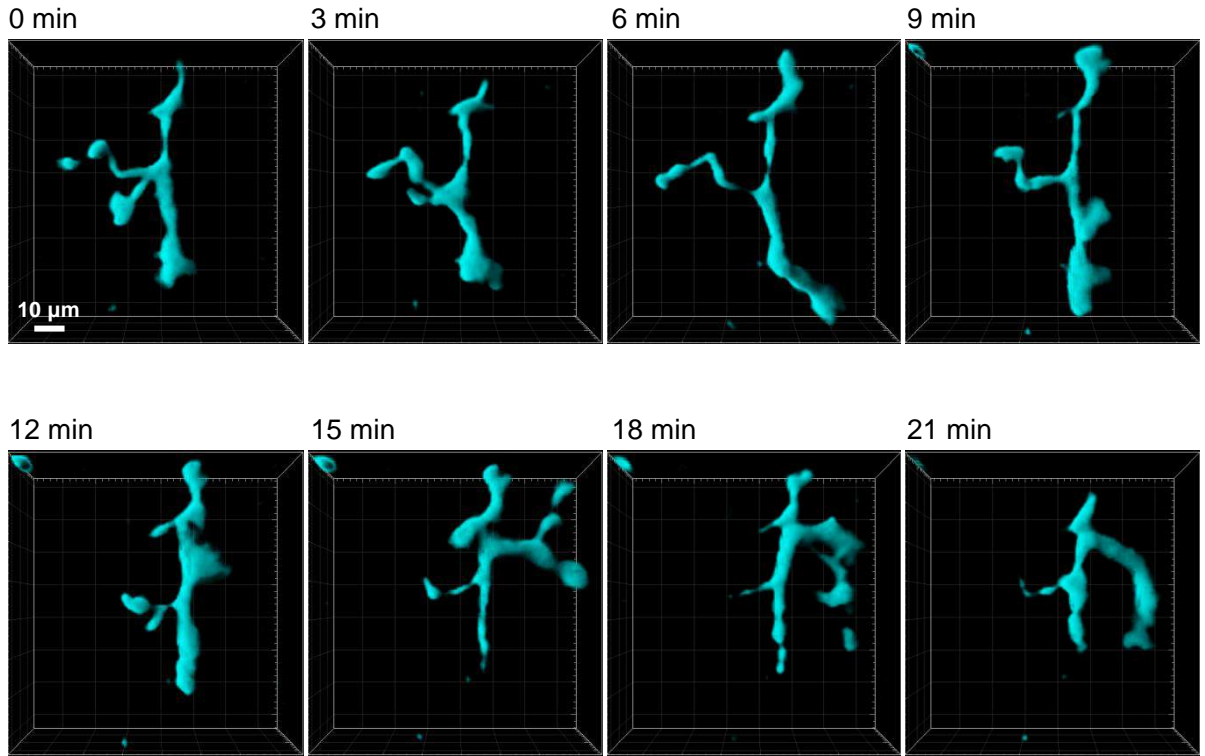
Induced subcutaneous GFP-expressing fibrosarcoma tumors were resected and submitted to tissue digestion. Retrieved cells were then analyzed by flow cytometry after incubation with anti-CD45 PacificBlue (leucocytes) and anti-F4/80 APC (macrophages) antibodies. (A) Scatter plot of FSC vs SSC was first used to look at the distribution of cells based upon size and to dissociate intact cells from cellular debris and cell aggregates. (B) Tumor cells and non-tumor cells were then distinguished by FITC/GFP expression. (C) Non GFP-cells were then separated between CD45-negative and CD45-positive (leucocytes) cells. (D) Among CD45-positive cells, close to 85% were F4/80-positive macrophages.

Fig. S2: Batimastat treatment did not affect tumor cells morphology and motility

Dynamics of GFP-expressing tumor cells inside a dorsal window chamber before (A), during (B) and after (C) Batimastat treatment in a 3D representation. Images are 3 min apart.

Figure 1

A



B

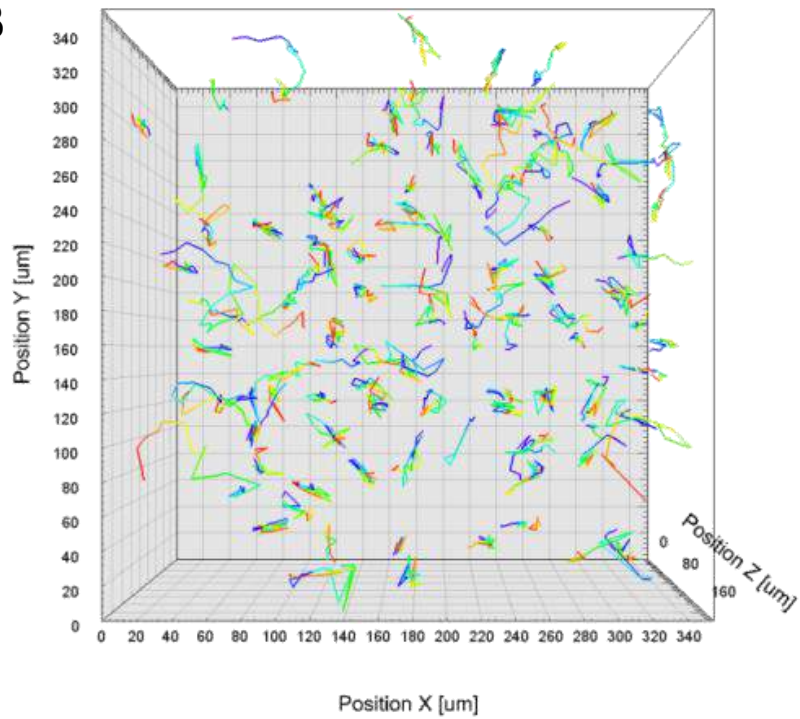


Figure 2

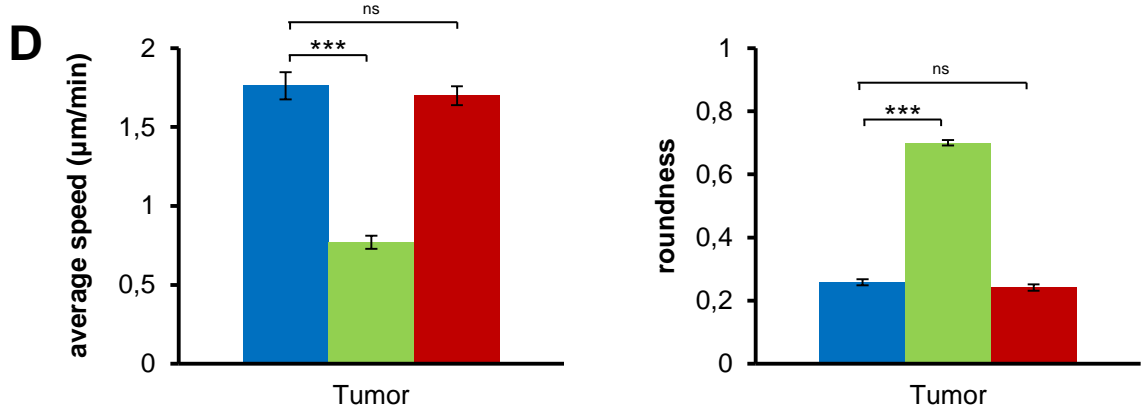
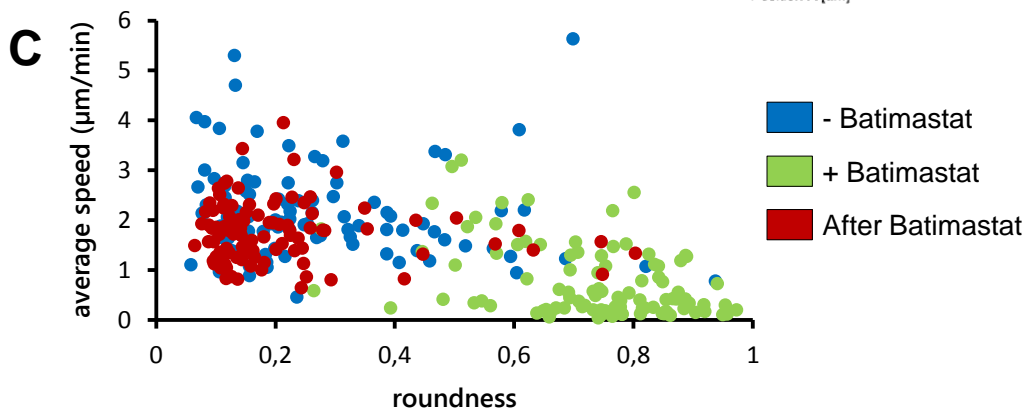
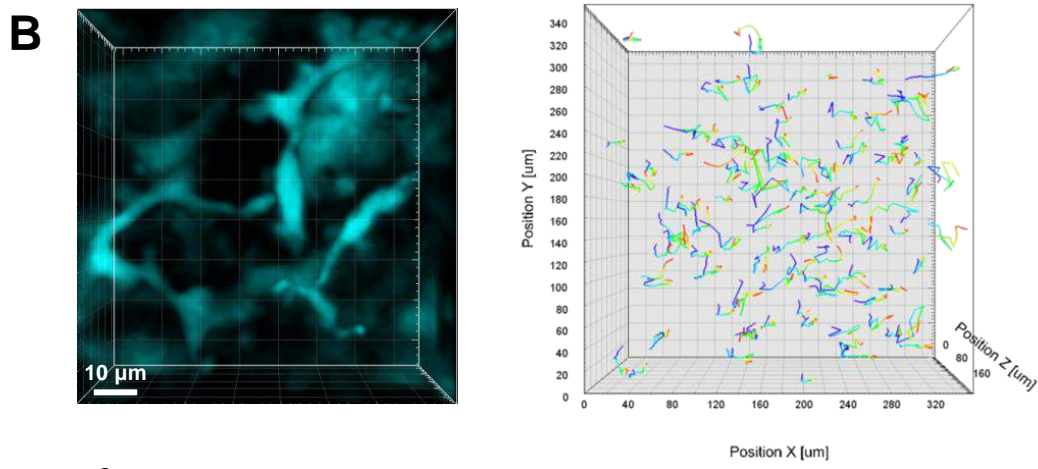
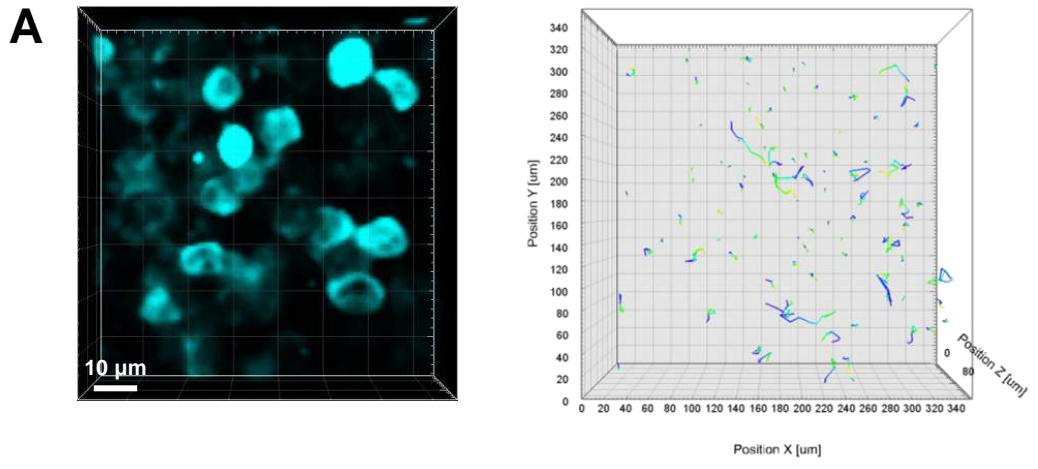
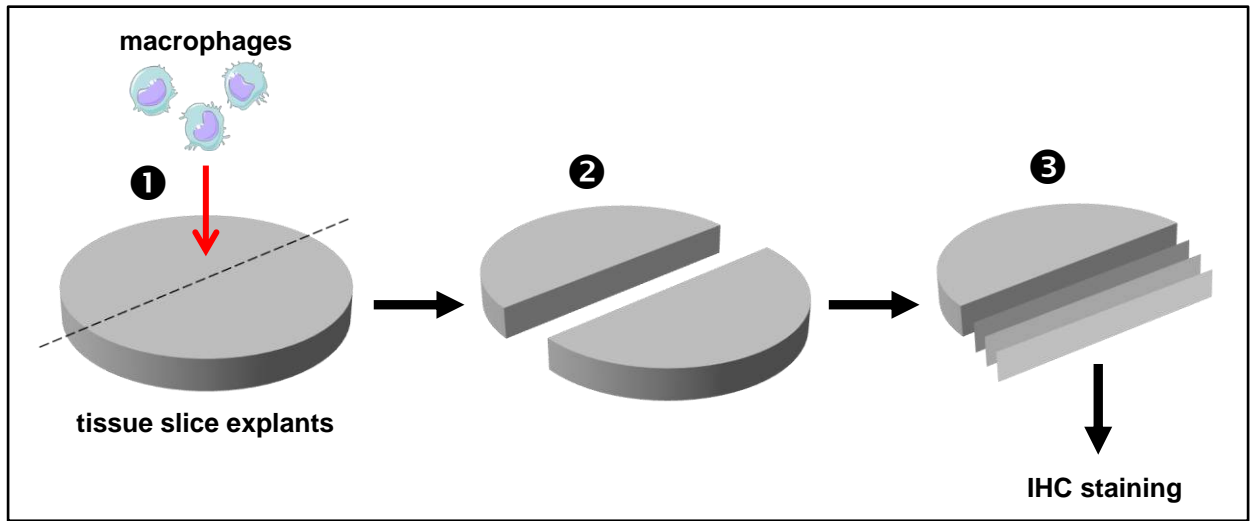


Figure 3

A

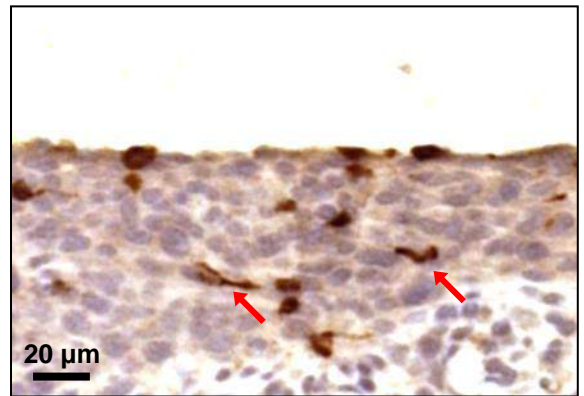
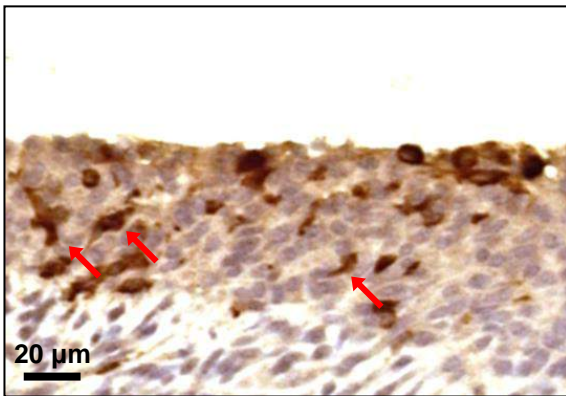


B

Donor 1

Donor 2

Control



C

With Batimastat

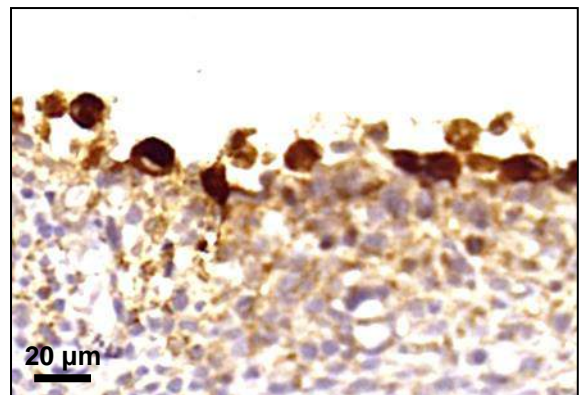
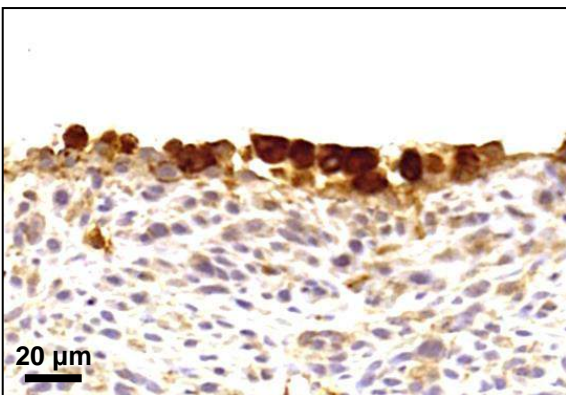
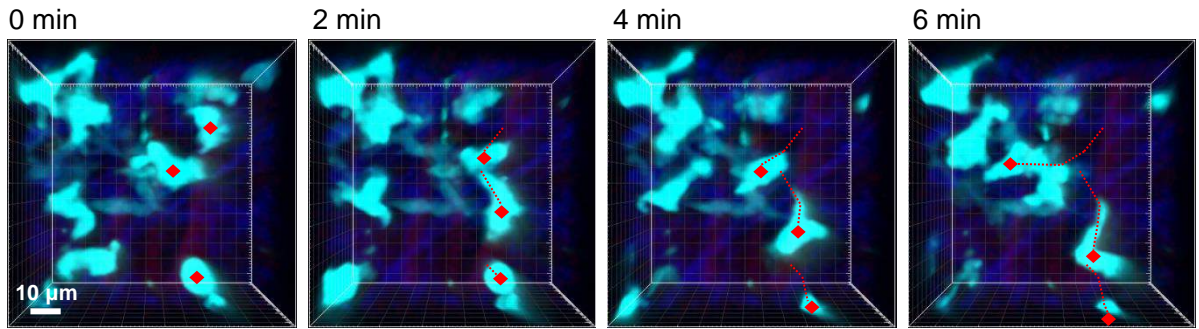
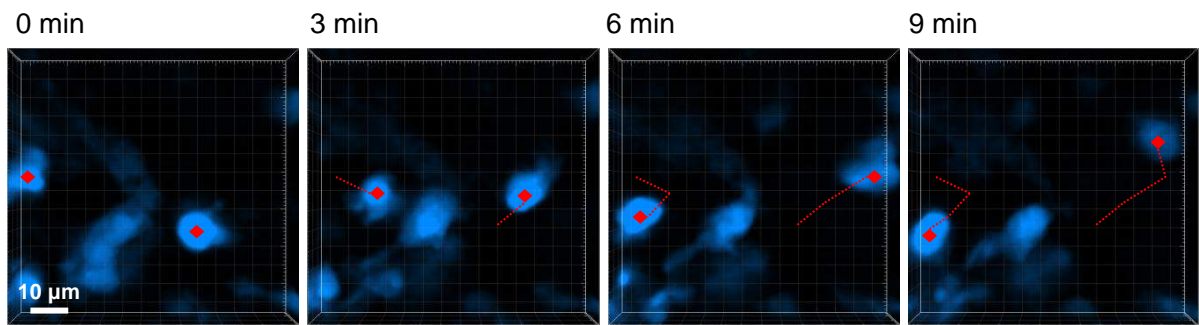


Figure 4

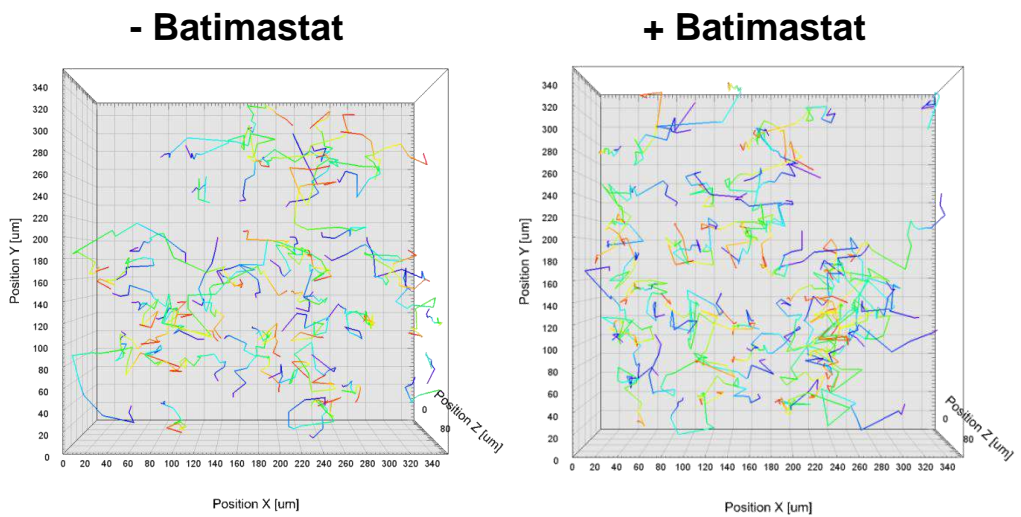
A



B



C



D

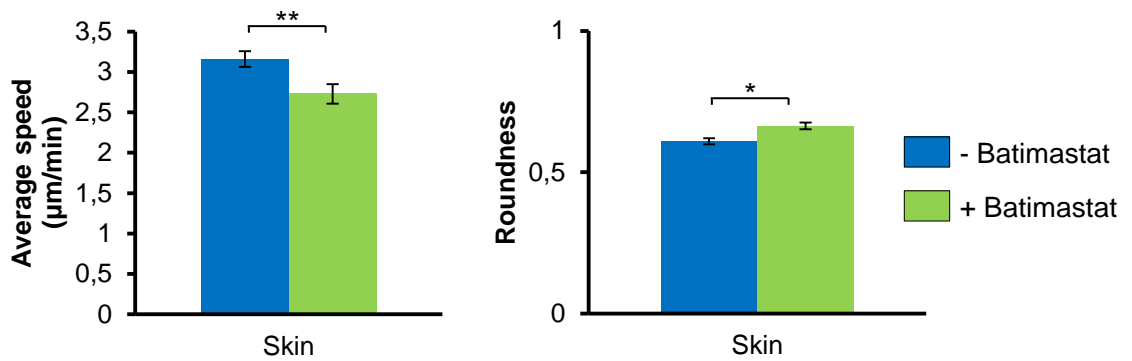
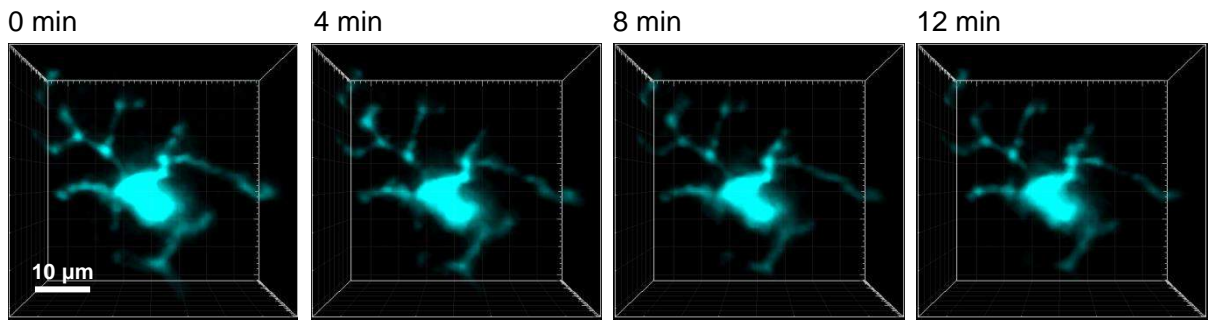


Figure 5

A



B

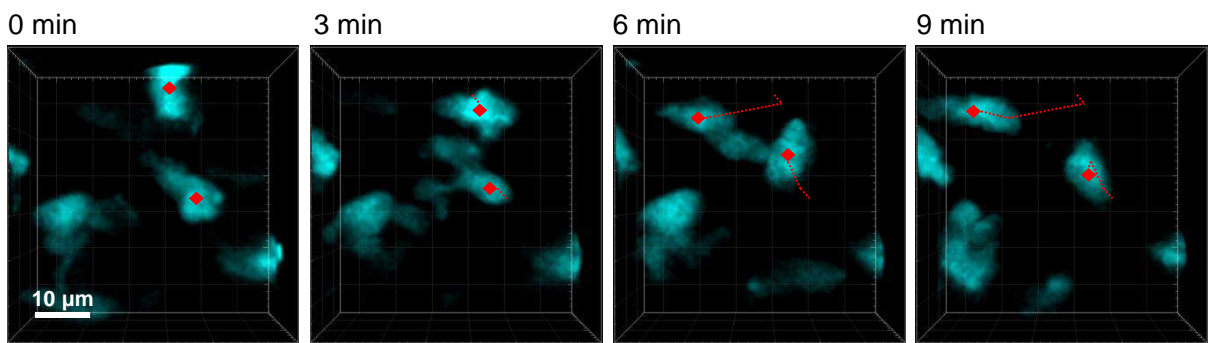


Figure S1

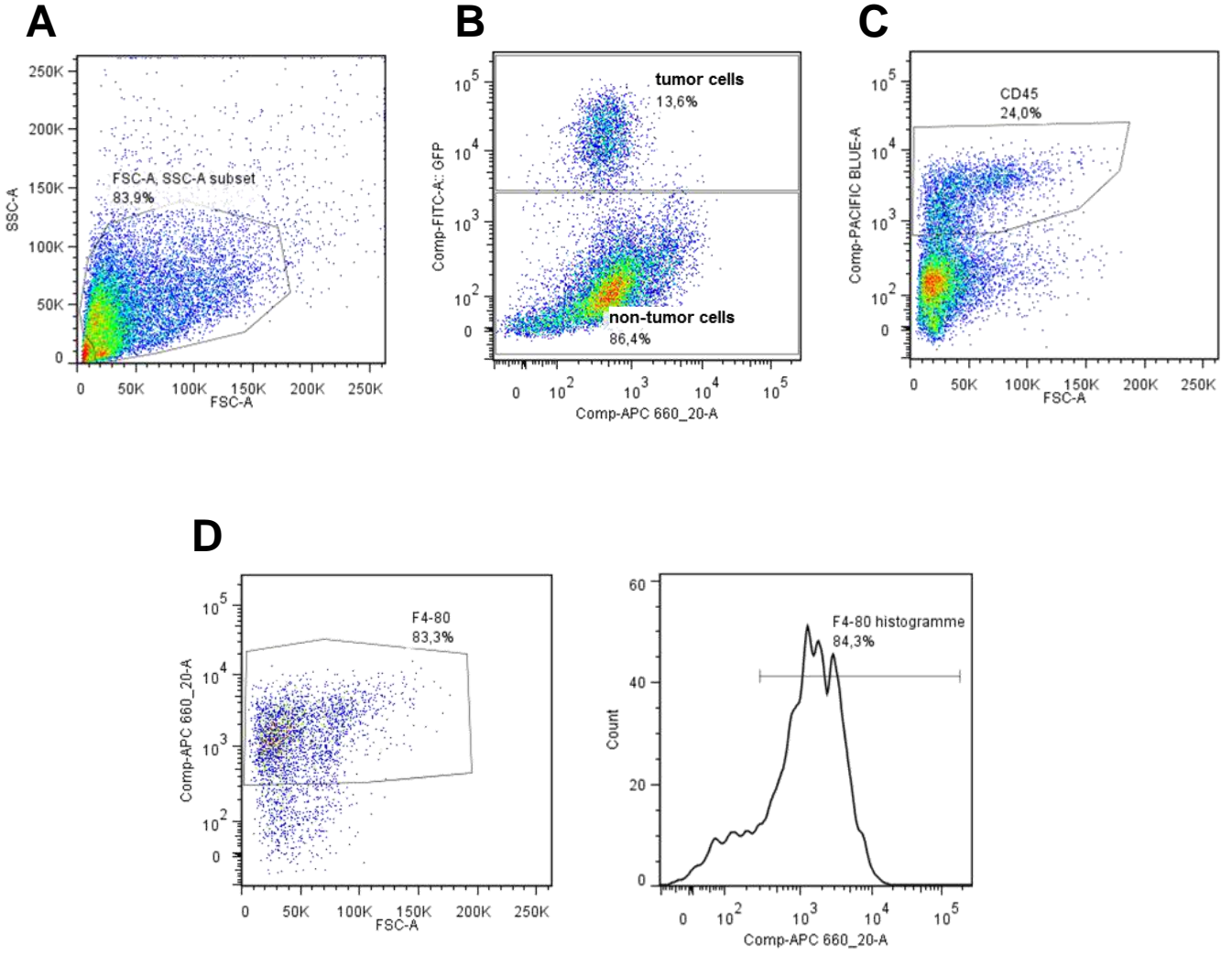
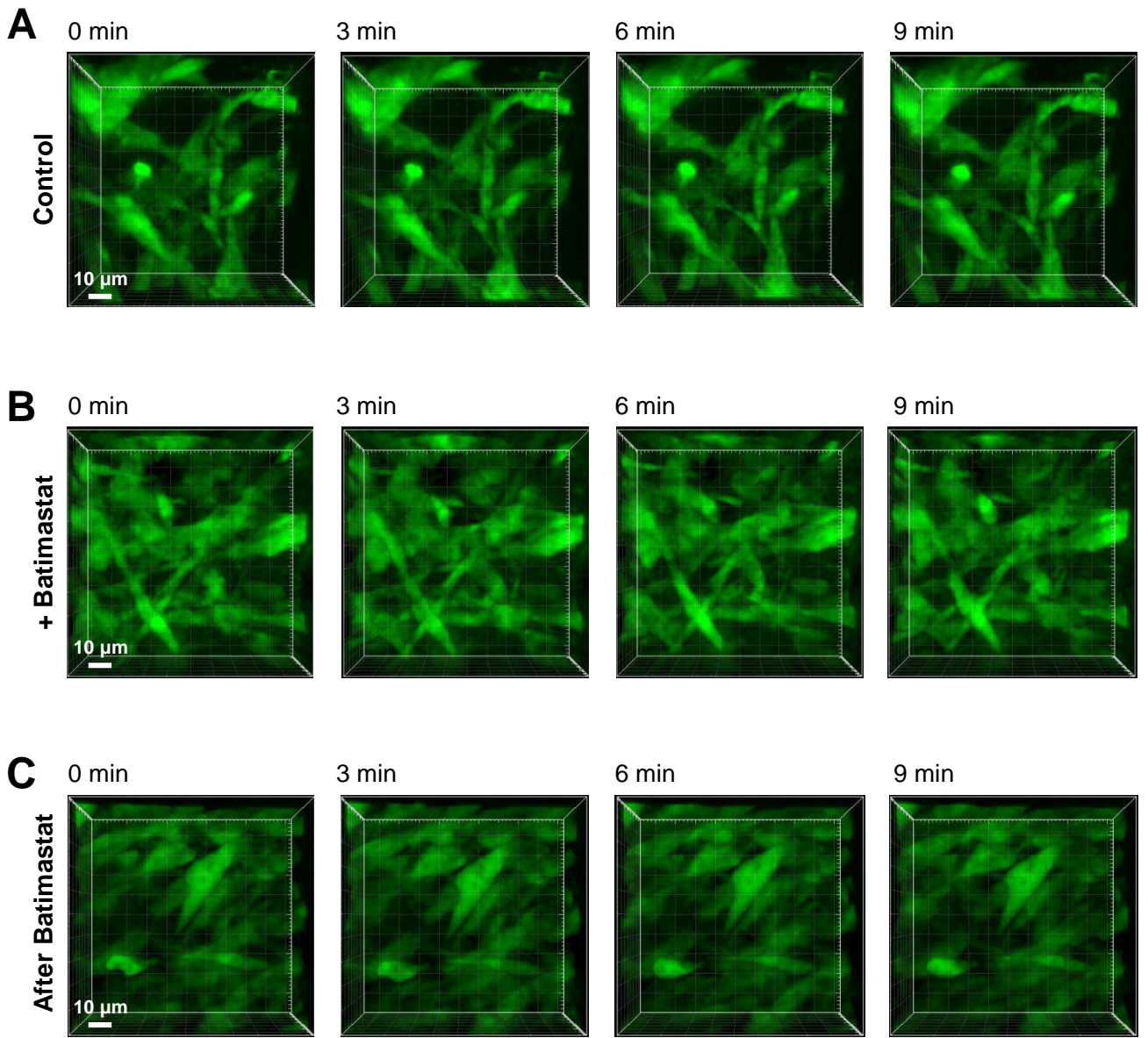


Figure S2



3 Discussion et perspectives

Les résultats *in vivo* obtenus grâce à ce projet sont d'une importance majeure puisqu'ils apportent une première confirmation des données *in vitro* qu'a accumulées l'équipe sur notre thématique principale qui est la migration 3D des macrophages, à savoir la démonstration de l'existence de deux modes migratoires des macrophages *in vivo*. De plus, nos résultats indiquent que la migration mésenchymateuse semble être restreinte aux TAMs, validant ce mode migratoire en tant que cible thérapeutique. Par ailleurs, ce travail a permis la mise au point de nouveaux outils qui permettront à l'équipe d'envisager des études à plus grande pertinence physiologique, notamment sur les effecteurs moléculaires de la migration mésenchymateuse dans divers contextes pathologiques où les macrophages jouent un rôle délétère. Toutefois, il est important de noter qu'il s'agit des tout premiers résultats et donc que de nombreuses questions restent à être considérées qui feront certainement partie de la continuité de ce projet. Dans cette discussion, je propose de traiter ces questions.

Les modes migratoires utilisés par les macrophages *in vivo* correspondent-ils réellement à la migration mésenchymateuse et amiboïde ?

L'observation la plus importante faite au cours de ce projet est l'existence d'au moins deux modes de migration que peuvent adopter les macrophages *in vivo*. Cependant, la question de savoir si ces modes représentent réellement des « versions *in vivo* » de la migration mésenchymateuse et amiboïde se pose. Afin de pouvoir répondre à cette question, il est nécessaire de rappeler les définitions de ces modes de migration. Dans le cas de la migration mésenchymateuse, les caractéristiques principales sont : une morphologie allongée, une dépendance des protéases associée à une dégradation/réorganisation de la matrice, l'absence d'inhibition par les inhibiteurs de la voie Rho/ROCK, une motilité lente par rapport à la migration amiboïde et la mise en place de structures d'adhérence impliquant les intégrines. Nos images par microscopie intravitale montrent clairement que les TAMs prennent une forme très allongée et protrusive au cours de leur migration qui peut être considérée lente comparée aux macrophages dans le derme adjacent. Toutefois, la caractéristique fondamentale de la migration mésenchymateuse que j'ai pu montrer dans ces cellules est la dépendance envers les protéases et la dégradation de la matrice, démontrées grâce aux traitements des souris avec un inhibiteur des MMPs. Nos résultats précédents montrent en effet qu'*in vitro*, les MMPs participent à l'infiltration de macrophages dans certaines matrices denses telle que le collagène I natif (Wiesner et al., 2014). Ils sont

également nécessaires dans l'infiltration de sphéroïdes de tumeur. La migration des TAMs répond donc bien à cette caractéristique majeure de la migration mésenchymateuse : la dépendance aux protéases. Toutefois, plusieurs expériences restent à être réalisées afin d'aboutir à une description plus complète de ce mode migratoire, telles que l'étude de l'implication des intégrines ainsi que celle de la voie de signalisation Rho/ROCK. J'ai décrit les intégrines dans l'introduction bibliographique comme étant des récepteurs majeurs de l'adhérence au cours de la migration et des études sont en cours et en prévision dans l'équipe afin de déterminer leurs rôles dans la migration *in vitro* et *in vivo* des macrophages. Je détaillerai cet aspect dans la discussion générale de ce manuscrit. Enfin, la démonstration que l'inhibition de Rho/ROCK n'induit pas une inhibition de ce mode migratoire serait une preuve importante pour qualifier cette migration de mésenchymateuse. Ceci nous permettrait aussi de démontrer la migration amiboïde dans le tissu sain. En effet, dans nos expériences *in vitro*, l'inhibition de ROCK par la molécule Y-27632 n'a aucun effet inhibiteur sur la migration mésenchymateuse. Au contraire, comme le montrent les résultats du [chapitre I](#), cette inhibition favorise cette migration. Ainsi, un traitement des souris MacBlue avec un inhibiteur *in vivo* de ROCK doit être envisagé, l'hypothèse étant que le traitement n'aurait pas d'impact négatif sur la migration des TAMs, alors qu'il devrait affecter la migration des macrophages dans le derme sain. En effet, bien que ROCK ne soit pas nécessaire pour la migration mésenchymateuse, il est indispensable pour la migration amiboïde. Combinée avec l'observation de leur morphologie arrondie et leur motilité rapide, la démonstration de la dépendance de ces macrophages à ROCK confirmerait qu'il s'agit bel et bien de la migration amiboïde, telle que nous l'avons décrite.

Pour ces raisons, et étant donné que le Y-27632 a déjà été utilisé dans la littérature dans des études *in vivo* (Routhier et al., 2010), j'ai réalisé des premiers essais d'injection de cette molécule dans des souris, suivie d'imagerie intravitale. Je n'ai pour l'instant pas observé d'effet flagrant sur la migration des macrophages, mais en absence de contrôle positif de l'effet du Y-27632 *in vivo*, je n'ai pas pu tirer de conclusion de ces expériences préliminaires. Des mises au point pharmacologiques sont en cours. D'autres inhibiteurs *in vivo* de Rho/ROCK sont également envisagés tels que le Fasudil, utilisé dans de nombreuses études sur l'hypertension (Raja, 2012) et des désordres du système nerveux central (Tan, Zhong, Cheng, & Shen, 2011), entre autres. Des expériences d'incubation de macrophages déposés sur des explants de tumeur avec ces inhibiteurs sont également envisageables.

Quelle est l'implication des MMPs des cellules tumorales ?

L'utilisation du Batimastat n'est pas spécifique en termes des MMPs qu'il cible, mais également en termes des types cellulaires affectés. En plus des macrophages, les cellules tumorales sont également bien décrites pour exprimer des MMPs qui vont participer à plusieurs aspects pro-tumoraux tels que le clivage de facteurs de croissance en leur forme active (par exemple, l'*insulin growth factor*) et par la dégradation de la matrice extracellulaire, favorisant ainsi leur évaison de la tumeur primaire et la formation de métastases (Kessenbrock et al., 2010). De ce fait, il est nécessaire d'envisager la possibilité que ces MMPs libérés par les cellules tumorales participent à la migration des TAMs, et l'inverse peut également se produire. Bien que j'aie pu observer dans les tumeurs induites chez les souris que les cellules tumorales n'étaient que très peu voire pas du tout motiles et ne semblaient en aucun cas affectées par le traitement du Batimastat ni en termes de dynamique, ni en termes de morphologie, il serait nécessaire de prendre en compte les MMPs tumorales. Pour ce faire, des expériences décrites dans le prochain paragraphe pourront également répondre à cette question. Brièvement, en invalidant uniquement les MMPs libérées par les macrophages par des techniques d'interférence par ARN ou de souris mutantes, il sera alors possible de faire la part de la contribution des deux types cellulaires dans l'effet observé du Batimastat.

Quelles sont les protéases impliquées dans la migration des TAMs ?

Jusqu'à présent, mes résultats semblent montrer une implication majeure des MMPs dans la migration des TAMs, leur inhibition faisant diminuer la vitesse de déplacement des cellules toujours motiles de plus de la moitié. La molécule que j'ai utilisée, le Batimastat, est un inhibiteur à large spectre des MMPs puisqu'il contient une structure hydroxamate imitant le collagène qui chélate l'ion zinc dans le site actif des MMPs. Ainsi, sa spécificité est faible donc l'étape suivante serait d'identifier plus précisément quelles MMPs jouent réellement un rôle dans la migration *in vivo* des TAMs. Bien que des études complètes sur l'ensemble des membres de la famille des MMPs soient souhaitables, pour des raisons de logistique, la priorité serait de cibler des MMPs impliquées dans la migration d'autres types cellulaires tels que les cellules tumorales (Deryugina & Quigley, 2006) ou bien des MMPs impliquées dans l'activité dégradative des podosomes dans les macrophages (Wiesner et al., 2013), par exemple MT1-MMP et MMP9. Afin d'y parvenir, plusieurs approches sont envisageables mettant en jeu les modèles 3D *in vivo* développés au cours de ma thèse. Grâce à l'existence de

souris déficientes pour MT1-MMP (Holmbeck et al., 1999) et MMP9 (Robinson, Pisarev, Chavez, Singh, & Talmadge, 2003), des expériences de microscopie intravitale peuvent être envisagées de plusieurs manières. Dans ces souris, les macrophages peuvent être rendus visibles par croisement des souris transgéniques avec des souris MacBlue (une stratégie toutefois très longue, complexe et coûteuse), par injection de dextran ou liposomes couplés à un fluorochrome qui seront ingérés par les macrophages, ou bien par injection de « nanobodies » dirigés spécifiquement contre le récepteur au mannose des macrophages (un marqueur M2 particulièrement utile pour visualiser les TAMs) (Movahedi et al., 2012). L'inconvénient de ces stratégies est que la MMP ciblée sera invalidée non seulement dans les macrophages, mais dans l'ensemble des cellules de l'organisme, ce qui ne résout pas les problèmes évoqués ci-dessus et ne permet pas l'interprétation du rôle des MMPs spécifiques des macrophages. Une autre stratégie envisageable serait la préparation et le marquage de macrophages issus de la moelle osseuse d'une souris invalidée pour une MMP, puis leur transfert adoptif dans une souris sauvage. Le degré d'infiltration de ces macrophages dans une tumeur induite pourra être déterminé par cytométrie en flux et l'observation de leur comportement et de leur motilité au sein de la tumeur pourra être faite par microscopie intravitale. Ces macrophages issus de souris transgéniques peuvent également être utilisés au cours d'expériences d'invasion avec des explants *ex vivo* de tumeurs (ou autres tissus d'intérêt). Ce modèle présente l'avantage de pouvoir travailler avec des macrophages humains, sur lesquels il est envisageable d'utiliser des approches d'interférence ARN dirigés contre des MMPs spécifiques. Ainsi, il sera possible d'identifier plus précisément les MMPs nécessaires à la migration des TAMs *in vivo*.

Il est important de noter que l'inhibition de la migration des TAMs par le Batimastat n'est pas complète. Ceci mène à l'hypothèse de l'implication d'autres protéases dans la dégradation de la matrice extracellulaire de la tumeur, nécessaires pour le déplacement. Les expériences *in vitro* sur les matrices extracellulaires et les sphéroïdes de cellules tumorales ont d'ailleurs permis de démontrer que les MMPs ne sont pas les seules molécules en jeu, puisque leur inhibition seule ne suffit pas à inhiber complètement la migration mésenchymateuse. Parmi les autres protéases impliquées, nous émettons l'hypothèse que les protéases lysosomales puissent également jouer un rôle. En effet, des travaux antérieurs dans l'équipe avaient impliqué les lysosomes dans la biogénèse des podosomes (Cougoule et al., 2005). Les podosomes étant des structures dégradatives, l'équipe avait fait l'hypothèse que le déversement du contenu lysosomal aux podosomes pourrait être responsable de la dégradation de la matrice extracellulaire. De plus, il a été montré que la fusion de vésicules lysosomales

aux podosomes de fibroblastes transformés exprimant v-src était corrélée à la dégradation de la matrice médiée par la cathepsine B (Tu et al., 2008), ce qui appuie cette hypothèse. Dans les macrophages, l'inhibition des cathepsines B, X et S réduit significativement la dégradation de la matrice et la migration des macrophages dans le Matrigel™ (Jevnikar et al., 2012). D'autre part, des données *in vivo* suggèrent que les TAMs peuvent sécréter des cathepsines B et S, cystéine protéases lysosomales, afin de favoriser la croissance tumorale (Gocheva et al., 2010). Ainsi, des inhibiteurs spécifiques des cathepsines JPM-OEt ou VBY-825 (Bell-McGuinn, Garfall, Bogoyo, Hanahan, & Joyce, 2007; Elie et al., 2010; Schurigt et al., 2008) peuvent être utilisés afin d'évaluer leur rôle dans la migration mésenchymateuse des TAMs.

Enfin, nous pouvons également imaginer que l'activité migratoire résiduelle des TAMs en présence de Batimastat soit due à un « *shift* » du mode mésenchymateux au mode amiboïde. En effet, nous observons que les macrophages acquièrent une morphologie très arrondie en présence du Batimastat. Des expériences réalisées *in vivo* en cumulant les inhibiteurs de MMPs et de ROCK devraient nous permettre de valider ou invalider cette hypothèse.

De telles études constitueront une des perspectives de mon projet et permettront d'identifier précisément la ou les protéases impliquées dans la migration mésenchymateuse *in vivo* des macrophages.

Les cellules observées par microscopie intravitale dans les souris MacBlue sont-elles des macrophages ?

Les souris MacBlue que nous avons obtenues grâce au laboratoire de David Hume expriment le fluorochrome ECFP sous la dépendance du promoteur du gène *Csf1r* codant pour le récepteur du M-CSF (Ovchinnikov et al., 2008). Comme je l'ai précisé dans l'[introduction bibliographique](#), le M-CSF est un facteur de croissance essentiel pour la biologie des macrophages puisqu'il participe à la régulation de divers événements tels que leur différenciation, leur croissance et leur recrutement (J. W. Pollard, 2009). Toutefois, le M-CSF est également exprimé par un autre membre du système des phagocytes mononucléés que sont les cellules dendritiques. Ainsi, j'ai dû caractériser les leucocytes qui ont infiltré les tumeurs afin de déterminer s'il s'agissait bien de macrophages. Pour cela, j'ai mis au point un protocole de dissociation du tissu tumoral avec la collagénase, permettant ainsi la récupération des cellules qui ont ensuite pu être identifiées par cytométrie en flux. Grâce à des anticorps

anti-CD45 (antigène commun à tous les leucocytes) et anti-F4/80 (utilisé couramment pour marquer les macrophages), j'ai pu déterminer que près de 85% des leucocytes ayant infiltré la tumeur sont bien des macrophages. Ainsi, on en déduit que les macrophages constituent une des populations cellulaires les plus abondantes dans la tumeur et que la proportion des cellules dendritiques y est très faible.

Il reste toutefois à vérifier avec certitude que les cellules que nous observons dans le derme sain sont bien des macrophages. Deux stratégies expérimentales peuvent être envisagées. Similairement à la tumeur, la digestion enzymatique du derme suivie d'une analyse par cytométrie en flux avec un double marquage CD45 et F4/80 pourraient répondre à cette question et montrer que, comme dans la tumeur, nous avons bien à faire à des macrophages et non pas des cellules dendritiques. De plus, des expériences d'immunohistochimie sur le derme sain et la tumeur nous permettraient d'affiner la caractérisation des populations de macrophages tissulaires observées en microscopie intravitale, en réalisant des co-marquages de F4/80, de marqueurs de l'hétérogénéité des monocytes/macrophages tels que Ly6C, CX3CR1, CCR2, et de marqueurs de la polarisation M1/M2 tels que iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) et le récepteur au mannose (Gordon, 2003). Il serait ainsi intéressant de vérifier que les macrophages au sein de la tumeur soient bien polarisés M2 (confirmant leur statut de TAMs) et de comparer leur phénotype avec les macrophages dans le derme.

Quelle est la pertinence de l'infiltration de macrophages humains sur des tumeurs murines ?

Afin de compléter les résultats de microscopie intravitale, j'ai développé une approche d'invasion de macrophages dans des explants tissulaires *ex vivo* de tumeur. Le principe de ces expériences fut d'étudier la migration de macrophages humains dans un tissu vivant. En effet, la grande majorité des résultats de l'équipe ont été obtenus en utilisant des macrophages primaires humains préparés à partir de *buffy coats*. Ainsi, il a fallu mettre au point une approche expérimentale qui permettrait de répondre à nos questions. L'infiltration de cellules humaines dans des tumeurs induites chez la souris ne présente bien entendu pas de réelle pertinence physiologique. Bien que fonctionnellement similaires, les macrophages humains et murins sont phénotypiquement différents en termes de marqueurs de surface et de réponses aux cytokines et facteurs de croissance (par exemple, le M-CSF humain et le M-CSF murin ne sont pas la même protéine, tout comme leurs récepteurs respectifs). Il n'est donc pas possible

de qualifier de TAMs les macrophages exogènes humains déposés sur les tumeurs de souris puisqu'ils ne peuvent répondre aux facteurs sécrétés par les cellules tumorales. Plutôt, ce modèle a eu pour vocation de remplacer les matrices *in vitro* utilisées jusqu'à présent (dont le Matrigel™ qui est d'ailleurs produite par des sarcomes de souris) par un environnement tissulaire dont le composant cellulaire est bel et bien présent et dont la matrice extracellulaire est physiologiquement pertinente. Nos résultats montrent d'ailleurs que les macrophages humains sont capables d'infiltrer une tumeur murine et que, tout comme les TAMs murins, cette infiltration dépend des MMPs. Toutefois, cette approche n'est qu'une étape, notre perspective à terme étant d'adapter ce modèle à des explants de biopsies de tumeurs humaines lorsqu'une collaboration aura pu être établie avec des cliniciens. Dans ce contexte, nous ciblerons en première intention le cancer du sein. En effet, les macrophages jouent un rôle délétère dans ce cancer (B. Z. Qian et al., 2011), la tumeur formée est caractérisée par une densification du tissu bien caractérisée (Kass et al., 2007; Paszek et al., 2005), et il est relativement aisé de se procurer la contrepartie saine de ce tissu.

La migration de type mésenchymateuse des macrophages est-elle spécifique aux tumeurs ?

S'il s'avère que cette migration est en effet spécifique du microenvironnement tumoral, elle représenterait ainsi une cible thérapeutique visant à diminuer l'infiltration de macrophages dans la tumeur. Toutefois, il est actuellement impossible de répondre à cette question et ceci nécessitera des études supplémentaires en perspective. Deux hypothèses peuvent être formulées : 1) le mode mésenchymateux *in vivo* des macrophages nécessite la sécrétion de facteurs jusqu'à présent non-identifiés par les cellules tumorales afin de mettre en place cette migration ; 2) le mode mésenchymateux *in vivo* des macrophages dépend des propriétés mécaniques du tissu, comme les modèles *in vitro* l'ont démontré, et pourrait avoir lieu dans n'importe quel tissu, sain ou pathologique. Afin de déterminer laquelle de ces deux hypothèses est la bonne, des expériences sur plusieurs tissus différents devront être réalisées afin d'établir une cartographie du choix du mode migratoire en fonction des propriétés physiques du tissu. Dans le modèle de microscopie intravitale, il est possible d'injecter différents types de cellules tumorales, permettant d'induire différents types de tumeurs ayant des propriétés mécaniques qui leur sont propres. Par exemple, nous avons pu constater que les tumeurs obtenues par injection de cellules tumorales LLC (*Lewis lung carcinoma*) sont macroscopiquement plus molles que les fibrosarcomes induites par les cellules LPB (plus de

détails dans le [chapitre 3](#)). Il serait alors intéressant de déterminer si une migration protéase-dépendante (avec des possibilités d'implication de protéases différentes selon la tumeur) peut être observée dans tous les modèles tumoraux, ou bien seulement dans certains. D'autres modèles de pathologies peuvent également être envisagés. Dans cette étude, il serait également important de pouvoir imager divers tissus sains ayant des propriétés biomécaniques distinctes tels que le foie, le cerveau, etc... Cependant, la microscopie intravitale est limitée en termes des organes qui peuvent être imagés (discutés dans le prochain paragraphe). Toutefois, il est possible de préparer des explants tissulaires à partir de différents tissus tumoraux ou sains et de caractériser l'infiltration de macrophages. En plus de cela, les propriétés mécaniques de ces explants pourront être déterminées et être corrélées avec le mode migratoire des macrophages observé. Cette perspective sera abordée plus en détail dans la discussion générale.

Quelles sont les limites de ces techniques ?

Les avantages de la microscopie intravitale sont évidents, principalement la visualisation en temps réel d'événements cellulaires à très haute résolution. Elle permet l'observation directe de processus cellulaires dynamiques à un grossissement suffisant pour distinguer des mécanismes à l'échelle non seulement cellulaire, mais parfois moléculaire. Toutefois, elle possède de nombreuses limites. Une des plus grandes difficultés dans les études *in vivo* est la disponibilité des outils. L'observation des phénomènes tissulaires fut longtemps limitée à des tissus superficiels grâce au développement des chambres dorsales. Ainsi, seules des tumeurs induites de façon sous-cutanée ont pu être étudiées, un modèle controversé eu égard à la physiologie tumorale, notamment en termes de capacités métastatiques, de sensibilité aux drogues et d'angiogenèse (les xénogreffes de tumeurs sont dans certains cas faiblement vascularisées). Aussi, du fait de l'espace limité à l'intérieur de la chambre dorsale, la tumeur pourrait avoir plus de mal à se développer et devenir apoptotique. Ainsi, de nombreux outils sont apparus permettant l'étude de véritables tumeurs autres que sous-cutanées. La fenêtre crânienne permet l'observation de tumeurs cérébrales (glioblastomes) (Holtmaat et al., 2009; Kienast et al., 2010), la fenêtre mammaire permet l'observation de tumeurs mammaires (Kedrin et al., 2008) et enfin, la fenêtre abdominale permet l'imagerie de tissus profonds au-delà de la paroi abdominale tels que les organes du système gastro-intestinal (par exemple, le foie et le pancréas) (Ritsma et al., 2012). Ainsi, l'utilisation de tels systèmes serait tout à fait envisageable afin de caractériser la migration de

macrophages dans des tissus réels sains ou tumoraux et représente une des perspectives de ce projet.

Une autre limite à laquelle j'ai dû me confronter repose sur le manque de contrôle sur certains paramètres de l'expérience. Avec des modèles *in vitro*, le nombre de cellules utilisées est contrôlé et déterminé par l'expérimentateur. En revanche, dans le modèle *in vivo*, aucun contrôle sur l'infiltration des macrophages dans la tumeur n'est possible. Ainsi, le nombre très élevé de cellules présentes sur les acquisitions complique grandement les analyses. En effet, les fonctions de *tracking* automatisé du logiciel utilisé, Imaris, sont rendues inutilisables car elles n'arrivent pas à dissocier la fluorescence d'une cellule à celle d'une cellule adjacente et ainsi ne peuvent la suivre de façon fiable, plus spécialement lorsque les macrophages ont un phénotype protrusif et sont enchevêtrés les uns dans les autres. Pour cette raison, un suivi manuel des cellules s'est avéré nécessaire, une démarche qui peut être particulièrement longue. Des stratégies ont toutefois été tentées, sans succès, pour réduire l'infiltration des macrophages dans la tumeur afin de faciliter l'analyse, telles que des injections d'anti-inflammatoires et des cinétiques d'induction tumorale plus courtes ou plus longues.

Pour finir, une dernière limite de ces techniques est la courte durée d'expérimentation possible. Dans le cas de la microscopie intravivante, la pose de la chambre dorsale engendre un inconfort pour la souris qui va tenter de la retirer. Pour cette raison, il n'est pas possible de garder une chambre sur une souris au-delà de deux semaines sans qu'elle soit démontée, mettant ainsi fin à l'expérience. Des études de longue durée avec des traitements chroniques ne sont pas envisageables.

La mise au point des explants tissulaires *ex vivo* a également représenté un défi au cours de ma thèse. Je ne développerai pas ici l'ensemble des expériences infructueuses que j'ai dû réaliser avant d'aboutir à un modèle d'étude exploitable. La plus grande difficulté est le maintien en vie des coupes au cours de la période d'expérimentation. Ainsi, les conditions optimales de culture (milieu nutritif, température, oxygénation...) doivent être déterminées afin que le tissu n'entre pas en nécrose. Malgré ces précautions, il est difficile de maintenir le tissu pour plus de quelques jours, limitant alors la durée de l'expérimentation, notamment lors de l'étude d'événements lents tels que la migration mésenchymateuse des macrophages.

Malgré ces limites, j'ai été en mesure de distinguer des comportements différents des macrophages dans les tissus vivants. Ces premiers résultats ouvrent la voie à de nombreuses études visant à obtenir une caractérisation plus approfondie des modes migratoires des

macrophages, que j'ai décrites tout au long de cette partie. Le développement de ces techniques va également permettre à l'équipe d'envisager de nouveaux projets tout en apportant une nouvelle perspective aux projets déjà existants, que je discuterai dans la discussion générale de ce manuscrit.

Chapitre 3

Résultats supplémentaires

Je souhaite, avant de discuter l'ensemble des résultats présentés dans ce manuscrit, ajouter cette partie dans laquelle des résultats supplémentaires seront inclus. Ici, je parlerai d'observations que j'ai pu faire lors de mes expériences de microscopie intravitale, ainsi que les premières expériences d'étude des propriétés biomécaniques des explants tissulaires, en collaboration avec des physiciens de l'Institut de Mécanique des Fluides de Toulouse.

1 Observation de migration orientée par microscopie intravitale

Les acquisitions de microscopie intravitale effectuées sur le derme de souris avec une chambre dorsale m'ont permis de faire des observations supplémentaires quant à la migration des macrophages. Bien qu'il fût souvent difficile d'attribuer une notion d'orientation dans le mouvement des macrophages au cours de mes expériences, étant donné qu'ils semblent changer de direction à plusieurs reprises au cours des acquisitions, j'ai pu observer certains cas où les cellules semblaient migrer en suivant un parcours.

Dans le cas de macrophages dans le derme sain en absence d'une tumeur, nous avons vu dans le chapitre précédent qu'ils avaient une migration associée à une morphologie ronde et une vitesse rapide (par rapport aux TAMs plus lents), leur permettant ainsi de parcourir de plus grandes distances. Notre hypothèse est qu'ils utilisent une migration de type amiboïde, ne nécessitant pas de dégradation de la matrice et permettant aux cellules de se faufiler rapidement entre les mailles de la matrice extracellulaire, comme c'est le cas *in vitro* (Van

Goethem et al., 2010). Nous avons donc voulu observer l'influence de l'organisation de la matrice extracellulaire dans la migration des macrophages. La génération de seconde harmonique au cours de la microscopie bi-photonique intravitale peut être exploitée pour visualiser certaines organisations fibrillaires de la matrice extracellulaire telles que les fibres de collagène de type I. Ceci a révélé la présence de différentes organisations de collagène dans le derme, avec des zones sans aucune organisation particulière et d'autres zones dans lesquelles les fibres sont parfaitement droites et alignées les unes par rapport aux autres. Dans les zones désorganisées, les macrophages migrent sans aucune orientation apparente, avec une migration que l'on pourrait qualifier d'aléatoire (**figure 33A**). En revanche, dans les zones d'alignement des fibres de collagène, nous avons pu observer que les macrophages pouvaient migrer le long de ces fibres, faisant d'elles en quelques sortes des « autoroutes » cellulaires (**figure 33B**). De plus, nous avons également pu observer des macrophages (dans le derme) migrant le long de la paroi des vaisseaux sanguins (visibles par injection intraveineuse de dextran-Rhodamine) (**figure 34**). Il est probable que ces macrophages se trouvent dans la couche la plus externe des vaisseaux, c'est-à-dire la couche adventice essentiellement composée de collagène.

Ces observations soulèvent la question de savoir s'il s'agit bien d'une migration de type amiboïde. En effet, la capacité d'une cellule à migrer le long de fibres nécessiterait la mise en place d'attachement avec les protéines matricielles, mettant en jeu des adhérences. Or ce type de mécanisme est plutôt observé au cours de la migration mésenchymateuse, les adhérences impliquées dans la migration amiboïde étant faibles. Toutefois, les cellules n'adoptent pas une morphologie aussi allongée et protrusive que celle observée pour les TAMs. Une hypothèse serait l'existence d'un mode migratoire intermédiaire entre les deux modes principaux pouvant dépendre à la fois de la formation d'attachements avec la matrice extracellulaire et de la voie Rho/ROCK. Des résultats de l'équipe montrent en effet que dans une matrice *in vitro* de collagène I avec une concentration intermédiaire entre celles utilisées pour le collagène I fibrillaire (induisant la migration amiboïde) et le collagène I gélatineux (induisant la migration mésenchymateuse), la migration des macrophages ne peut être complètement inhibée qu'avec l'utilisation simultanée des inhibiteurs des deux modes migratoires, suggérant soit que les deux modes migratoires coexistent, soit qu'un mode migratoire mixte existe (Guiet et al., 2011). Cependant, comme je l'ai précisé dans le chapitre précédent, d'autres études seront nécessaires afin de mieux caractériser les modes migratoires *in vivo* des macrophages, et ainsi vérifier l'existence de types de migrations autres que mésenchymateux et amiboïde. De plus, nous ne savons pas encore si la présence des fibres

alignées n'est qu'un artefact dû à l'étirement de la peau exercé par la chambre dorsale, ou bien s'il s'agit de structures physiologiques mises en place par les cellules pour faciliter leur migration.

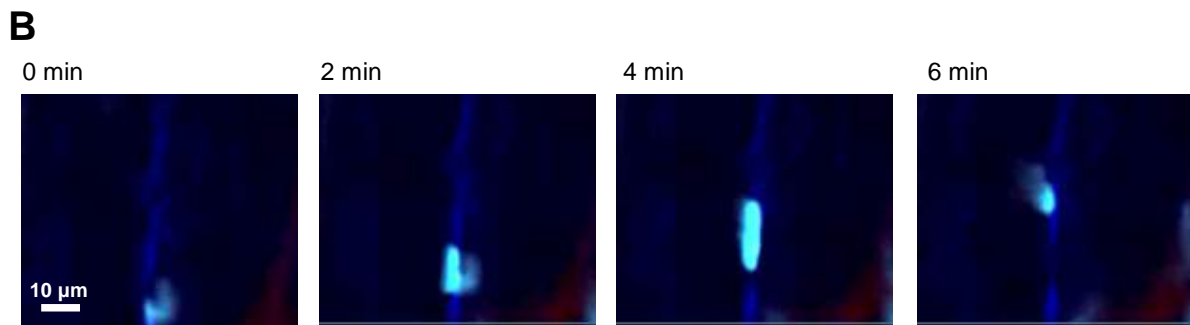
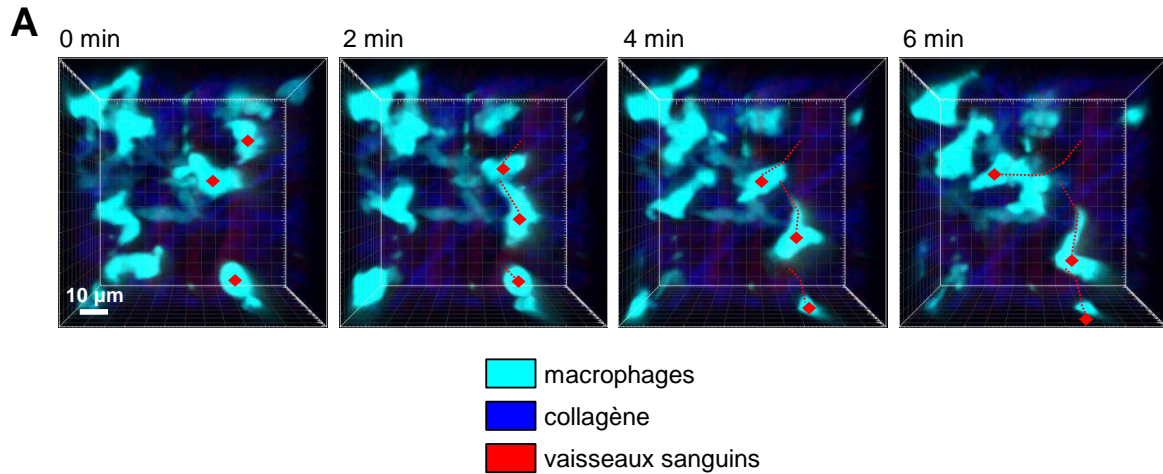


Figure 33 : Migration des macrophages le long des fibres de collagène. Des chambres d'observation dorsale ont été installées sur des souris MacBlue et les macrophages (bleu clair) dans le derme ont été visualisés par microscopie intravital. Les fibres de collagène I (bleu foncé) sont rendues visibles par la génération de seconde harmonique. Les vaisseaux sanguins (rouge) ont été marqués par injection intraveineuse de dextran-Rhodamine. (A) Dynamique de macrophages dans le derme dans une zone sans organisation particulière du collagène. Les parcours des macrophages ont été inclus en rouges. Les images sont séparées de 2 min. (B) Dynamique d'un macrophage dans le derme en cours de migration sur une fibre de collagène alignée. Les images sont séparées de 2 min.

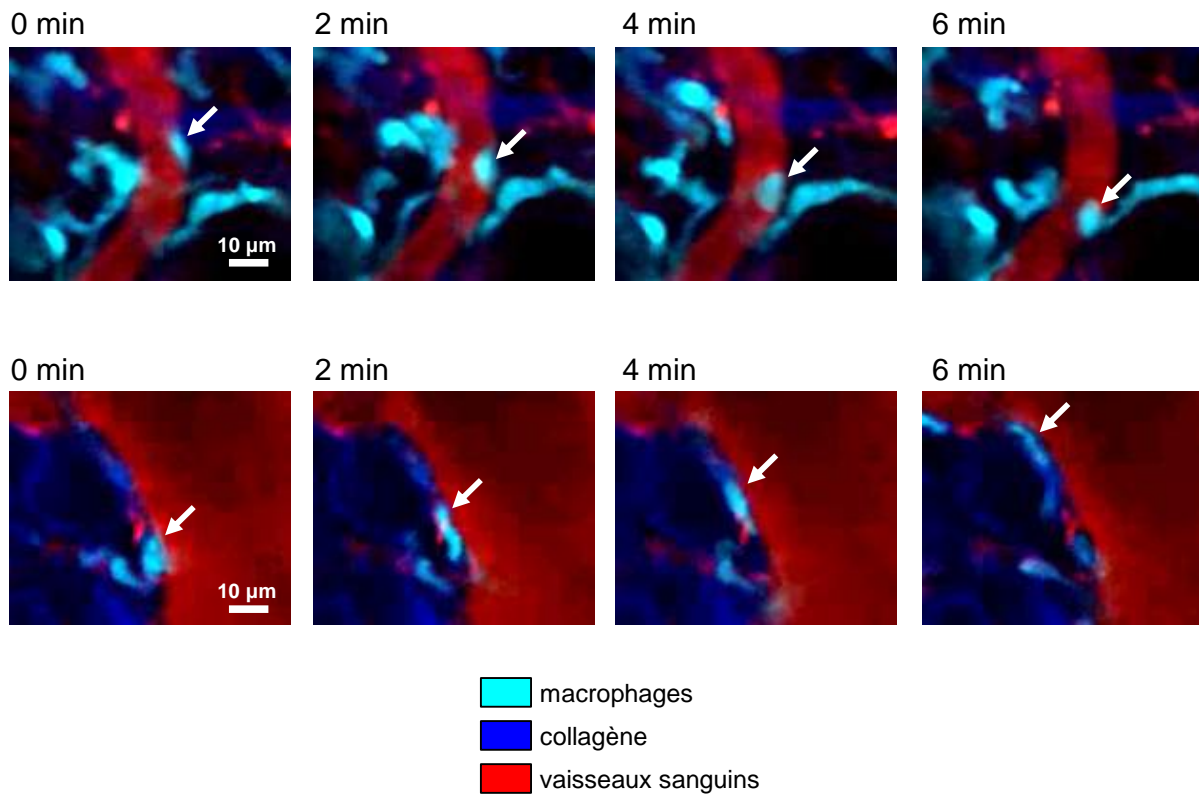


Figure 34 : Migration des macrophages le long des vaisseaux sanguins. Des chambres d'observation dorsale ont été installées sur des souris MacBlue et les macrophages (bleu clair) dans le derme ont été visualisés par microscopie intravitale. Les fibres de collagène I (bleu foncé) sont rendues visibles par la génération de seconde harmonique. Les vaisseaux sanguins (rouge) ont été marqués par injection intraveineuse de dextran-Rhodamine. Les images montrent la dynamique de macrophages (flèche blanche) dans le derme migrant le long d'un vaisseau sanguin. Les images sont séparées de 2 min.

Dans la tumeur, nous avons également pu observer une migration des TAMs qui donne l'impression de suivre un parcours tracé. En effet, les TAMs, plus lents que les macrophages dans le derme sain, semblent effectuer des mouvements de va-et-vient tout en avançant petit à petit dans le tissu (données non présentées). Deux hypothèses pourraient expliquer l'existence de ces mouvements.

Nous avons montré dans le chapitre précédent que les TAMs utilisent un mode de migration de type mésoenchymateux, nécessitant l'activité des MMPs. Cette activité protéolytique sous-entend une nécessité de dégrader la matrice extracellulaire afin de générer des tunnels à l'intérieur du tissu tumoral, permettant ainsi aux cellules d'avancer. Nos expériences précédentes dans les matrices *in vitro* et les sphéroïdes de tumeur montrent que les macrophages sont capables d'effectuer des mouvements de va-et-vient à l'intérieur des tunnels qu'ils ont formés eux-mêmes ou que des macrophages voisins ont formés (Guiet et al., 2011; Van Goethem et al., 2011). Une situation similaire pourrait donc se produire dans une

tumeur *in vivo*, toutefois l'observation en direct de tunnels s'avère difficile à l'intérieur d'un tissu tumoral, à cause du manque de pouvoir résolutif de la génération de seconde harmonique.

Une deuxième hypothèse pour expliquer la migration « sur rails » de certains TAMs repose sur leur interaction avec les cellules tumorales. En effet, en plus de participer au remodelage de la matrice extracellulaire (favorisant la néo-angiogenèse et facilitant l'évasion des cellules tumorales), les TAMs mettent en place des interactions avec les cellules tumorales qui vont favoriser leur survie mutuelle. Par exemple, les TAMs sécrètent des facteurs tels que l'EGF qui contribuent à la survie et à la migration des cellules tumorales. En retour, celles-ci sécrètent du M-CSF nécessaire pour les TAMs, établissant alors une boucle paracrine entre les deux types cellulaires (Goswami et al., 2005). Nous avons pu observer, au cours de nos expériences, des macrophages migrant le long d'une cellule tumorale dans un mouvement de va-et-vient ([figure 35](#)). Ce mouvement pourrait donc être expliqué par des interactions continues avec les cellules tumorales, permettant ainsi d'assurer une proximité suffisante pour mettre en place cette boucle paracrine. Il serait intéressant de caractériser ce type de mouvement qui impliquerait non pas des contacts entre la cellule et la matrice mais des contacts entre cellules.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats supplémentaires montrent que les macrophages *in vivo* adoptent différents comportements migratoires en fonction de leur situation. Même si les modes amiboïde et mésenchymateux décrits dans le [chapitre 2](#) concernent une grande majorité des macrophages recrutés dans les tissus, d'autres migrations seraient observables dans les tissus vivants.

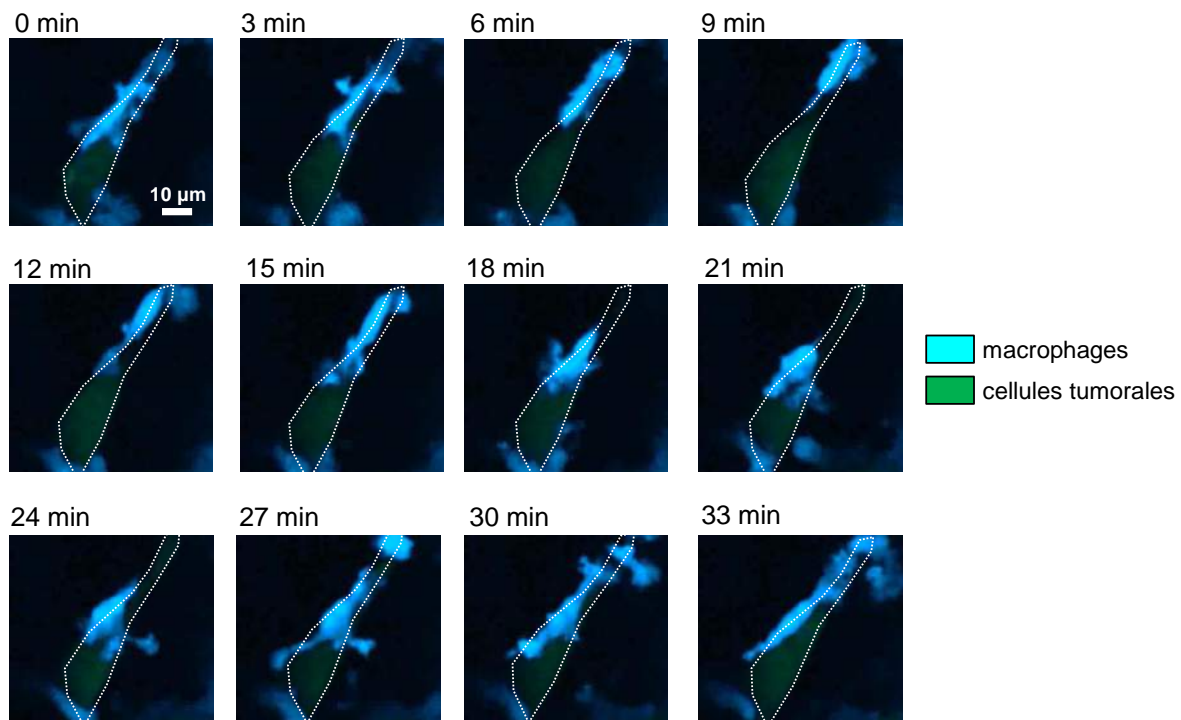


Figure 35 : Migration d'un macrophage le long d'une cellule tumorale. Des chambres d'observation dorsale ont été installées sur des souris MacBlue et une tumeur fut induite par injection de cellules tumorales LPB-GFP. Les images montrent la dynamique d'un macrophage (bleu clair) migrant le long d'une cellule tumorale (vert, délimitée par des traits blancs) en effectuant un mouvement de va-et-vient. Les images sont séparées de 3 min.

2 Mesures de la perméabilité des explants tissulaires

Un projet que j'ai initié au cours de ma thèse est la mise en relation du mode migratoire des macrophages dans les tissus et les propriétés biomécaniques de ces tissus, en utilisant le modèle d'explants tissulaires *ex vivo* décrit dans le [chapitre 2](#). À terme, l'objectif de l'équipe est d'établir une « cartographie » du mode migratoire des macrophages dans des tissus différents. Ces expériences seront couplées à des mesures des propriétés biomécaniques de ces tissus sains et pathologiques. Ce projet est réalisé en collaboration avec Pascal Swider de l'Institut de Mécanique des Fluides de Toulouse.

Les premières expériences de mesures biomécaniques ont consisté à comparer deux tumeurs sous-cutanées induites: la tumeur de fibrosarcome LPB utilisée lors des expériences du [chapitre 2](#) et la tumeur LLC, macroscopiquement plus molle. Ces mesures seront ensuite corrélées avec la détermination du mode migratoire utilisé par les macrophages pour infiltrer ces explants de tumeur. Nous avons prévu de mesurer et de comparer divers paramètres de ces tissus, à savoir des paramètres de transport (la porosité et la perméabilité) et des paramètres viscoélastiques (la rigidité/raideur et l'amortissement). Ainsi, au cours de ma thèse, j'ai pu

participer à l'adaptation de nos explants tissulaires au système expérimental conçu par les médecins pour mesurer la perméabilité d'un milieu. Les prochains paragraphes seront consacrés à la description de ce système et des premiers résultats obtenus.

La perméabilité d'un matériau ou d'un milieu représente sa capacité à se laisser traverser par un fluide de référence sous l'effet d'un gradient de pression. La loi qui régit cette propriété physique est la loi de Darcy, qui exprime le débit d'un fluide qui s'écoule au travers d'un milieu poreux (Dullien, 1992). La circulation de ce fluide entre deux points est déterminée par la perméabilité du substrat et par la différence de pression du fluide entre ces deux points. La [figure 36A](#) représente l'équation de la loi de Darcy, mettant en jeu le débit du fluide, sa viscosité, la différence de pression et la perméabilité. La perméabilité effective représente la perméabilité du matériau, ajustée avec la viscosité du fluide qui le traverse. Dans le cas de nos échantillons biologiques, d'autres paramètres doivent être considérés, à savoir l'épaisseur de l'échantillon et sa surface. Ainsi, la loi de Darcy peut être réécrite telle qu'elle est présentée dans la [figure 36B](#). Étant donné que le fluide utilisé pour nos mesures est l'eau, dont la viscosité est de 1 mPa.s (à 20°C), la perméabilité effective et la perméabilité sont égales. Parmi les paramètres requis pour calculer la perméabilité dans l'équation 4B, seule la différence de pression est inconnue et doit donc être mesurée expérimentalement.

Le dispositif expérimental a été conçu par Pascal Swider ([figure 36C](#)) (Accadbled, Ambard, de Gauzy, & Swider, 2008). Il est constitué d'une chambre cylindrique étanche dans laquelle est placé l'explant tissulaire à mesurer ([figure 36D](#)). Un pousse-seringue relié à la chambre fournit ensuite un débit constant de fluide (du PBS dans notre cas). L'explant tissulaire va former une barrière contre le passage du fluide, ce qui résulte en une augmentation de la pression en amont. Cette pression, mesurée à l'aide d'un capteur et enregistrée au cours du temps grâce à un logiciel, augmente jusqu'à atteindre un plateau, appelé le régime permanent. Il correspond à un état d'équilibre où le fluide a rempli tous les pores du tissu et où le débit en aval a atteint son maximum. La différence de pression à déterminer pour calculer la perméabilité correspond à la différence entre la pression en amont et en aval de l'explant tissulaire. La pression en amont correspond à la pression mesurée lorsque le régime permanent est atteint, alors que la pression en aval correspond à la pression atmosphérique. Ces deux valeurs étant connues, il est donc possible de calculer la différence de pression, et donc de calculer la perméabilité du tissu grâce à la loi de Darcy.

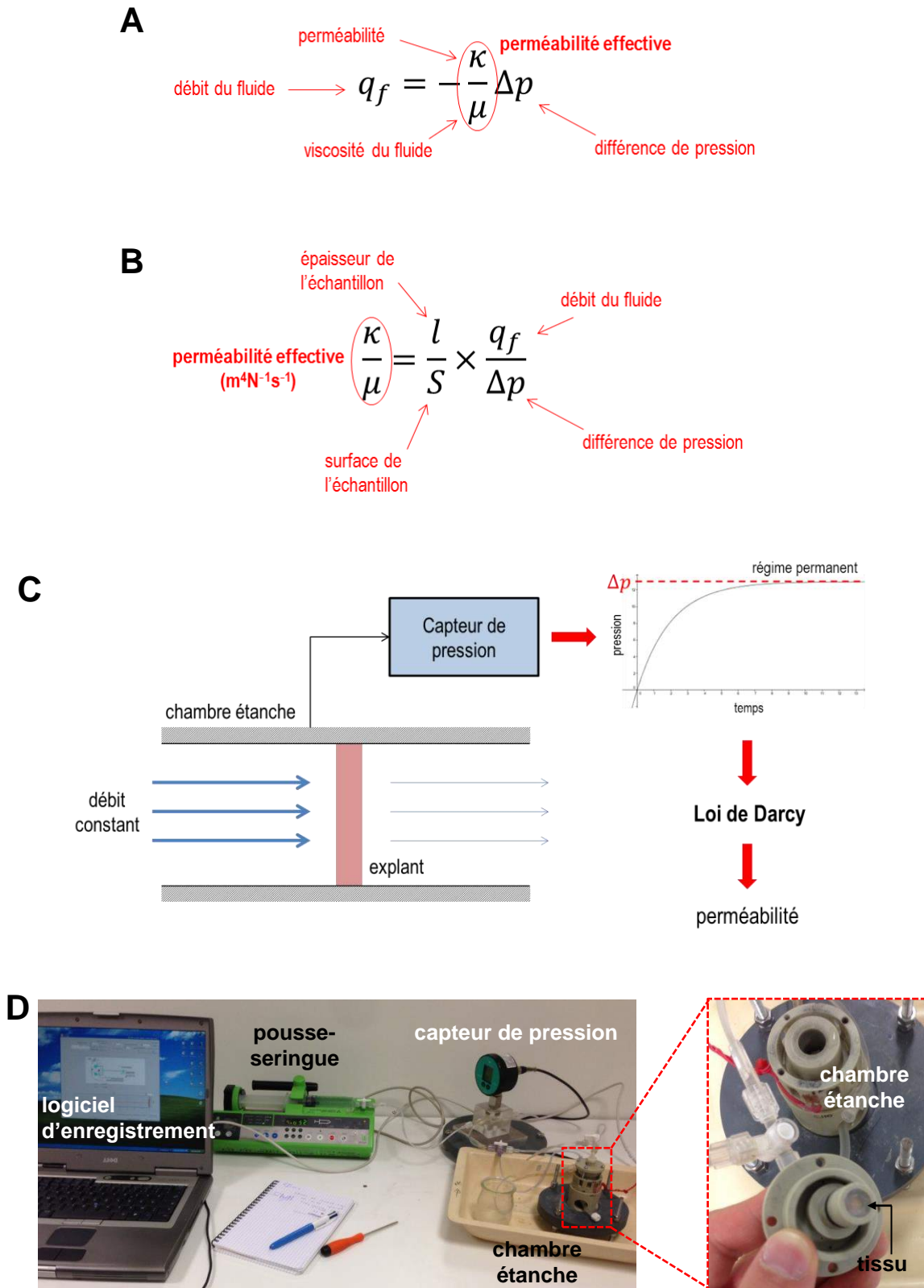


Figure 36 : La loi de Darcy et le dispositif expérimental de mesure de perméabilité

Plusieurs mises au point ont été nécessaires pour adapter nos explants tissulaires au dispositif conçu. Ceci a consisté à s'assurer que le tissu soit maintenu immobile au cours de la

durée de l'expérience. En effet, la fragilité et la mollesse des explants (d'une épaisseur calibrée de 1 mm) peut compromettre l'étanchéité du dispositif et donc fausser les résultats. De plus, un débit de fluide assez faible doit être appliqué afin de ne pas abîmer le tissu et provoquer des déchirements, ce qui fausserait également les résultats. Appliquer un débit faible a pour conséquence des temps d'expérimentation très longs (plusieurs heures), nécessaires pour atteindre le régime permanent. Malgré ces précautions, le régime permanent n'est pas toujours atteint. Toutefois, le système peut être considéré comme étant du premier ordre, conduisant donc à une forme exponentielle de décroissance. En effet, grâce à la forme de la courbe de pression obtenue, il fut possible d'interpoler les nuages de points mesurés afin d'obtenir une équation de décroissance de la perméabilité. Il semblerait que la décroissance temporelle de la perméabilité avant l'établissement du régime permanent soit régie par une loi de type exponentiel, dont l'équation est la suivante :

$$y = a (b + e^{-cx})$$

Jusqu'à présent, seules des mesures de tissus sur la tumeur LLC ont pu être réalisées avec succès. La [figure 37A](#) représente les mesures de différences de pression obtenues sur trois explants de tumeur LLC. Comme le montrent les graphes, le régime permanent ne fut atteint que dans le cas d'un échantillon, alors que dans les deux autres cas, il n'est pas atteint mais peut être interpolé. La [figure 37B](#) montre les perméabilités obtenues suite à l'interpolation avec l'équation ci-dessus et le calcul avec la loi de Darcy. Nous obtenons ainsi des valeurs de perméabilité pour la tumeur LLC de $5 \text{ à } 8 \times 10^{-13} \text{ m}^4\text{N}^{-1}\text{s}^{-1}$. En absence des mesures sur la tumeur LPB et afin de mieux pouvoir interpréter ces valeurs, nous avons mesuré la perméabilité de nos matrices extracellulaires *in vitro* en utilisant le même dispositif expérimental. Bien que des difficultés techniques nous aient empêchés de réaliser des mesures fiables sur le collagène I fibrillaire, nous avons pu déterminer la perméabilité du Matrigel™ et du collagène I gélatineux. La [figure 38](#) représente une comparaison des premiers résultats obtenus jusqu'à présent. Ainsi, la tumeur LLC serait un environnement plus perméable que les matrices extracellulaires induisant la migration mésenchymateuse des macrophages *in vitro*.

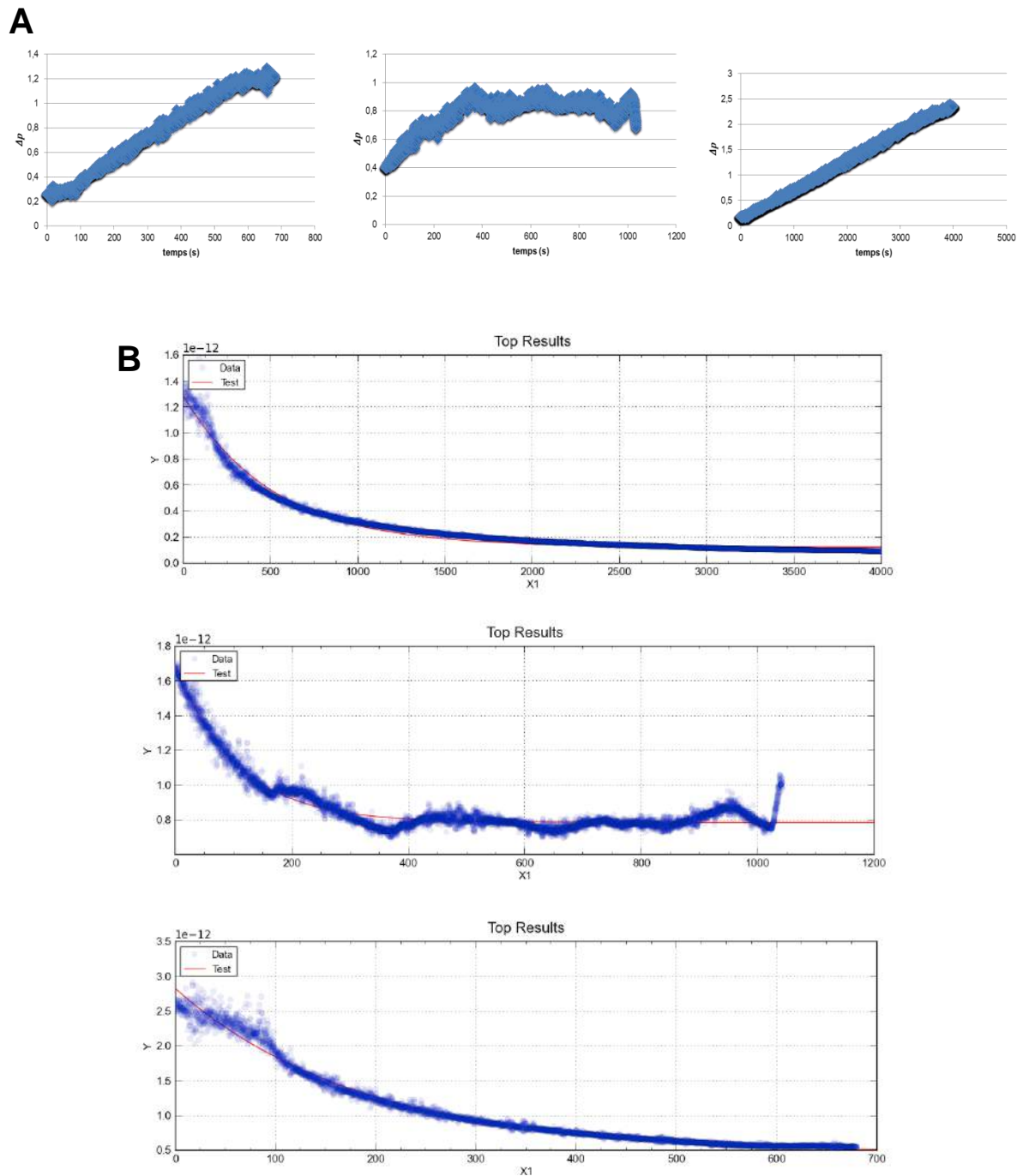


Figure 37 : Résultats expérimentaux de mesure de perméabilité de la tumeur LLC. (A) Courbes de mesures de différences de pression obtenues sur trois explants de tumeur LLC. (B) Courbes de perméabilité interpolées et calculées à partir des différences de pression mesurées en (A).

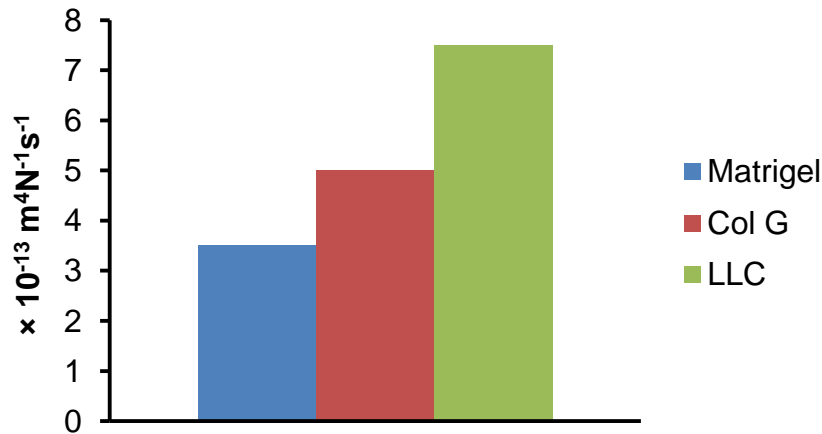


Figure 38 : Résultats expérimentaux de mesure de perméabilité du Matrigel™, du collagène gélatineux et de la tumeur LLC

Pour conclure cette partie, les expériences de mise au point que j'ai réalisées en collaboration avec les physiciens de l'Institut de Mécanique des Fluides de Toulouse ont permis d'obtenir les tout premiers résultats de mesures des propriétés biomécaniques des explants tissulaires. L'équipe pourra ainsi continuer ces mesures avec les protocoles établis sur d'autres tissus d'intérêt, notamment la tumeur LPB, et en association avec les résultats de migration des macrophages dans ces tissus, il sera possible de corréler la perméabilité de l'environnement tissulaire avec le mode migratoire des macrophages. A termes, d'autres mesures biomécaniques seront réalisées sur ces tissus (porosité, raideur, amortissement) permettant ainsi de déterminer sur l'ensemble des propriétés physiques des tissus, celles qui influencent la migration des macrophages. Ceci sera discuté davantage dans la discussion générale.

Discussion générale et perspectives

Les travaux effectués au cours de ma thèse ont permis à l'équipe de mieux comprendre la migration 3D des macrophages, d'une part en élucidant un nouveau mécanisme dans sa mise en place, et d'autre part en montrant l'existence du mode mésenchymateux dans un contexte *in vivo*, validant ainsi en partie les résultats *in vitro*. Une grande partie de mon travail de thèse a été consacrée au développement des modèles *in vivo* et *ex vivo*.

L'apport des études que j'ai réalisées peut être apprécié de deux points de vue. Premièrement, les résultats publiés à ce jour sur l'infiltration tissulaire *in vivo* des macrophages ont été basés sur des expériences de quantification globale. Ces expériences consistent en l'invalidation d'un effecteur d'intérêt de la migration des macrophages par voie pharmacologique ou transgénique, puis l'infiltration est évaluée par résection d'un tissu pathologique (par exemple, une inflammation ou une tumeur induite) et par quantification des macrophages infiltrés avec des techniques d'immunohistochimie ou de cytométrie en flux. D'autres approches sur l'animal vivant consistent à imager les macrophages marqués à l'échelle de l'organe (Movahedi et al., 2012). Quelques études montrent des macrophages tissulaires avec une résolution suffisante pour apprécier la morphologie des cellules (Davis & Ramakrishnan, 2009), mais ces études restent rares. Ces expériences présentent deux limites : 1) l'effecteur invalidé peut affecter d'autres types cellulaires lorsqu'il est pas invalidé spécifiquement dans les macrophages ou alors affecter des processus en amont de la migration tissulaire des macrophages (voir la discussion du [chapitre 1 des résultats](#)), rendant difficile l'interprétation de l'implication de cet effecteur dans ce processus, et 2) les analyses par immunohistochimie ou cytométrie en flux fournissent très peu voire aucune information sur des paramètres fondamentaux de la migration que sont la morphologie cellulaire et leur vitesse de déplacement. Ainsi, mon travail de thèse apporte une nouvelle perspective à l'étude de la migration des macrophages, à savoir l'observation de leur dynamique à l'intérieur des

tissus vivants, avec une résolution suffisamment élevée pour distinguer des changements de morphologie. Ces paramètres sont essentiels pour caractériser sans ambiguïté la véritable implication des effecteurs testés et permettent ainsi de déterminer avec certitude le mode migratoire *in vivo* utilisé par les macrophages. Ceci nous a menés à l'identification d'une migration de type mésenchymateux utilisés par les TAMs dans un fibrosarcome. Donc, le deuxième apport de mes travaux est une première validation d'une nouvelle stratégie thérapeutique pour cibler spécifiquement l'infiltration délétère des macrophages dans la tumeur. En effet, la plupart des stratégies actuellement envisagées (détaillées dans le [chapitre 2 de l'introduction bibliographique](#)) ciblent l'ensemble des macrophages, sans discriminer les sous-populations bénéfiques et délétères. Ceci pourrait mener à une plus grande susceptibilité aux infections. S'il s'avère que la migration protéase-dépendante des macrophages est spécifique aux pathologies impliquant une infiltration de macrophages et une densification du tissu, comme c'est le cas dans la tumeur, ce mode migratoire permettrait des traitements plus spécifiques, sans perturber les sous-populations non-pathologiques.

Ce projet ouvre à de nombreuses perspectives pour avancer dans la compréhension de la migration tissulaire des macrophages. Je ne reviendrai pas ici sur les perspectives que j'ai déjà développées dans les chapitres précédents. Par contre, je vais ici remettre mon projet en perspective par rapport aux collaborations établies avec les physiciens et les biomécaniciens et par rapport aux autres thématiques de recherche développées dans l'équipe.

Corrélations entre les propriétés biophysiques et biomécaniques des tissus et les modes de migration des macrophages

Une des perspectives les plus innovantes de mon travail de thèse et de l'équipe est la suite des analyses des propriétés biomécaniques des tissus. Cela permettra d'une part de déterminer les modifications biomécaniques subies par les tissus au cours d'une pathologie, et d'autre part d'établir la corrélation entre les propriétés physiques des tissus et le mode migratoire des macrophages. Ce projet est rendu possible grâce au développement du modèle d'explants tissulaires que j'ai effectué, qui permet non seulement d'étudier l'infiltration des macrophages dans les divers tissus d'intérêt, sains ou pathologiques, mais aussi de réaliser les analyses biomécaniques nécessaires, grâce à l'expertise et les outils des physiciens avec qui nous collaborons.

J'ai décrit dans le chapitre précédent les mises au point que j'ai réalisées afin de pouvoir mesurer la perméabilité des tissus et des matrices extracellulaires *in vitro*, grâce au dispositif expérimental de mesure de différences de pression. Ceci m'a permis non seulement de définir un protocole fonctionnel pour la suite des mesures, mais également d'obtenir les premiers résultats biomécaniques sur un tissu tumoral. Il s'agit à présent de poursuivre ces analyses sur d'autres tissus. En première intention, la perméabilité de la tumeur LPB sera mesurée afin de comparer ses propriétés avec celles que j'ai mesurées sur la tumeur LLC. Ceci sera suivi des mesures sur d'autres tissus sains ou pathologiques, qui, en corrélation avec des expériences d'infiltration de macrophages dans les tissus, permettront de faire des interpolations entre la perméabilité et le mode migratoire utilisé.

A terme, d'autres paramètres biomécaniques seront mesurés. En plus de la perméabilité, une autre mesure des propriétés de transport sera celle de la porosité du tissu. Elle pourrait être évaluée d'une part grâce à des acquisitions de la surface des explants tissulaires par microscopie électronique à balayage qui nous renseigneraient sur la topographie de la surface de l'échantillon, et d'autre part grâce à des méthodologies expérimentales du groupe de physiciens utilisant le micro-CT (*micro computer tomography*) suite à l'injection d'un agent de contraste, permettant une imagerie 3D de la structure des explants. Pour la mesure des propriétés mécaniques viscoélastiques des tissus, l'utilisation d'un rhéomètre pourra être adaptée aux explants tissulaires afin de mesurer leur raideur/rigidité et leur amortissement structural. Enfin, un équipement de champ magnétique élevé et présentant une haute résolution et un domaine d'analyse significatif pourra être envisagé afin de produire la cartographie spatiale des propriétés de résonance magnétique nucléaire des tissus biologiques (morphologie 3D, tenseur de diffusion effectif, champs des vitesses de fluide 3D) (Swider et al., 2007). A plus long terme, ces analyses pourront être réalisées sur des biopsies de tissus pathologiques humains.

Ces mesures seront réalisées en parallèle à la réalisation d'une « cartographie » des tissus dans lesquels les macrophages migrent selon le mode amiboïde ou mésenchymateux, dans différents tissus pathologiques en comparaison avec la contrepartie saine du même tissu. Ces observations pourront ensuite être complétées par des expériences de microscopie intravitale grâce à l'acquisition de nouveaux outils que j'ai évoqués dans la discussion du [chapitre 2 des résultats](#), permettant d'imager la migration des macrophages dans un grand nombre d'organes *in vivo*.

L'ensemble des données expérimentales sur tissus sains et pathologiques permettra d'alimenter l'analyse des corrélations entre les propriétés biophysiques et biomécaniques des tissus infiltrés par les macrophages et les modes de migration de ces macrophages.

Application des modèles *in vivo* et *ex vivo* dans les projets actuels de l'équipe

Les potentiels thérapeutiques du ciblage de la migration des macrophages sont d'une très grande importance, non seulement dans le cas du cancer, mais aussi d'autres maladies dont j'ai donné quelques exemples dans le [chapitre 2 de l'introduction bibliographique](#). Parmi ces maladies, le SIDA et la tuberculose constituent actuellement des projets en cours menés par l'équipe. Bien que ces deux maladies présentent des différences majeures, ces pathologies infectieuses impliquent toutes deux un détournement des fonctions des macrophages. En effet, les démences associées à une infection par le VIH-1 mettent en jeu l'infiltration de macrophages infectés dans le cerveau (Nardacci, Antinori, Kroemer, & Piacentini, 2005), et la dissémination du bacille de la tuberculose à partir du granulome formé suite à une primo-infection a été imputée aux macrophages (Davis & Ramakrishnan, 2009).

Aussi, le modèle d'explants tissulaires *ex vivo* serait d'une grande utilité dans l'étude des deux maladies. Dans le cas de l'infection par le VIH-1, une étude en cours dans l'équipe du rôle de la protéine virale Nef sur les capacités migratoires des macrophages montre qu'elle favorise la migration mésenchymateuse, ce qui pourrait ainsi permettre aux macrophages infectés de mieux infiltrer les tissus, plus particulièrement le cerveau. Toutefois, les modifications des capacités d'infiltration de ces macrophages n'ont été observées que dans le Matrigel™ ou au cours d'expériences *in vivo* de quantification statique sur des tissus fixés par immunohistochimie. En ce qui concerne une infection par Mtb, l'équipe étudie actuellement le rôle de la polarisation des monocytes/macrophages au cours de leur infection par la bactérie et l'impact sur les capacités migratoires. De même, les résultats ont été obtenus sur des matrices extracellulaires *in vitro* et des expériences de quantification d'infiltration par immunohistochimie et cytométrie en flux. Pour les raisons évoquées au début de cette partie, ces travaux devront être complétés avec des expériences montrant l'implication de Nef ou de l'infection par Mtb dans la migration trans-tissulaire des macrophages indépendamment des événements en amont et de l'effet de la protéine sur d'autres types cellulaires. De plus, des données de dynamique des macrophages au cours de la migration *in vivo*, telles que la morphologie et la vitesse, sont nécessaires afin de caractériser avec certitude le mode migratoire affecté par l'infection.

Application des modèles *in vivo* et *ex vivo* dans de nouveaux projets de l'équipe

Comme je l'ai précisé dans la discussion du [chapitre 1 des résultats](#), les analyses de transcriptomique menées par l'équipe déboucheront sur l'identification d'effecteurs potentiels de la migration 3D des macrophages. S'il s'avère que ces effecteurs candidats jouent un rôle dans les modèles *in vitro*, des études plus poussées par microscopie intravitale et explants tissulaires pourront déterminer leur rôle *in vivo*.

Parmi ces effecteurs, un nouveau projet a récemment démarré dans l'équipe. Il est consacré à répondre à la question du rôle des intégrines et de l'adhérence au cours de la migration trans-tissulaire des macrophages qui, à ce jour, n'a pas été étudiée. Pourtant, il s'agit d'une question de grand intérêt puisque nous avons montré que les cellules adoptent deux modes migratoires différents dans une matrice de composition identique (le collagène I) mais d'architecture distincte. Or les récepteurs principaux du collagène sont les intégrines $\beta 1$. Il serait donc intéressant de savoir le devenir de ces récepteurs au cours de la migration mésenchymateuse *versus* amiboïde. Dans le cas des cellules tumorales, contrairement à la migration amiboïde, la migration mésenchymateuse dépend de l'adhérence des cellules à la matrice extracellulaire et les intégrines $\beta 1$, $\beta 3$ et le récepteur CD44 ont été impliqués (par exemple, dans le cancer du sein et les carcinomes). La migration amiboïde des cellules dendritiques matures dans les tissus interstitiels est, au contraire, totalement indépendante des intégrines *in vivo* (Lammermann et al., 2008). Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que la migration amiboïde des macrophages est indépendante des intégrines, tandis que le mode mésenchymateux requiert l'attachement des intégrines à la matrice extracellulaire. Nous avons notamment remarqué l'enrichissement des intégrines $\beta 1$ aux extrémités des podosomes 3D (Van Goethem et al., 2011), ce qui corrobore cette hypothèse. Des expériences préliminaires réalisées récemment dans l'équipe ont initié l'étude du rôle des intégrines $\beta 1$. L'utilisation d'anticorps bloquants ou activateurs de ces intégrines $\beta 1$ suggère fortement l'implication de ces récepteurs dans la migration mésenchymateuse de macrophages humains dans des matrices extracellulaires *in vitro*. La suite de ce projet consiste à démontrer leur implication *in vivo* dans la migration des TAMs et ensuite d'étendre cette étude à d'autres molécules d'adhérences que sont les intégrines $\beta 2$, $\beta 3$ et $\beta 8$ et au récepteur à l'acide hyaluronique CD44. Ce dernier est non seulement impliqué dans la migration mésenchymateuse de cellules tumorales, mais aussi il est un constituant des podosomes et surtout colocalise avec les intégrines $\beta 1$ au niveau des podosomes 3D (Van Goethem et al., 2011). Les intégrines $\beta 2$ seront également étudiées car des expériences préliminaires

suggèrent qu'elles participeraient à la migration mésenchymateuse des macrophages. Par ailleurs, l'analyse différentielle du transcriptome a mis en évidence la régulation de l'ARN codant pour la sous-unité $\beta 8$, or celle-ci a été impliquée dans la motilité de cellules tumorales de glioblastome (Reyes et al., 2013).

D'un point de vue expérimental, une première approche *ex vivo* pourra être réalisée en utilisant des explants tissulaires de fibrosarcomes sous-cutanés générés chez la souris. Des macrophages humains, dans lesquels les protéines d'intérêts auront été ou non « éteintes » par interférence ARN, ou des macrophages murins marqués issus de souris mutantes (dont le gène codant pour le récepteur d'intérêt est spécifiquement éteinte dans les macrophages) seront mis à migrer sur les explants. La quantité de macrophages infiltrés et la profondeur de pénétration dans le tissu seront analysées par immunohistochimie. Cette approche permettra de déterminer précisément le rôle des différents récepteurs d'adhérence dans la migration trans-tissulaire mésenchymateuse (dans la tumeur) ou amiboïde (dans le tissu environnant).

L'approche *in vivo* complétera l'étude pour les récepteurs sélectionnés pour leurs effets sur la migration mésenchymateuse *in vitro* et *ex vivo*. D'une part, le recrutement de macrophages dans des fibrosarcomes sous-cutanés induits chez des souris sauvages et mutantes conditionnelles pourra être mesuré sur l'animal entier par micro-CT après marquage avec les nanoparticules « ^{99m}Tc -labeled- αMMR » (Movahedi et al., 2012). D'autre part, les expériences avec les souris MacBlue pourront être conduites avec différentes doses d'inhibiteurs pharmacologiques des récepteurs d'intérêt selon leur disponibilité, par exemple le Tysabri (anticorps anti- $\alpha 4\beta 1$) (Chataway & Miller, 2013) et l'anticorps AIIB2 (anti- $\beta 1$) (Park, Zhang, Yao, Park, & Bissell, 2008), deux inhibiteurs de l'intégrine $\beta 1$ déjà utilisés en thérapie (le Tysabri pour la sclérose en plaque et l'AIIB2 en préclinique pour le cancer du sein). La microscopie intravitale permettra de déterminer dans ces souris si la migration tissulaire des TAMs *in vivo* est affectée par les inhibiteurs ou l'inactivation des récepteurs d'adhérence.

Ainsi, compte tenu des résultats préliminaires de l'équipe sur l'implication des intégrines $\beta 1$ et $\beta 2$ dans la migration trans-matricielle *in vitro*, nous nous attendons à confirmer leur implication dans la migration mésenchymateuse des macrophages *ex vivo* et des TAMs *in vivo* notamment grâce aux modèles que j'ai développés au cours de ma thèse. A terme, les effecteurs de l'activation et de la signalisation des intégrines, dont certains comme la kindline 3 sont spécifiques des cellules hématopoïétiques (Fagerholm, Lek, & Morrison,

2014), pourront être envisagés comme cibles pharmacologiques potentielles pour contrôler la migration mésenchymateuse des macrophages.

Pour conclure ce manuscrit, mon travail de thèse a permis d'apporter de nouvelles perspectives dans l'étude de la migration des macrophages, conduisant d'une part à une plus grande pertinence physiologique, et d'autre part à un aspect dynamique manquant aux études *in vivo* réalisées jusqu'à présent. Ces paramètres sont indispensables à la caractérisation définitive des modes migratoires des macrophages dans les tissus vivants, qui permettra de cibler de nouveaux effecteurs identifiés comme impliqués dans ces processus. A terme, ceci permettra d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques dans les pathologies où l'infiltration des macrophages joue un rôle délétère.

Références

- Accadbled, F., Ambard, D., de Gauzy, J. S., & Swider, P. (2008). A measurement technique to evaluate the macroscopic permeability of the vertebral end-plate. *Med Eng Phys*, *30*(1), 116-122. doi: 10.1016/j.medengphy.2006.12.008
- Aharinejad, S., Paulus, P., Sioud, M., Hofmann, M., Zins, K., Schafer, R., . . . Abraham, D. (2004). Colony-stimulating factor-1 blockade by antisense oligonucleotides and small interfering RNAs suppresses growth of human mammary tumor xenografts in mice. *Cancer Res*, *64*(15), 5378-5384. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0961
- Ajami, B., Bennett, J. L., Krieger, C., Tetzlaff, W., & Rossi, F. M. (2007). Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci*, *10*(12), 1538-1543. doi: 10.1038/nn2014
- Alam, N., Goel, H. L., Zarif, M. J., Butterfield, J. E., Perkins, H. M., Sansoucy, B. G., . . . Languino, L. R. (2007). The integrin-growth factor receptor duet. *J Cell Physiol*, *213*(3), 649-653. doi: 10.1002/jcp.21278
- Allavena, P., Grandi, M., D'Incalci, M., Geri, O., Giuliani, F. C., & Mantovani, A. (1987). Human tumor cell lines with pleiotropic drug resistance are efficiently killed by interleukin-2 activated killer cells and by activated monocytes. *Int J Cancer*, *40*(1), 104-107.
- Allavena, P., Signorelli, M., Chieppa, M., Erba, E., Bianchi, G., Marchesi, F., . . . D'Incalci, M. (2005). Anti-inflammatory properties of the novel antitumor agent yondelis (trabectedin): inhibition of macrophage differentiation and cytokine production. *Cancer Res*, *65*(7), 2964-2971. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-4037
- Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., . . . Kaibuchi, K. (1996). Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem*, *271*(34), 20246-20249.
- Anthony, R. M., Urban, J. F., Jr., Alem, F., Hamed, H. A., Rozo, C. T., Boucher, J. L., . . . Gause, W. C. (2006). Memory T(H)2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites. *Nat Med*, *12*(8), 955-960. doi: 10.1038/nm1451
- Asperti-Boursin, F., Real, E., Bismuth, G., Trautmann, A., & Donnadieu, E. (2007). CCR7 ligands control basal T cell motility within lymph node slices in a phosphoinositide 3-kinase-independent manner. *J Exp Med*, *204*(5), 1167-1179. doi: 10.1084/jem.20062079
- Auffray, C., Fogg, D., Garfa, M., Elain, G., Join-Lambert, O., Kayal, S., . . . Geissmann, F. (2007). Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science*, *317*(5838), 666-670. doi: 10.1126/science.1142883
- Avraamides, C. J., Garmy-Susini, B., & Varner, J. A. (2008). Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Cancer*, *8*(8), 604-617. doi: 10.1038/nrc2353
- Ayoub, S., Hickey, M. J., & Morand, E. F. (2008). Mechanisms of disease: macrophage migration inhibitory factor in SLE, RA and atherosclerosis. *Nat Clin Pract Rheumatol*, *4*(2), 98-105. doi: 10.1038/ncprheum0701
- Bailey, C., Negus, R., Morris, A., Ziprin, P., Goldin, R., Allavena, P., . . . Darzi, A. (2007). Chemokine expression is associated with the accumulation of tumour associated

- macrophages (TAMs) and progression in human colorectal cancer. *Clin Exp Metastasis*, 24(2), 121-130. doi: 10.1007/s10585-007-9060-3
- Bain, C. C., Bravo-Blas, A., Scott, C. L., Gomez Perdiguero, E., Geissmann, F., Henri, S., . . . Mowat, A. M. (2014). Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nat Immunol*, 15(10), 929-937. doi: 10.1038/ni.2967
- Balkwill, F., Charles, K. A., & Mantovani, A. (2005). Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell*, 7(3), 211-217. doi: 10.1016/j.ccr.2005.02.013
- Balkwill, F., & Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*, 357(9255), 539-545. doi: 10.1016/S0140-6736(00)04046-0
- Balkwill, F. R., & Mantovani, A. (2012). Cancer-related inflammation: common themes and therapeutic opportunities. *Semin Cancer Biol*, 22(1), 33-40. doi: 10.1016/j.semcancer.2011.12.005
- Beatty, G. L., Chiorean, E. G., Fishman, M. P., Saboury, B., Teitelbaum, U. R., Sun, W., . . . Vonderheide, R. H. (2011). CD40 agonists alter tumor stroma and show efficacy against pancreatic carcinoma in mice and humans. *Science*, 331(6024), 1612-1616. doi: 10.1126/science.1198443
- Belge, K. U., Dayyani, F., Horelt, A., Siedlar, M., Frankenberger, M., Frankenberger, B., . . . Ziegler-Heitbrock, L. (2002). The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol*, 168(7), 3536-3542.
- Bell-McGuinn, K. M., Garfall, A. L., Bogyo, M., Hanahan, D., & Joyce, J. A. (2007). Inhibition of cysteine cathepsin protease activity enhances chemotherapy regimens by decreasing tumor growth and invasiveness in a mouse model of multistage cancer. *Cancer Res*, 67(15), 7378-7385. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0602
- Benoit, M., Desnues, B., & Mege, J. L. (2008). Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol*, 181(6), 3733-3739.
- Berton, S., Belletti, B., Wolf, K., Canzonieri, V., Lovat, F., Vecchione, A., . . . Baldassarre, G. (2009). The tumor suppressor functions of p27(kip1) include control of the mesenchymal/amoeboid transition. *Mol Cell Biol*, 29(18), 5031-5045. doi: 10.1128/MCB.00144-09
- Besson, A., Gurian-West, M., Schmidt, A., Hall, A., & Roberts, J. M. (2004). p27Kip1 modulates cell migration through the regulation of RhoA activation. *Genes Dev*, 18(8), 862-876. doi: 10.1101/gad.1185504
- Besson, A., Hwang, H. C., Cicero, S., Donovan, S. L., Gurian-West, M., Johnson, D., . . . Roberts, J. M. (2007). Discovery of an oncogenic activity in p27Kip1 that causes stem cell expansion and a multiple tumor phenotype. *Genes Dev*, 21(14), 1731-1746. doi: 10.1101/gad.1556607
- Bhattacharjee, A., Pal, S., Feldman, G. M., & Cathcart, M. K. (2011). Hck is a key regulator of gene expression in alternatively activated human monocytes. *J Biol Chem*, 286(42), 36709-36723. doi: 10.1074/jbc.M111.291492
- Biname, F., Pawlak, G., Roux, P., & Hibner, U. (2010). What makes cells move: requirements and obstacles for spontaneous cell motility. *Mol Biosyst*, 6(4), 648-661. doi: 10.1039/b915591k
- Bingle, L., Brown, N. J., & Lewis, C. E. (2002). The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol*, 196(3), 254-265. doi: 10.1002/path.1027
- Bissell, M. J., & Radisky, D. (2001). Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer*, 1(1), 46-54. doi: 10.1038/35094059

- Biswas, S. K., Allavena, P., & Mantovani, A. (2013). Tumor-associated macrophages: functional diversity, clinical significance, and open questions. *Semin Immunopathol*, 35(5), 585-600. doi: 10.1007/s00281-013-0367-7
- Biswas, S. K., Gangi, L., Paul, S., Schioppa, T., Saccani, A., Sironi, M., . . . Sica, A. (2006). A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation). *Blood*, 107(5), 2112-2122. doi: 10.1182/blood-2005-01-0428
- Biswas, S. K., & Mantovani, A. (2010). Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol*, 11(10), 889-896. doi: 10.1038/ni.1937
- Bottazzi, B., Erba, E., Nobili, N., Fazioli, F., Rambaldi, A., & Mantovani, A. (1990). A paracrine circuit in the regulation of the proliferation of macrophages infiltrating murine sarcomas. *J Immunol*, 144(6), 2409-2412.
- Brown, E. R., Charles, K. A., Hoare, S. A., Rye, R. L., Jodrell, D. I., Aird, R. E., . . . Smyth, J. F. (2008). A clinical study assessing the tolerability and biological effects of infliximab, a TNF-alpha inhibitor, in patients with advanced cancer. *Ann Oncol*, 19(7), 1340-1346. doi: 10.1093/annonc/mdn054
- Burke, B., Tang, N., Corke, K. P., Tazzyman, D., Ameri, K., Wells, M., & Lewis, C. E. (2002). Expression of HIF-1alpha by human macrophages: implications for the use of macrophages in hypoxia-regulated cancer gene therapy. *J Pathol*, 196(2), 204-212. doi: 10.1002/path.1029
- Calderwood, D. A., Zent, R., Grant, R., Rees, D. J., Hynes, R. O., & Ginsberg, M. H. (1999). The Talin head domain binds to integrin beta subunit cytoplasmic tails and regulates integrin activation. *J Biol Chem*, 274(40), 28071-28074.
- Cau, J., & Hall, A. (2005). Cdc42 controls the polarity of the actin and microtubule cytoskeletons through two distinct signal transduction pathways. *J Cell Sci*, 118(Pt 12), 2579-2587. doi: 10.1242/jcs.02385
- Chan, K. T., Cortesio, C. L., & Huttenlocher, A. (2007). Integrins in cell migration. *Methods Enzymol*, 426, 47-67. doi: 10.1016/S0076-6879(07)26003-3
- Chao, M. P., Tang, C., Pachynski, R. K., Chin, R., Majeti, R., & Weissman, I. L. (2011). Extranodal dissemination of non-Hodgkin lymphoma requires CD47 and is inhibited by anti-CD47 antibody therapy. *Blood*, 118(18), 4890-4901. doi: 10.1182/blood-2011-02-338020
- Chao, M. P., Weissman, I. L., & Majeti, R. (2012). The CD47-SIRPalpha pathway in cancer immune evasion and potential therapeutic implications. *Curr Opin Immunol*, 24(2), 225-232. doi: 10.1016/j.coi.2012.01.010
- Charras, G. T., Hu, C. K., Coughlin, M., & Mitchison, T. J. (2006). Reassembly of contractile actin cortex in cell blebs. *J Cell Biol*, 175(3), 477-490. doi: 10.1083/jcb.200602085
- Chataway, J., & Miller, D. H. (2013). Natalizumab therapy for multiple sclerosis. *Neurotherapeutics*, 10(1), 19-28. doi: 10.1007/s13311-012-0171-4
- Chen, J. J., Lin, Y. C., Yao, P. L., Yuan, A., Chen, H. Y., Shun, C. T., . . . Yang, P. C. (2005). Tumor-associated macrophages: the double-edged sword in cancer progression. *J Clin Oncol*, 23(5), 953-964. doi: 10.1200/JCO.2005.12.172
- Choi, C. K., Vicente-Manzanares, M., Zareno, J., Whitmore, L. A., Mogilner, A., & Horwitz, A. R. (2008). Actin and alpha-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. *Nat Cell Biol*, 10(9), 1039-1050. doi: 10.1038/ncb1763
- Christiansen, J. J., & Rajasekaran, A. K. (2006). Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res*, 66(17), 8319-8326. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0410

- Codarri, L., Gyulveszi, G., Tosevski, V., Hesske, L., Fontana, A., Magnenat, L., . . . Becher, B. (2011). ROR γ drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat Immunol*, *12*(6), 560-567. doi: 10.1038/ni.2027
- Coley, W. B. (1991). The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clin Orthop Relat Res*(262), 3-11.
- Collin, O., Na, S., Chowdhury, F., Hong, M., Shin, M. E., Wang, F., & Wang, N. (2008). Self-organized podosomes are dynamic mechanosensors. *Curr Biol*, *18*(17), 1288-1294. doi: 10.1016/j.cub.2008.07.046
- Collin, O., Tracqui, P., Stephanou, A., Usson, Y., Clement-Lacroix, J., & Planus, E. (2006). Spatiotemporal dynamics of actin-rich adhesion microdomains: influence of substrate flexibility. *J Cell Sci*, *119*(Pt 9), 1914-1925. doi: 10.1242/jcs.02838
- Colombo, N., Peccatori, F., Paganin, C., Bini, S., Brandely, M., Mangioni, C., . . . Allavena, P. (1992). Anti-tumor and immunomodulatory activity of intraperitoneal IFN-gamma in ovarian carcinoma patients with minimal residual tumor after chemotherapy. *Int J Cancer*, *51*(1), 42-46.
- Colucci-Guyon, E., Tinevez, J. Y., Renshaw, S. A., & Herbomel, P. (2011). Strategies of professional phagocytes in vivo: unlike macrophages, neutrophils engulf only surface-associated microbes. *J Cell Sci*, *124*(Pt 18), 3053-3059. doi: 10.1242/jcs.082792
- Cougoule, C., Carreno, S., Castandet, J., Labrousse, A., Astarie-Dequeker, C., Poincloux, R., . . . Maridonneau-Parini, I. (2005). Activation of the lysosome-associated p61Hck isoform triggers the biogenesis of podosomes. *Traffic*, *6*(8), 682-694. doi: 10.1111/j.1600-0854.2005.00307.x
- Cougoule, C., Le Cabec, V., Poincloux, R., Al Saati, T., Mege, J. L., Tabouret, G., . . . Maridonneau-Parini, I. (2010). Three-dimensional migration of macrophages requires Hck for podosome organization and extracellular matrix proteolysis. *Blood*, *115*(7), 1444-1452. doi: 10.1182/blood-2009-04-218735
- Cougoule, C., Van Goethem, E., Le Cabec, V., Lafouresse, F., Dupre, L., Mehraj, V., . . . Maridonneau-Parini, I. (2012). Blood leukocytes and macrophages of various phenotypes have distinct abilities to form podosomes and to migrate in 3D environments. *Eur J Cell Biol*, *91*(11-12), 938-949. doi: 10.1016/j.ejcb.2012.07.002
- Coussens, L. M., & Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, *420*(6917), 860-867. doi: 10.1038/nature01322
- Cros, J., Cagnard, N., Woollard, K., Patey, N., Zhang, S. Y., Senechal, B., . . . Geissmann, F. (2010). Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity*, *33*(3), 375-386. doi: 10.1016/j.immuni.2010.08.012
- Curiel, T. J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., . . . Zou, W. (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*, *10*(9), 942-949. doi: 10.1038/nm1093
- Czernielewski, J. M., & Demarchez, M. (1987). Further evidence for the self-reproducing capacity of Langerhans cells in human skin. *J Invest Dermatol*, *88*(1), 17-20.
- D'Incalci, M., Badri, N., Galmarini, C. M., & Allavena, P. (2014). Trabectedin, a drug acting on both cancer cells and the tumour microenvironment. *Br J Cancer*, *111*(4), 646-650. doi: 10.1038/bjc.2014.149
- Dahl, K. N., Ribeiro, A. J., & Lammerding, J. (2008). Nuclear shape, mechanics, and mechanotransduction. *Circ Res*, *102*(11), 1307-1318. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.173989
- Davies, L. C., Rosas, M., Smith, P. J., Fraser, D. J., Jones, S. A., & Taylor, P. R. (2011). A quantifiable proliferative burst of tissue macrophages restores homeostatic

- macrophage populations after acute inflammation. *Eur J Immunol*, 41(8), 2155-2164. doi: 10.1002/eji.201141817
- Davis, J. M., & Ramakrishnan, L. (2009). The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection. *Cell*, 136(1), 37-49. doi: 10.1016/j.cell.2008.11.014
- Dedon, P. C., & Tannenbaum, S. R. (2004). Reactive nitrogen species in the chemical biology of inflammation. *Arch Biochem Biophys*, 423(1), 12-22.
- DeNardo, D. G., Brennan, D. J., Rexhepaj, E., Ruffell, B., Shiao, S. L., Madden, S. F., . . . Coussens, L. M. (2011). Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer Discov*, 1(1), 54-67. doi: 10.1158/2159-8274.CD-10-0028
- Deng, L., Zhou, J. F., Sellers, R. S., Li, J. F., Nguyen, A. V., Wang, Y., . . . Lin, E. Y. (2010). A novel mouse model of inflammatory bowel disease links mammalian target of rapamycin-dependent hyperproliferation of colonic epithelium to inflammation-associated tumorigenesis. *Am J Pathol*, 176(2), 952-967. doi: 10.2353/ajpath.2010.090622
- Deryugina, E. I., & Quigley, J. P. (2006). Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 25(1), 9-34. doi: 10.1007/s10555-006-7886-9
- Deryugina, E. I., & Quigley, J. P. (2012). Cell surface remodeling by plasmin: a new function for an old enzyme. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 564259. doi: 10.1155/2012/564259
- Deryugina, E. I., Ratnikov, B., Monosov, E., Postnova, T. I., DiScipio, R., Smith, J. W., & Strongin, A. Y. (2001). MT1-MMP initiates activation of pro-MMP-2 and integrin alphavbeta3 promotes maturation of MMP-2 in breast carcinoma cells. *Exp Cell Res*, 263(2), 209-223. doi: 10.1006/excr.2000.5118
- Dickinson, R. B., Guido, S., & Tranquillo, R. T. (1994). Biased cell migration of fibroblasts exhibiting contact guidance in oriented collagen gels. *Ann Biomed Eng*, 22(4), 342-356.
- Dovas, A., Gevrey, J. C., Grossi, A., Park, H., Abou-Kheir, W., & Cox, D. (2009). Regulation of podosome dynamics by WASp phosphorylation: implication in matrix degradation and chemotaxis in macrophages. *J Cell Sci*, 122(Pt 21), 3873-3882. doi: 10.1242/jcs.051755
- Dullien, F. A. L. (1992). *Porous media, fluid transport and pore structure* (Academic Press ed.).
- Duluc, D., Corvaisier, M., Blanchard, S., Catala, L., Descamps, P., Gamelin, E., . . . Jeannin, P. (2009). Interferon-gamma reverses the immunosuppressive and protumoral properties and prevents the generation of human tumor-associated macrophages. *Int J Cancer*, 125(2), 367-373. doi: 10.1002/ijc.24401
- Duplat, D., Chabadel, A., Gallet, M., Berland, S., Bedouet, L., Rousseau, M., . . . Lopez, E. (2007). The in vitro osteoclastic degradation of nacre. *Biomaterials*, 28(12), 2155-2162. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.01.015
- Edris, B., Weiskopf, K., Volkmer, A. K., Volkmer, J. P., Willingham, S. B., Contreras-Trujillo, H., . . . van de Rijn, M. (2012). Antibody therapy targeting the CD47 protein is effective in a model of aggressive metastatic leiomyosarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(17), 6656-6661. doi: 10.1073/pnas.1121629109
- Eken, C., Sadallah, S., Martin, P. J., Treves, S., & Schifferli, J. A. (2013). Ectosomes of polymorphonuclear neutrophils activate multiple signaling pathways in macrophages. *Immunobiology*, 218(3), 382-392. doi: 10.1016/j.imbio.2012.05.021
- El-Behi, M., Ciric, B., Dai, H., Yan, Y., Cullimore, M., Safavi, F., . . . Rostami, A. (2011). The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nat Immunol*, 12(6), 568-575. doi: 10.1038/ni.2031

- Elie, B. T., Gocheva, V., Shree, T., Dalrymple, S. A., Holsinger, L. J., & Joyce, J. A. (2010). Identification and pre-clinical testing of a reversible cathepsin protease inhibitor reveals anti-tumor efficacy in a pancreatic cancer model. *Biochimie*, *92*(11), 1618-1624. doi: 10.1016/j.biochi.2010.04.023
- Erler, J. T., Bennewith, K. L., Cox, T. R., Lang, G., Bird, D., Koong, A., . . . Giaccia, A. J. (2009). Hypoxia-induced lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche. *Cancer Cell*, *15*(1), 35-44. doi: 10.1016/j.ccr.2008.11.012
- Etienne-Manneville, S. (2008). Polarity proteins in migration and invasion. *Oncogene*, *27*(55), 6970-6980. doi: 10.1038/onc.2008.347
- Fagerholm, S. C., Lek, H. S., & Morrison, V. L. (2014). Kindlin-3 in the immune system. *Am J Clin Exp Immunol*, *3*(1), 37-42.
- Fjellbirkeland, L., Laerum, O. D., Eide, G. E., & Bjerkvig, R. (1998). Invasiveness by lacZ transfected non-small-cell lung cancer cells into human bronchial tissues in vitro. *Lung Cancer*, *21*(1), 7-19.
- Ford, A. Q., Dasgupta, P., Mikhailenko, I., Smith, E. M., Noben-Trauth, N., & Keegan, A. D. (2012). Adoptive transfer of IL-4R α + macrophages is sufficient to enhance eosinophilic inflammation in a mouse model of allergic lung inflammation. *BMC Immunol*, *13*, 6. doi: 10.1186/1471-2172-13-6
- Forman, H. J., & Torres, M. (2002). Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *Am J Respir Crit Care Med*, *166*(12 Pt 2), S4-8. doi: 10.1164/rccm.2206007
- Franklin, R. A., Liao, W., Sarkar, A., Kim, M. V., Bivona, M. R., Liu, K., . . . Li, M. O. (2014). The cellular and molecular origin of tumor-associated macrophages. *Science*, *344*(6186), 921-925. doi: 10.1126/science.1252510
- Friedl, P. (2004). Preshaping and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. *Curr Opin Cell Biol*, *16*(1), 14-23. doi: 10.1016/j.ceb.2003.11.001
- Friedl, P., Borgmann, S., & Brocker, E. B. (2001). Amoeboid leukocyte crawling through extracellular matrix: lessons from the Dictyostelium paradigm of cell movement. *J Leukoc Biol*, *70*(4), 491-509.
- Friedl, P., Entschladen, F., Conrad, C., Niggemann, B., & Zanker, K. S. (1998). CD4+ T lymphocytes migrating in three-dimensional collagen lattices lack focal adhesions and utilize beta1 integrin-independent strategies for polarization, interaction with collagen fibers and locomotion. *Eur J Immunol*, *28*(8), 2331-2343. doi: 10.1002/(SICI)1521-4141(199808)28:08<2331::AID-IMMU2331>3.0.CO;2-C
- Friedl, P., & Gilmour, D. (2009). Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *10*(7), 445-457. doi: 10.1038/nrm2720
- Friedl, P., Hegerfeldt, Y., & Tusch, M. (2004). Collective cell migration in morphogenesis and cancer. *Int J Dev Biol*, *48*(5-6), 441-449. doi: 10.1387/ijdb.041821
- Friedl, P., Maaser, K., Klein, C. E., Niggemann, B., Krohne, G., & Zanker, K. S. (1997). Migration of highly aggressive MV3 melanoma cells in 3-dimensional collagen lattices results in local matrix reorganization and shedding of alpha2 and beta1 integrins and CD44. *Cancer Res*, *57*(10), 2061-2070.
- Friedl, P., Noble, P. B., Walton, P. A., Laird, D. W., Chauvin, P. J., Tabah, R. J., . . . Zanker, K. S. (1995). Migration of coordinated cell clusters in mesenchymal and epithelial cancer explants in vitro. *Cancer Res*, *55*(20), 4557-4560.
- Friedl, P., & Weigelin, B. (2008). Interstitial leukocyte migration and immune function. *Nat Immunol*, *9*(9), 960-969. doi: 10.1038/ni.f.212
- Friedl, P., & Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer*, *3*(5), 362-374. doi: 10.1038/nrc1075

- Friedl, P., & Wolf, K. (2008). Tube travel: the role of proteases in individual and collective cancer cell invasion. *Cancer Res*, 68(18), 7247-7249. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0784
- Friedl, P., & Wolf, K. (2010). Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J Cell Biol*, 188(1), 11-19. doi: 10.1083/jcb.200909003
- Friedl, P., Zanker, K. S., & Brocker, E. B. (1998). Cell migration strategies in 3-D extracellular matrix: differences in morphology, cell matrix interactions, and integrin function. *Microsc Res Tech*, 43(5), 369-378. doi: 10.1002/(SICI)1097-0029(19981201)43:5<369::AID-JEMT3>3.0.CO;2-6
- Gabrilovich, D. I., Ostrand-Rosenberg, S., & Bronte, V. (2012). Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol*, 12(4), 253-268. doi: 10.1038/nri3175
- Gaggioli, C., Hooper, S., Hidalgo-Carcedo, C., Grosse, R., Marshall, J. F., Harrington, K., & Sahai, E. (2007). Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat Cell Biol*, 9(12), 1392-1400. doi: 10.1038/ncb1658
- Garber, K. (2009). First results for agents targeting cancer-related inflammation. *J Natl Cancer Inst*, 101(16), 1110-1112. doi: 10.1093/jnci/djp266
- Gazzaniga, S., Bravo, A. I., Guglielmotti, A., van Rooijen, N., Maschi, F., Vecchi, A., . . . Wainstok, R. (2007). Targeting tumor-associated macrophages and inhibition of MCP-1 reduce angiogenesis and tumor growth in a human melanoma xenograft. *J Invest Dermatol*, 127(8), 2031-2041. doi: 10.1038/sj.jid.5700827
- Geissmann, F., Jung, S., & Littman, D. R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*, 19(1), 71-82.
- Geissmann, F., Manz, M. G., Jung, S., Sieweke, M. H., Merad, M., & Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*, 327(5966), 656-661. doi: 10.1126/science.1178331
- Gelderman, K. A., Hultqvist, M., Pizzolla, A., Zhao, M., Nandakumar, K. S., Mattsson, R., & Holmdahl, R. (2007). Macrophages suppress T cell responses and arthritis development in mice by producing reactive oxygen species. *J Clin Invest*, 117(10), 3020-3028. doi: 10.1172/JCI31935
- Germano, G., Frapolli, R., Belgiovine, C., Anselmo, A., Pesce, S., Liguori, M., . . . Allavena, P. (2013). Role of macrophage targeting in the antitumor activity of trabectedin. *Cancer Cell*, 23(2), 249-262. doi: 10.1016/j.ccr.2013.01.008
- Giannone, G., & Sheetz, M. P. (2006). Substrate rigidity and force define form through tyrosine phosphatase and kinase pathways. *Trends Cell Biol*, 16(4), 213-223. doi: 10.1016/j.tcb.2006.02.005
- Gil-Bernabe, A. M., Ferjancic, S., Tlalka, M., Zhao, L., Allen, P. D., Im, J. H., . . . Muschel, R. J. (2012). Recruitment of monocytes/macrophages by tissue factor-mediated coagulation is essential for metastatic cell survival and premetastatic niche establishment in mice. *Blood*, 119(13), 3164-3175. doi: 10.1182/blood-2011-08-376426
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., . . . Merad, M. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*, 330(6005), 841-845. doi: 10.1126/science.1194637
- Ginhoux, F., & Jung, S. (2014). Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol*, 14(6), 392-404. doi: 10.1038/nri3671
- Giraudou, E., Inoue, M., & Hanahan, D. (2004). An amino-bisphosphonate targets MMP-9-expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis. *J Clin Invest*, 114(5), 623-633. doi: 10.1172/JCI22087
- Gocheva, V., Wang, H. W., Gadea, B. B., Shree, T., Hunter, K. E., Garfall, A. L., . . . Joyce, J. A. (2010). IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated

- macrophages to promote cancer growth and invasion. *Genes Dev*, 24(3), 241-255. doi: 10.1101/gad.1874010
- Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*, 3(1), 23-35. doi: 10.1038/nri978
- Gordon, S., Crocker, P. R., Morris, L., Lee, S. H., Perry, V. H., & Hume, D. A. (1986). Localization and function of tissue macrophages. *Ciba Found Symp*, 118, 54-67.
- Gordon, S., & Taylor, P. R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*, 5(12), 953-964. doi: 10.1038/nri1733
- Goswami, S., Sahai, E., Wyckoff, J. B., Cammer, M., Cox, D., Pixley, F. J., . . . Condeelis, J. S. (2005). Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1/epidermal growth factor paracrine loop. *Cancer Res*, 65(12), 5278-5283. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1853
- Gow, D. J., Sester, D. P., & Hume, D. A. (2010). CSF-1, IGF-1, and the control of postnatal growth and development. *J Leukoc Biol*, 88(3), 475-481. doi: 10.1189/jlb.0310158
- Grage-Griebenow, E., Flad, H. D., & Ernst, M. (2001). Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J Leukoc Biol*, 69(1), 11-20.
- Griffith, L. G., & Swartz, M. A. (2006). Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(3), 211-224. doi: 10.1038/nrm1858
- Grimshaw, M. J., Wilson, J. L., & Balkwill, F. R. (2002). Endothelin-2 is a macrophage chemoattractant: implications for macrophage distribution in tumors. *Eur J Immunol*, 32(9), 2393-2400. doi: 10.1002/1521-4141(200209)32:9<2393::AID-IMMU2393>3.0.CO;2-4
- Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140(6), 883-899. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.025
- Groblewska, M., Mroczko, B., Wereszczynska-Siemiakowska, U., Mysliwiec, P., Kedra, B., & Szmitkowski, M. (2007). Serum levels of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) in pancreatic cancer patients. *Clin Chem Lab Med*, 45(1), 30-34. doi: 10.1515/CCLM.2007.025
- Gui, P., Labrousse, A., Van Goethem, E., Besson, A., Maridonneau-Parini, I., & Le Cabec, V. (2014). Rho/ROCK pathway inhibition by the CDK inhibitor p27kip1 participates in the onset of macrophage 3D-mesenchymal migration. *J Cell Sci*, 127(Pt 18), 4009-4023. doi: 10.1242/jcs.150987
- Guiducci, C., Vicari, A. P., Sangaletti, S., Trinchieri, G., & Colombo, M. P. (2005). Redirecting in vivo elicited tumor infiltrating macrophages and dendritic cells towards tumor rejection. *Cancer Res*, 65(8), 3437-3446. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-4262
- Guiet, R., Poincloux, R., Castandet, J., Marois, L., Labrousse, A., Le Cabec, V., & Maridonneau-Parini, I. (2008). Hematopoietic cell kinase (Hck) isoforms and phagocyte duties - from signaling and actin reorganization to migration and phagocytosis. *Eur J Cell Biol*, 87(8-9), 527-542. doi: 10.1016/j.ejcb.2008.03.008
- Guiet, R., Van Goethem, E., Cougoule, C., Balor, S., Valette, A., Al Saati, T., . . . Maridonneau-Parini, I. (2011). The process of macrophage migration promotes matrix metalloproteinase-independent invasion by tumor cells. *J Immunol*, 187(7), 3806-3814. doi: 10.4049/jimmunol.1101245
- Guiet, R., Verollet, C., Lamsoul, I., Cougoule, C., Poincloux, R., Labrousse, A., . . . Maridonneau-Parini, I. (2012). Macrophage mesenchymal migration requires podosome stabilization by filamin A. *J Biol Chem*, 287(16), 13051-13062. doi: 10.1074/jbc.M111.307124
- Gupta, S., Pablo, A. M., Jiang, X., Wang, N., Tall, A. R., & Schindler, C. (1997). IFN-gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice. *J Clin Invest*, 99(11), 2752-2761. doi: 10.1172/JCI119465

- Guruvayoorappan, C. (2008). Tumor versus tumor-associated macrophages: how hot is the link? *Integr Cancer Ther*, 7(2), 90-95. doi: 10.1177/1534735408319060
- Hagemann, T., Lawrence, T., McNeish, I., Charles, K. A., Kulbe, H., Thompson, R. G., . . . Balkwill, F. R. (2008). "Re-educating" tumor-associated macrophages by targeting NF-kappaB. *J Exp Med*, 205(6), 1261-1268. doi: 10.1084/jem.20080108
- Halin, S., Rudolfsson, S. H., Van Rooijen, N., & Bergh, A. (2009). Extratumoral macrophages promote tumor and vascular growth in an orthotopic rat prostate tumor model. *Neoplasia*, 11(2), 177-186.
- Harley, B. A., Kim, H. D., Zaman, M. H., Yannas, I. V., Lauffenburger, D. A., & Gibson, L. J. (2008). Microarchitecture of three-dimensional scaffolds influences cell migration behavior via junction interactions. *Biophys J*, 95(8), 4013-4024. doi: 10.1529/biophysj.107.122598
- Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M. B., Leboeuf, M., . . . Merad, M. (2013). Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity*, 38(4), 792-804. doi: 10.1016/j.immuni.2013.04.004
- Haston, W. S., Shields, J. M., & Wilkinson, P. C. (1982). Lymphocyte locomotion and attachment on two-dimensional surfaces and in three-dimensional matrices. *J Cell Biol*, 92(3), 747-752.
- Hendriks, J. J., Teunissen, C. E., de Vries, H. E., & Dijkstra, C. D. (2005). Macrophages and neurodegeneration. *Brain Res Brain Res Rev*, 48(2), 185-195. doi: 10.1016/j.brainresrev.2004.12.008
- Hershko, D. D. (2010). Cyclin-dependent kinase inhibitor p27 as a prognostic biomarker and potential cancer therapeutic target. *Future Oncol*, 6(12), 1837-1847. doi: 10.2217/fon.10.144
- Heuff, G., Oldenburg, H. S., Boutkan, H., Visser, J. J., Beelen, R. H., Van Rooijen, N., . . . Meyer, S. (1993). Enhanced tumour growth in the rat liver after selective elimination of Kupffer cells. *Cancer Immunol Immunother*, 37(2), 125-130.
- Hiratsuka, S., Watanabe, A., Aburatani, H., & Maru, Y. (2006). Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. *Nat Cell Biol*, 8(12), 1369-1375. doi: 10.1038/ncb1507
- Hoeffel, G., Wang, Y., Greter, M., See, P., Teo, P., Malleret, B., . . . Ginhoux, F. (2012). Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *J Exp Med*, 209(6), 1167-1181. doi: 10.1084/jem.20120340
- Holmbeck, K., Bianco, P., Caterina, J., Yamada, S., Kromer, M., Kuznetsov, S. A., . . . Birkedal-Hansen, H. (1999). MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell*, 99(1), 81-92.
- Holtmaat, A., Bonhoeffer, T., Chow, D. K., Chuckowree, J., De Paola, V., Hofer, S. B., . . . Wilbrecht, L. (2009). Long-term, high-resolution imaging in the mouse neocortex through a chronic cranial window. *Nat Protoc*, 4(8), 1128-1144. doi: 10.1038/nprot.2009.89
- Hotamisligil, G. S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 444(7121), 860-867. doi: 10.1038/nature05485
- Huang, S., & Ingber, D. E. (2005). Cell tension, matrix mechanics, and cancer development. *Cancer Cell*, 8(3), 175-176. doi: 10.1016/j.ccr.2005.08.009
- Hume, D. A. (2000). Probability in transcriptional regulation and its implications for leukocyte differentiation and inducible gene expression. *Blood*, 96(7), 2323-2328.
- Hume, D. A. (2006). The mononuclear phagocyte system. *Curr Opin Immunol*, 18(1), 49-53. doi: 10.1016/j.coi.2005.11.008

- Hume, D. A., Halpin, D., Charlton, H., & Gordon, S. (1984). The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80: macrophages of endocrine organs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *81*(13), 4174-4177.
- Hynes, R. O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, *110*(6), 673-687.
- Hynes, R. O. (2009). The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science*, *326*(5957), 1216-1219. doi: 10.1126/science.1176009
- Ingersoll, M. A., Spanbroek, R., Lottaz, C., Gautier, E. L., Frankenberger, M., Hoffmann, R., . . . Randolph, G. J. (2010). Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood*, *115*(3), e10-19. doi: 10.1182/blood-2009-07-235028
- Itoh, Y. (2006). MT1-MMP: a key regulator of cell migration in tissue. *IUBMB Life*, *58*(10), 589-596. doi: 10.1080/15216540600962818
- Jaffe, A. B., & Hall, A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*, *21*, 247-269. doi: 10.1146/annurev.cellbio.21.020604.150721
- Jaiswal, S., Jamieson, C. H., Pang, W. W., Park, C. Y., Chao, M. P., Majeti, R., . . . Weissman, I. L. (2009). CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. *Cell*, *138*(2), 271-285. doi: 10.1016/j.cell.2009.05.046
- Jalkanen, S., & Salmi, M. (2008). VAP-1 and CD73, endothelial cell surface enzymes in leukocyte extravasation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *28*(1), 18-26. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.153130
- Jenkins, S. J., Ruckerl, D., Cook, P. C., Jones, L. H., Finkelman, F. D., van Rooijen, N., . . . Allen, J. E. (2011). Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science*, *332*(6035), 1284-1288. doi: 10.1126/science.1204351
- Jenkins, S. J., Ruckerl, D., Thomas, G. D., Hewitson, J. P., Duncan, S., Brombacher, F., . . . Allen, J. E. (2013). IL-4 directly signals tissue-resident macrophages to proliferate beyond homeostatic levels controlled by CSF-1. *J Exp Med*, *210*(11), 2477-2491. doi: 10.1084/jem.20121999
- Jevnikar, Z., Mirkovic, B., Fonovic, U. P., Zidar, N., Svajger, U., & Kos, J. (2012). Three-dimensional invasion of macrophages is mediated by cysteine cathepsins in protrusive podosomes. *Eur J Immunol*, *42*(12), 3429-3441. doi: 10.1002/eji.201242610
- Jobin, C. (2013). Colorectal cancer: looking for answers in the microbiota. *Cancer Discov*, *3*(4), 384-387. doi: 10.1158/2159-8290.CD-13-0042
- Joyce, J. A., & Pollard, J. W. (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*, *9*(4), 239-252. doi: 10.1038/nrc2618
- nrc2618 [pii]
- Julia, V., Hessel, E. M., Malherbe, L., Glaichenhaus, N., O'Garra, A., & Coffman, R. L. (2002). A restricted subset of dendritic cells captures airborne antigens and remains able to activate specific T cells long after antigen exposure. *Immunity*, *16*(2), 271-283.
- Jurdic, P., Saltel, F., Chabadel, A., & Destaing, O. (2006). Podosome and sealing zone: specificity of the osteoclast model. *Eur J Cell Biol*, *85*(3-4), 195-202. doi: 10.1016/j.ejcb.2005.09.008
- Kamada, N., Hisamatsu, T., Honda, H., Kobayashi, T., Chinen, H., Kitazume, M. T., . . . Hibi, T. (2009). Human CD14+ macrophages in intestinal lamina propria exhibit potent antigen-presenting ability. *J Immunol*, *183*(3), 1724-1731. doi: 10.4049/jimmunol.0804369
- Kamada, N., Hisamatsu, T., Okamoto, S., Chinen, H., Kobayashi, T., Sato, T., . . . Hibi, T. (2008). Unique CD14 intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn

- disease via IL-23/IFN-gamma axis. *J Clin Invest*, 118(6), 2269-2280. doi: 10.1172/JCI34610
- Kanitakis, J., Petruzzo, P., & Dubernard, J. M. (2004). Turnover of epidermal Langerhans' cells. *N Engl J Med*, 351(25), 2661-2662. doi: 10.1056/NEJM200412163512523
- Karin, M., & Greten, F. R. (2005). NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol*, 5(10), 749-759. doi: 10.1038/nri1703
- Kass, L., Erler, J. T., Dembo, M., & Weaver, V. M. (2007). Mammary epithelial cell: influence of extracellular matrix composition and organization during development and tumorigenesis. *Int J Biochem Cell Biol*, 39(11), 1987-1994. doi: 10.1016/j.biocel.2007.06.025
- Kawai, T., & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*, 11(5), 373-384. doi: 10.1038/ni.1863
- Kawane, K., Ohtani, M., Miwa, K., Kizawa, T., Kanbara, Y., Yoshioka, Y., . . . Nagata, S. (2006). Chronic polyarthritis caused by mammalian DNA that escapes from degradation in macrophages. *Nature*, 443(7114), 998-1002. doi: 10.1038/nature05245
- Kedrin, D., Gligorijevic, B., Wyckoff, J., Verkhusha, V. V., Condeelis, J., Segall, J. E., & van Rheenen, J. (2008). Intravital imaging of metastatic behavior through a mammary imaging window. *Nat Methods*, 5(12), 1019-1021. doi: 10.1038/nmeth.1269
- Keller, H., & Egli, P. (1998). Protrusive activity, cytoplasmic compartmentalization, and restriction rings in locomoting blebbing Walker carcinosarcoma cells are related to detachment of cortical actin from the plasma membrane. *Cell Motil Cytoskeleton*, 41(2), 181-193. doi: 10.1002/(SICI)1097-0169(1998)41:2<181::AID-CM8>3.0.CO;2-H
- Kessenbrock, K., Plaks, V., & Werb, Z. (2010). Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*, 141(1), 52-67. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.015
- Kienast, Y., von Baumgarten, L., Fuhrmann, M., Klinkert, W. E., Goldbrunner, R., Herms, J., & Winkler, F. (2010). Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation. *Nat Med*, 16(1), 116-122. doi: 10.1038/nm.2072
- Kim, D. W., Min, H. S., Lee, K. H., Kim, Y. J., Oh, D. Y., Jeon, Y. K., . . . Heo, D. S. (2008). High tumour islet macrophage infiltration correlates with improved patient survival but not with EGFR mutations, gene copy number or protein expression in resected non-small cell lung cancer. *Br J Cancer*, 98(6), 1118-1124. doi: 10.1038/sj.bjc.6604256
- Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., . . . Kaibuchi, K. (1996). Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science*, 273(5272), 245-248.
- Kimura, Y. N., Watari, K., Fotovati, A., Hosoi, F., Yasumoto, K., Izumi, H., . . . Ono, M. (2007). Inflammatory stimuli from macrophages and cancer cells synergistically promote tumor growth and angiogenesis. *Cancer Sci*, 98(12), 2009-2018. doi: 10.1111/j.1349-7006.2007.00633.x
- Klein, I., Cornejo, J. C., Polakos, N. K., John, B., Wuensch, S. A., Topham, D. J., . . . Crispe, I. N. (2007). Kupffer cell heterogeneity: functional properties of bone marrow derived and sessile hepatic macrophages. *Blood*, 110(12), 4077-4085. doi: 10.1182/blood-2007-02-073841
- Kramer, N., Walzl, A., Unger, C., Rosner, M., Krupitza, G., Hengstschlager, M., & Dolznig, H. (2013). In vitro cell migration and invasion assays. *Mutat Res*, 752(1), 10-24. doi: 10.1016/j.mrrev.2012.08.001
- Kuang, D. M., Zhao, Q., Peng, C., Xu, J., Zhang, J. P., Wu, C., & Zheng, L. (2009). Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1. *J Exp Med*, 206(6), 1327-1337. doi: 10.1084/jem.20082173

- Kubota, Y., Takubo, K., Shimizu, T., Ohno, H., Kishi, K., Shibuya, M., . . . Suda, T. (2009). M-CSF inhibition selectively targets pathological angiogenesis and lymphangiogenesis. *J Exp Med*, 206(5), 1089-1102. doi: 10.1084/jem.20081605
- Kurihara, T., Warr, G., Loy, J., & Bravo, R. (1997). Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. *J Exp Med*, 186(10), 1757-1762.
- Kuziel, W. A., Morgan, S. J., Dawson, T. C., Griffin, S., Smithies, O., Ley, K., & Maeda, N. (1997). Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(22), 12053-12058.
- Labernadie, A., Thibault, C., Vieu, C., Maridonneau-Parini, I., & Charriere, G. M. (2010). Dynamics of podosome stiffness revealed by atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(49), 21016-21021. doi: 10.1073/pnas.1007835107
- Lammerding, J., Fong, L. G., Ji, J. Y., Reue, K., Stewart, C. L., Young, S. G., & Lee, R. T. (2006). Lamins A and C but not lamin B1 regulate nuclear mechanics. *J Biol Chem*, 281(35), 25768-25780. doi: 10.1074/jbc.M513511200
- Lammermann, T., Bader, B. L., Monkley, S. J., Worbs, T., Wedlich-Soldner, R., Hirsch, K., . . . Sixt, M. (2008). Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature*, 453(7191), 51-55. doi: 10.1038/nature06887
- Landsman, L., Varol, C., & Jung, S. (2007). Distinct differentiation potential of blood monocyte subsets in the lung. *J Immunol*, 178(4), 2000-2007.
- Laoui, D., Movahedi, K., Van Overmeire, E., Van den Bossche, J., Schoupe, E., Mommer, C., . . . Van Genderachter, J. A. (2011). Tumor-associated macrophages in breast cancer: distinct subsets, distinct functions. *Int J Dev Biol*, 55(7-9), 861-867. doi: 10.1387/ijdb.113371dl
- Laoui, D., Van Overmeire, E., Di Conza, G., Aldeni, C., Keirsse, J., Morias, Y., . . . Van Genderachter, J. A. (2014). Tumor hypoxia does not drive differentiation of tumor-associated macrophages but rather fine-tunes the M2-like macrophage population. *Cancer Res*, 74(1), 24-30. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1196
- Laoui, D., Van Overmeire, E., Movahedi, K., Van den Bossche, J., Schoupe, E., Mommer, C., . . . Van Genderachter, J. A. (2011). Mononuclear phagocyte heterogeneity in cancer: different subsets and activation states reaching out at the tumor site. *Immunobiology*, 216(11), 1192-1202. doi: 10.1016/j.imbio.2011.06.007
- Lattin, J., Zidar, D. A., Schroder, K., Kellie, S., Hume, D. A., & Sweet, M. J. (2007). G-protein-coupled receptor expression, function, and signaling in macrophages. *J Leukoc Biol*, 82(1), 16-32. doi: 10.1189/jlb.0107051
- Lecaudey, V., & Gilmour, D. (2006). Organizing moving groups during morphogenesis. *Curr Opin Cell Biol*, 18(1), 102-107. doi: 10.1016/j.ceb.2005.12.001
- Leulier, F., & Lemaitre, B. (2008). Toll-like receptors--taking an evolutionary approach. *Nat Rev Genet*, 9(3), 165-178. doi: 10.1038/nrg2303
- Leung, T., Chen, X. Q., Tan, I., Manser, E., & Lim, L. (1998). Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase acts as a Cdc42 effector in promoting cytoskeletal reorganization. *Mol Cell Biol*, 18(1), 130-140.
- Leuschner, F., Dutta, P., Gorbato, R., Novobrantseva, T. I., Donahoe, J. S., Courties, G., . . . Nahrendorf, M. (2011). Therapeutic siRNA silencing in inflammatory monocytes in mice. *Nat Biotechnol*, 29(11), 1005-1010. doi: 10.1038/nbt.1989
- Levental, K. R., Yu, H., Kass, L., Lakins, J. N., Egeblad, M., Erler, J. T., . . . Weaver, V. M. (2009). Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell*, 139(5), 891-906. doi: 10.1016/j.cell.2009.10.027
- Lewen, S., Zhou, H., Hu, H. D., Cheng, T., Markowitz, D., Reisfeld, R. A., . . . Luo, Y. (2008). A Legumain-based minigene vaccine targets the tumor stroma and suppresses

- breast cancer growth and angiogenesis. *Cancer Immunol Immunother*, 57(4), 507-515. doi: 10.1007/s00262-007-0389-x
- Lewis, C. E., De Palma, M., & Naldini, L. (2007). Tie2-expressing monocytes and tumor angiogenesis: regulation by hypoxia and angiopoietin-2. *Cancer Res*, 67(18), 8429-8432. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1684
- Lewis, C. E., & Pollard, J. W. (2006). Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res*, 66(2), 605-612. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4005
- Lewis, J. S., Landers, R. J., Underwood, J. C., Harris, A. L., & Lewis, C. E. (2000). Expression of vascular endothelial growth factor by macrophages is up-regulated in poorly vascularized areas of breast carcinomas. *J Pathol*, 192(2), 150-158. doi: 10.1002/1096-9896(2000)9999:9999<::AID-PATH687>3.0.CO;2-G
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I., & Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*, 7(9), 678-689. doi: 10.1038/nri2156
- Li, A. C., & Glass, C. K. (2002). The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nat Med*, 8(11), 1235-1242. doi: 10.1038/nm1102-1235
- Li, Z., Jiao, X., Wang, C., Ju, X., Lu, Y., Yuan, L., . . . Pestell, R. G. (2006). Cyclin D1 induction of cellular migration requires p27(KIP1). *Cancer Res*, 66(20), 9986-9994. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1596
- Lin, E. Y., Gouon-Evans, V., Nguyen, A. V., & Pollard, J. W. (2002). The macrophage growth factor CSF-1 in mammary gland development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 7(2), 147-162.
- Lin, E. Y., Li, J. F., Bricard, G., Wang, W., Deng, Y., Sellers, R., . . . Pollard, J. W. (2007). Vascular endothelial growth factor restores delayed tumor progression in tumors depleted of macrophages. *Mol Oncol*, 1(3), 288-302. doi: 10.1016/j.molonc.2007.10.003
- Lin, E. Y., Nguyen, A. V., Russell, R. G., & Pollard, J. W. (2001). Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med*, 193(6), 727-740.
- Linder, S. (2009). Invadosomes at a glance. *J Cell Sci*, 122(Pt 17), 3009-3013. doi: 10.1242/jcs.032631
- Linder, S., Wiesner, C., & Himmel, M. (2011). Degrading devices: invadosomes in proteolytic cell invasion. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 27, 185-211. doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154216
- Liu, C. Y., Xu, J. Y., Shi, X. Y., Huang, W., Ruan, T. Y., Xie, P., & Ding, J. L. (2013). M2-polarized tumor-associated macrophages promoted epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells, partially through TLR4/IL-10 signaling pathway. *Lab Invest*, 93(7), 844-854. doi: 10.1038/labinvest.2013.69
- Lo, C. M., Wang, H. B., Dembo, M., & Wang, Y. L. (2000). Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys J*, 79(1), 144-152. doi: 10.1016/S0006-3495(00)76279-5
- Macpherson, I. R., Hooper, S., Serrels, A., McGarry, L., Ozanne, B. W., Harrington, K., . . . Brunton, V. G. (2007). p120-catenin is required for the collective invasion of squamous cell carcinoma cells via a phosphorylation-independent mechanism. *Oncogene*, 26(36), 5214-5228. doi: 10.1038/sj.onc.1210334
- Majeti, R., Chao, M. P., Alizadeh, A. A., Pang, W. W., Jaiswal, S., Gibbs, K. D., Jr., . . . Weissman, I. L. (2009). CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell*, 138(2), 286-299. doi: 10.1016/j.cell.2009.05.045

- Manthey, C. L., Johnson, D. L., Illig, C. R., Tuman, R. W., Zhou, Z., Baker, J. F., . . . Molloy, C. J. (2009). JNJ-28312141, a novel orally active colony-stimulating factor-1 receptor/FMS-related receptor tyrosine kinase-3 receptor tyrosine kinase inhibitor with potential utility in solid tumors, bone metastases, and acute myeloid leukemia. *Mol Cancer Ther*, 8(11), 3151-3161. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-0255
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., & Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature*, 454(7203), 436-444. doi: 10.1038/nature07205
- Mantovani, A., Romero, P., Palucka, A. K., & Marincola, F. M. (2008). Tumour immunity: effector response to tumour and role of the microenvironment. *Lancet*, 371(9614), 771-783. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60241-X
- Mantovani, A., Sica, A., & Locati, M. (2005). Macrophage polarization comes of age. *Immunity*, 23(4), 344-346. doi: 10.1016/j.immuni.2005.10.001
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., & Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*, 25(12), 677-686. doi: 10.1016/j.it.2004.09.015
- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., & Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*, 23(11), 549-555.
- Matschurat, S., Knies, U. E., Person, V., Fink, L., Stoelcker, B., Ebenebe, C., . . . Clauss, M. (2003). Regulation of EMAP II by hypoxia. *Am J Pathol*, 162(1), 93-103. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63801-1
- Merad, M., Manz, M. G., Karsunky, H., Wagers, A., Peters, W., Charo, I., . . . Engleman, E. G. (2002). Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat Immunol*, 3(12), 1135-1141. doi: 10.1038/ni852
- Mierke, C. T., Rosel, D., Fabry, B., & Brabek, J. (2008). Contractile forces in tumor cell migration. *Eur J Cell Biol*, 87(8-9), 669-676. doi: 10.1016/j.ejcb.2008.01.002
- Miki, H., Suetsugu, S., & Takenawa, T. (1998). WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *EMBO J*, 17(23), 6932-6941. doi: 10.1093/emboj/17.23.6932
- Modi, B. G., Neustadter, J., Binda, E., Lewis, J., Filler, R. B., Roberts, S. J., . . . Girardi, M. (2012). Langerhans cells facilitate epithelial DNA damage and squamous cell carcinoma. *Science*, 335(6064), 104-108. doi: 10.1126/science.1211600
- Mohamed, M. M., & Sloane, B. F. (2006). Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer*, 6(10), 764-775. doi: 10.1038/nrc1949
- Moreira, A. P., Cavassani, K. A., Hullinger, R., Rosada, R. S., Fong, D. J., Murray, L., . . . Hogaboam, C. M. (2010). Serum amyloid P attenuates M2 macrophage activation and protects against fungal spore-induced allergic airway disease. *J Allergy Clin Immunol*, 126(4), 712-721 e717. doi: 10.1016/j.jaci.2010.06.010
- Morgan, G., & Lipton, A. (2010). Antitumor effects and anticancer applications of bisphosphonates. *Semin Oncol*, 37 Suppl 2, S30-40. doi: 10.1053/j.seminoncol.2010.10.005
- Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*, 8(12), 958-969. doi: 10.1038/nri2448
- Moutasim, K. A., Nystrom, M. L., & Thomas, G. J. (2011). Cell migration and invasion assays. *Methods Mol Biol*, 731, 333-343. doi: 10.1007/978-1-61779-080-5_27
- Movahedi, K., Laoui, D., Gysemans, C., Baeten, M., Stange, G., Van den Bossche, J., . . . Van Ginderachter, J. A. (2010). Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes. *Cancer Res*, 70(14), 5728-5739. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4672
- Movahedi, K., Schoonoghe, S., Laoui, D., Houbracken, I., Waelput, W., Breckpot, K., . . . Van Ginderachter, J. A. (2012). Nanobody-based targeting of the macrophage

- mannose receptor for effective in vivo imaging of tumor-associated macrophages. *Cancer Res*, 72(16), 4165-4177. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2994
- Mroczo, B., Groblewska, M., Wereszczynska-Siemiatkowska, U., Okulczyk, B., Kedra, B., Laszewicz, W., . . . Szmikowski, M. (2007). Serum macrophage-colony stimulating factor levels in colorectal cancer patients correlate with lymph node metastasis and poor prognosis. *Clin Chim Acta*, 380(1-2), 208-212. doi: 10.1016/j.cca.2007.02.037
- Murdoch, C., Giannoudis, A., & Lewis, C. E. (2004). Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood*, 104(8), 2224-2234. doi: 10.1182/blood-2004-03-1109
- Murphy, D. A., & Courtneidge, S. A. (2011). The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(7), 413-426. doi: 10.1038/nrm3141
- Murray, P. J., Allen, J. E., Biswas, S. K., Fisher, E. A., Gilroy, D. W., Goerdt, S., . . . Wynn, T. A. (2014). Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, 41(1), 14-20. doi: 10.1016/j.immuni.2014.06.008
- Murray, P. J., & Wynn, T. A. (2011). Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *J Leukoc Biol*, 89(4), 557-563. doi: 10.1189/jlb.0710409
- Naito, M., Takahashi, K., & Nishikawa, S. (1990). Development, differentiation, and maturation of macrophages in the fetal mouse liver. *J Leukoc Biol*, 48(1), 27-37.
- Nakamura, F., Stossel, T. P., & Hartwig, J. H. (2011). The filamins: organizers of cell structure and function. *Cell Adh Migr*, 5(2), 160-169.
- Nardacci, R., Antinori, A., Kroemer, G., & Piacentini, M. (2005). Cell death mechanisms in HIV-associated dementia: the involvement of syncytia. *Cell Death Differ*, 12 Suppl 1, 855-858. doi: 10.1038/sj.cdd.4401590
- Nathan, C., & Ding, A. (2010). Nonresolving inflammation. *Cell*, 140(6), 871-882. doi: 10.1016/j.cell.2010.02.029
- Nelson, C. M., & Bissell, M. J. (2006). Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 22, 287-309. doi: 10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104315
- Nickeleit, I., Zender, S., Kossatz, U., & Malek, N. P. (2007). p27kip1: a target for tumor therapies? *Cell Div*, 2, 13. doi: 10.1186/1747-1028-2-13
- Niggli, V., & Rossy, J. (2008). Ezrin/radixin/moesin: versatile controllers of signaling molecules and of the cortical cytoskeleton. *Int J Biochem Cell Biol*, 40(3), 344-349. doi: 10.1016/j.biocel.2007.02.012
- Nobes, C. D., & Hall, A. (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, 81(1), 53-62.
- Nourshargh, S., & Marelli-Berg, F. M. (2005). Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function. *Trends Immunol*, 26(3), 157-165. doi: 10.1016/j.it.2005.01.006
- Ogino, S., Shima, K., Nosho, K., Irahara, N., Baba, Y., Wolpin, B. M., . . . Fuchs, C. S. (2009). A cohort study of p27 localization in colon cancer, body mass index, and patient survival. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 18(6), 1849-1858. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-09-0181
- Oguma, K., Oshima, H., Aoki, M., Uchio, R., Naka, K., Nakamura, S., . . . Oshima, M. (2008). Activated macrophages promote Wnt signalling through tumour necrosis factor-alpha in gastric tumour cells. *EMBO J*, 27(12), 1671-1681. doi: 10.1038/emboj.2008.105
- Ohnishi, T., Matsumura, H., Izumoto, S., Hiraga, S., & Hayakawa, T. (1998). A novel model of glioma cell invasion using organotypic brain slice culture. *Cancer Res*, 58(14), 2935-2940.

- Ojalvo, L. S., King, W., Cox, D., & Pollard, J. W. (2009). High-density gene expression analysis of tumor-associated macrophages from mouse mammary tumors. *Am J Pathol*, *174*(3), 1048-1064. doi: 10.2353/ajpath.2009.080676
- Oosterling, S. J., van der Bij, G. J., Meijer, G. A., Tuk, C. W., van Garderen, E., van Rooijen, N., . . . van Egmond, M. (2005). Macrophages direct tumour histology and clinical outcome in a colon cancer model. *J Pathol*, *207*(2), 147-155. doi: 10.1002/path.1830
- Orgaz, J. L., Pandya, P., Dalmeida, R., Karagiannis, P., Sanchez-Laorden, B., Viros, A., . . . Sanz-Moreno, V. (2014). Diverse matrix metalloproteinase functions regulate cancer amoeboid migration. *Nat Commun*, *5*, 4255. doi: 10.1038/ncomms5255
- Ovchinnikov, D. A., van Zuylen, W. J., DeBats, C. E., Alexander, K. A., Kellie, S., & Hume, D. A. (2008). Expression of Gal4-dependent transgenes in cells of the mononuclear phagocyte system labeled with enhanced cyan fluorescent protein using Csf1r-Gal4VP16/UAS-ECFP double-transgenic mice. *J Leukoc Biol*, *83*(2), 430-433. doi: 10.1189/jlb.0807585
- Page-McCaw, A., Ewald, A. J., & Werb, Z. (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *8*(3), 221-233. doi: 10.1038/nrm2125
- Page, H., Flood, P., & Reynaud, E. G. (2013). Three-dimensional tissue cultures: current trends and beyond. *Cell Tissue Res*, *352*(1), 123-131. doi: 10.1007/s00441-012-1441-5
- Palframan, R. T., Jung, S., Cheng, G., Weninger, W., Luo, Y., Dorf, M., . . . von Andrian, U. H. (2001). Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues. *J Exp Med*, *194*(9), 1361-1373.
- Pankova, K., Rosel, D., Novotny, M., & Brabek, J. (2010). The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells. *Cell Mol Life Sci*, *67*(1), 63-71. doi: 10.1007/s00018-009-0132-1
- Park, C. C., Zhang, H. J., Yao, E. S., Park, C. J., & Bissell, M. J. (2008). Beta1 integrin inhibition dramatically enhances radiotherapy efficacy in human breast cancer xenografts. *Cancer Res*, *68*(11), 4398-4405. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6390
- Parwaresch, M. R., & Wacker, H. H. (1984). Origin and kinetics of resident tissue macrophages. Parabiosis studies with radiolabelled leucocytes. *Cell Tissue Kinet*, *17*(1), 25-39.
- Paszek, M. J., Zahir, N., Johnson, K. R., Lakins, J. N., Rozenberg, G. I., Gefen, A., . . . Weaver, V. M. (2005). Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell*, *8*(3), 241-254. doi: 10.1016/j.ccr.2005.08.010
- Patsialou, A., Wyckoff, J., Wang, Y., Goswami, S., Stanley, E. R., & Condeelis, J. S. (2009). Invasion of human breast cancer cells in vivo requires both paracrine and autocrine loops involving the colony-stimulating factor-1 receptor. *Cancer Res*, *69*(24), 9498-9506. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1868
- Paulus, P., Stanley, E. R., Schafer, R., Abraham, D., & Aharinejad, S. (2006). Colony-stimulating factor-1 antibody reverses chemoresistance in human MCF-7 breast cancer xenografts. *Cancer Res*, *66*(8), 4349-4356. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3523
- Perno, C. F., Svicher, V., Schols, D., Pollicita, M., Balzarini, J., & Aquaro, S. (2006). Therapeutic strategies towards HIV-1 infection in macrophages. *Antiviral Res*, *71*(2-3), 293-300. doi: 10.1016/j.antiviral.2006.05.015
- Petrie, R. J., Doyle, A. D., & Yamada, K. M. (2009). Random versus directionally persistent cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *10*(8), 538-549. doi: 10.1038/nrm2729
- Peyton, S. R., Kim, P. D., Ghajar, C. M., Seliktar, D., & Putnam, A. J. (2008). The effects of matrix stiffness and RhoA on the phenotypic plasticity of smooth muscle cells in a 3-D biosynthetic hydrogel system. *Biomaterials*, *29*(17), 2597-2607. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.02.005

- Pinderski, L. J., Fischbein, M. P., Subbanagounder, G., Fishbein, M. C., Kubo, N., Cheroutre, H., . . . Boisvert, W. A. (2002). Overexpression of interleukin-10 by activated T lymphocytes inhibits atherosclerosis in LDL receptor-deficient Mice by altering lymphocyte and macrophage phenotypes. *Circ Res*, *90*(10), 1064-1071.
- Platt, A. M., Bain, C. C., Bordon, Y., Sester, D. P., & Mowat, A. M. (2010). An independent subset of TLR expressing CCR2-dependent macrophages promotes colonic inflammation. *J Immunol*, *184*(12), 6843-6854. doi: 10.4049/jimmunol.0903987
- Poincloux, R., Vincent, C., Labrousse, A., Castandet, J., Rigo, M., Cougoule, C., . . . Maridonneau-Parini, I. (2006). Re-arrangements of podosome structures are observed when Hck is activated in myeloid cells. *Eur J Cell Biol*, *85*(3-4), 327-332. doi: 10.1016/j.ejcb.2005.09.012
- Pollard, J. W. (2004). Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer*, *4*(1), 71-78. doi: 10.1038/nrc1256
- Pollard, J. W. (2009). Trophic macrophages in development and disease. *Nat Rev Immunol*, *9*(4), 259-270. doi: 10.1038/nri2528
- Pollard, T. D., & Borisy, G. G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, *112*(4), 453-465.
- Prasse, A., Germann, M., Pechkovsky, D. V., Markert, A., Verres, T., Stahl, M., . . . Zissel, G. (2007). IL-10-producing monocytes differentiate to alternatively activated macrophages and are increased in atopic patients. *J Allergy Clin Immunol*, *119*(2), 464-471. doi: 10.1016/j.jaci.2006.09.030
- Provenzano, P. P., Inman, D. R., Eliceiri, K. W., Trier, S. M., & Keely, P. J. (2008). Contact guidance mediated three-dimensional cell migration is regulated by Rho/ROCK-dependent matrix reorganization. *Biophys J*, *95*(11), 5374-5384. doi: 10.1529/biophysj.108.133116
- Pyonteck, S. M., Akkari, L., Schuhmacher, A. J., Bowman, R. L., Sevenich, L., Quail, D. F., . . . Joyce, J. A. (2013). CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nat Med*, *19*(10), 1264-1272. doi: 10.1038/nm.3337
- Qian, B., Deng, Y., Im, J. H., Muschel, R. J., Zou, Y., Li, J., . . . Pollard, J. W. (2009). A distinct macrophage population mediates metastatic breast cancer cell extravasation, establishment and growth. *PLoS One*, *4*(8), e6562. doi: 10.1371/journal.pone.0006562
- Qian, B. Z., Li, J., Zhang, H., Kitamura, T., Zhang, J., Campion, L. R., . . . Pollard, J. W. (2011). CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature*, *475*(7355), 222-225. doi: 10.1038/nature10138
- Qian, B. Z., & Pollard, J. W. (2010). Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*, *141*(1), 39-51. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.014
- Raja, S. G. (2012). Evaluation of clinical efficacy of fasudil for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov*, *7*(2), 100-104.
- Renkawitz, J., Schumann, K., Weber, M., Lammermann, T., Pflücke, H., Piel, M., . . . Sixt, M. (2009). Adaptive force transmission in amoeboid cell migration. *Nat Cell Biol*, *11*(12), 1438-1443. doi: 10.1038/ncb1992
- Reyes, S. B., Narayanan, A. S., Lee, H. S., Tchaicha, J. H., Aldape, K. D., Lang, F. F., . . . McCarty, J. H. (2013). α v β 8 integrin interacts with RhoGDI1 to regulate Rac1 and Cdc42 activation and drive glioblastoma cell invasion. *Mol Biol Cell*, *24*(4), 474-482. doi: 10.1091/mbc.E12-07-0521
- Richards, D. M., Hettinger, J., & Feuerer, M. (2013). Monocytes and macrophages in cancer: development and functions. *Cancer Microenviron*, *6*(2), 179-191. doi: 10.1007/s12307-012-0123-x
- Ritsma, L., Steller, E. J., Beerling, E., Loomans, C. J., Zomer, A., Gerlach, C., . . . van Rheenen, J. (2012). Intravital microscopy through an abdominal imaging window

- reveals a pre-micrometastasis stage during liver metastasis. *Sci Transl Med*, 4(158), 158ra145. doi: 10.1126/scitranslmed.3004394
- Robinson-Smith, T. M., Isaacsohn, I., Mercer, C. A., Zhou, M., Van Rooijen, N., Husseinzadeh, N., . . . Drew, A. F. (2007). Macrophages mediate inflammation-enhanced metastasis of ovarian tumors in mice. *Cancer Res*, 67(12), 5708-5716. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4375
- Robinson, S. N., Pisarev, V. M., Chavez, J. M., Singh, R. K., & Talmadge, J. E. (2003). Use of matrix metalloproteinase (MMP)-9 knockout mice demonstrates that MMP-9 activity is not absolutely required for G-CSF or Flt-3 ligand-induced hematopoietic progenitor cell mobilization or engraftment. *Stem Cells*, 21(4), 417-427. doi: 10.1634/stemcells.21-4-417
- Rohatgi, R., Ma, L., Miki, H., Lopez, M., Kirchhausen, T., Takenawa, T., & Kirschner, M. W. (1999). The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell*, 97(2), 221-231.
- Rorth, P. (2007). Collective guidance of collective cell migration. *Trends Cell Biol*, 17(12), 575-579. doi: 10.1016/j.tcb.2007.09.007
- Routhier, A., Astuccio, M., Lahey, D., Monfredo, N., Johnson, A., Callahan, W., . . . Bryan, B. (2010). Pharmacological inhibition of Rho-kinase signaling with Y-27632 blocks melanoma tumor growth. *Oncol Rep*, 23(3), 861-867.
- Rowe, R. G., & Weiss, S. J. (2009). Navigating ECM barriers at the invasive front: the cancer cell-stroma interface. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 25, 567-595. doi: 10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175315
- Ryder, M., Ghossein, R. A., Ricarte-Filho, J. C., Knauf, J. A., & Fagin, J. A. (2008). Increased density of tumor-associated macrophages is associated with decreased survival in advanced thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*, 15(4), 1069-1074. doi: 10.1677/ERC-08-0036
- Sabeh, F., Ota, I., Holmbeck, K., Birkedal-Hansen, H., Soloway, P., Balbin, M., . . . Weiss, S. J. (2004). Tumor cell traffic through the extracellular matrix is controlled by the membrane-anchored collagenase MT1-MMP. *J Cell Biol*, 167(4), 769-781. doi: 10.1083/jcb.200408028
- Saccani, A., Schioppa, T., Porta, C., Biswas, S. K., Nebuloni, M., Vago, L., . . . Sica, A. (2006). p50 nuclear factor-kappaB overexpression in tumor-associated macrophages inhibits M1 inflammatory responses and antitumor resistance. *Cancer Res*, 66(23), 11432-11440. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1867
- Sahai, E., & Marshall, C. J. (2003). Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol*, 5(8), 711-719. doi: 10.1038/ncb1019
- Saji, H., Koike, M., Yamori, T., Saji, S., Seiki, M., Matsushima, K., & Toi, M. (2001). Significant correlation of monocyte chemoattractant protein-1 expression with neovascularization and progression of breast carcinoma. *Cancer*, 92(5), 1085-1091.
- Salmon, H., Franciszkiewicz, K., Damotte, D., Dieu-Nosjean, M. C., Validire, P., Trautmann, A., . . . Donnadieu, E. (2012). Matrix architecture defines the preferential localization and migration of T cells into the stroma of human lung tumors. *J Clin Invest*, 122(3), 899-910. doi: 10.1172/JCI45817
- Sangaletti, S., Di Carlo, E., Gariboldi, S., Miotti, S., Cappetti, B., Parenza, M., . . . Colombo, M. P. (2008). Macrophage-derived SPARC bridges tumor cell-extracellular matrix interactions toward metastasis. *Cancer Res*, 68(21), 9050-9059. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1327
- Sapi, E., & Kacinski, B. M. (1999). The role of CSF-1 in normal and neoplastic breast physiology. *Proc Soc Exp Biol Med*, 220(1), 1-8.

- Sawyer, R. T., Strausbauch, P. H., & Volkman, A. (1982). Resident macrophage proliferation in mice depleted of blood monocytes by strontium-89. *Lab Invest*, *46*(2), 165-170.
- Schafer, M., & Werner, S. (2008). Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *9*(8), 628-638. doi: 10.1038/nrm2455
- Schmid, M. C., Avraamides, C. J., Foubert, P., Shaked, Y., Kang, S. W., Kerbel, R. S., & Varner, J. A. (2011). Combined blockade of integrin- $\alpha 4\beta 1$ plus cytokines SDF-1 α or IL-1 β potently inhibits tumor inflammation and growth. *Cancer Res*, *71*(22), 6965-6975. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0588
- Scholl, S. M., Pallud, C., Beuvon, F., Hacene, K., Stanley, E. R., Rohrschneider, L., . . . Lidereau, R. (1994). Anti-colony-stimulating factor-1 antibody staining in primary breast adenocarcinomas correlates with marked inflammatory cell infiltrates and prognosis. *J Natl Cancer Inst*, *86*(2), 120-126.
- Schoupe, E., Mommer, C., Movahedi, K., Laoui, D., Morias, Y., Gysemans, C., . . . Van Ginderachter, J. A. (2013). Tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subsets exert either inhibitory or stimulatory effects on distinct CD8⁺ T-cell activation events. *Eur J Immunol*, *43*(11), 2930-2942. doi: 10.1002/eji.201343349
- Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., & Hume, D. A. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*, *75*(2), 163-189. doi: 10.1189/jlb.0603252
- Schurigt, U., Hummel, K. M., Petrow, P. K., Gajda, M., Stockigt, R., Middel, P., . . . Brauer, R. (2008). Cathepsin K deficiency partially inhibits, but does not prevent, bone destruction in human tumor necrosis factor-transgenic mice. *Arthritis Rheum*, *58*(2), 422-434. doi: 10.1002/art.23224
- Seano, G., Chiaverina, G., Gagliardi, P. A., di Blasio, L., Puliafito, A., Bouvard, C., . . . Primo, L. (2014). Endothelial podosome rosettes regulate vascular branching in tumour angiogenesis. *Nat Cell Biol*, *16*(10), 931-941. doi: 10.1038/ncb3036
- Seano, G., Daubon, T., Genot, E., & Primo, L. (2014). Podosomes as novel players in endothelial biology. *Eur J Cell Biol*. doi: 10.1016/j.ejcb.2014.07.009
- Seftor, R. E., Seftor, E. A., Gehlsen, K. R., Stetler-Stevenson, W. G., Brown, P. D., Ruoslahti, E., & Hendrix, M. J. (1992). Role of the $\alpha v \beta 3$ integrin in human melanoma cell invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *89*(5), 1557-1561.
- Serbina, N. V., Jia, T., Hohl, T. M., & Pamer, E. G. (2008). Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol*, *26*, 421-452. doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090326
- Serhan, C. N. (2007). Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annu Rev Immunol*, *25*, 101-137. doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141647
- Serhan, C. N., & Savill, J. (2005). Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol*, *6*(12), 1191-1197. doi: 10.1038/ni1276
- Shand, F. H., Ueha, S., Otsuji, M., Koid, S. S., Shichino, S., Tsukui, T., . . . Matsushima, K. (2014). Tracking of intertissue migration reveals the origins of tumor-infiltrating monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(21), 7771-7776. doi: 10.1073/pnas.1402914111
- Shechter, R., London, A., Varol, C., Raposo, C., Cusimano, M., Yovel, G., . . . Schwartz, M. (2009). Infiltrating blood-derived macrophages are vital cells playing an anti-inflammatory role in recovery from spinal cord injury in mice. *PLoS Med*, *6*(7), e1000113. doi: 10.1371/journal.pmed.1000113
- Sheetz, M. P., Felsenfeld, D. P., & Galbraith, C. G. (1998). Cell migration: regulation of force on extracellular-matrix-integrin complexes. *Trends Cell Biol*, *8*(2), 51-54.
- Shi, C., & Pamer, E. G. (2011). Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*, *11*(11), 762-774. doi: 10.1038/nri3070

- Shin, I., Yakes, F. M., Rojo, F., Shin, N. Y., Bakin, A. V., Baselga, J., & Arteaga, C. L. (2002). PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat Med*, 8(10), 1145-1152. doi: 10.1038/nm759
- Shoulders, M. D., & Raines, R. T. (2009). Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem*, 78, 929-958. doi: 10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833
- Sica, A., Allavena, P., & Mantovani, A. (2008). Cancer related inflammation: the macrophage connection. *Cancer Lett*, 267(2), 204-215. doi: 10.1016/j.canlet.2008.03.028
- Sica, A., Larghi, P., Mancino, A., Rubino, L., Porta, C., Totaro, M. G., . . . Mantovani, A. (2008). Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol*, 18(5), 349-355. doi: 10.1016/j.semcancer.2008.03.004
- Sica, A., Porta, C., Morlacchi, S., Banfi, S., Strauss, L., Rimoldi, M., . . . Riboldi, E. (2012). Origin and Functions of Tumor-Associated Myeloid Cells (TAMCs). *Cancer Microenviron*, 5(2), 133-149. doi: 10.1007/s12307-011-0091-6
- Sidani, M., Wyckoff, J., Xue, C., Segall, J. E., & Condeelis, J. (2006). Probing the microenvironment of mammary tumors using multiphoton microscopy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 11(2), 151-163. doi: 10.1007/s10911-006-9021-5
- Silva, M. T. (2010). When two is better than one: macrophages and neutrophils work in concert in innate immunity as complementary and cooperative partners of a myeloid phagocyte system. *J Leukoc Biol*, 87(1), 93-106.
- Smith, H. O., Anderson, P. S., Kuo, D. Y., Goldberg, G. L., DeVictoria, C. L., Boocock, C. A., . . . Pollard, J. W. (1995). The role of colony-stimulating factor 1 and its receptor in the etiopathogenesis of endometrial adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, 1(3), 313-325.
- Smith, J. D., Trogan, E., Ginsberg, M., Grigaux, C., Tian, J., & Miyata, M. (1995). Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(18), 8264-8268.
- Soehnlein, O., & Lindbom, L. (2010). Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*, 10(6), 427-439. doi: 10.1038/nri2779
- Soehnlein, O., Weber, C., & Lindbom, L. (2009). Neutrophil granule proteins tune monocytic cell function. *Trends Immunol*, 30(11), 538-546. doi: 10.1016/j.it.2009.06.006
- Solinas, G., Schiarea, S., Liguori, M., Fabbri, M., Pesce, S., Zammataro, L., . . . Allavena, P. (2010). Tumor-conditioned macrophages secrete migration-stimulating factor: a new marker for M2-polarization, influencing tumor cell motility. *J Immunol*, 185(1), 642-652. doi: 10.4049/jimmunol.1000413
- Stanley, E. R. (2009). Lineage commitment: cytokines instruct, at last! *Cell Stem Cell*, 5(3), 234-236. doi: 10.1016/j.stem.2009.08.015
- Suetsugu, S., Miki, H., Yamaguchi, H., Obinata, T., & Takenawa, T. (2001). Enhancement of branching efficiency by the actin filament-binding activity of N-WASP/WAVE2. *J Cell Sci*, 114(Pt 24), 4533-4542.
- Swann, J. B., Vesely, M. D., Silva, A., Sharkey, J., Akira, S., Schreiber, R. D., & Smyth, M. J. (2008). Demonstration of inflammation-induced cancer and cancer immunoediting during primary tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(2), 652-656. doi: 10.1073/pnas.0708594105
- Swider, P., Conroy, M., Pedrono, A., Ambard, D., Mantell, S., Soballe, K., & Bechtold, J. E. (2007). Use of high-resolution MRI for investigation of fluid flow and global permeability in a material with interconnected porosity. *J Biomech*, 40(9), 2112-2118. doi: 10.1016/j.jbiomech.2006.10.002
- Tagliani, E., Shi, C., Nancy, P., Tay, C. S., Pamer, E. G., & Erlebacher, A. (2011). Coordinate regulation of tissue macrophage and dendritic cell population dynamics by CSF-1. *J Exp Med*, 208(9), 1901-1916. doi: 10.1084/jem.20110866

- Takahashi, K., & Naito, M. (1993). Development, differentiation, and proliferation of macrophages in the rat yolk sac. *Tissue Cell*, 25(3), 351-362.
- Takahashi, K., Yamamura, F., & Naito, M. (1989). Differentiation, maturation, and proliferation of macrophages in the mouse yolk sac: a light-microscopic, enzyme-cytochemical, immunohistochemical, and ultrastructural study. *J Leukoc Biol*, 45(2), 87-96.
- Takahashi, M., Masuyama, J., Ikeda, U., Kasahara, T., Kitagawa, S., Takahashi, Y., . . . Kano, S. (1995). Induction of monocyte chemoattractant protein-1 synthesis in human monocytes during transendothelial migration in vitro. *Circ Res*, 76(5), 750-757.
- Talks, K. L., Turley, H., Gatter, K. C., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., & Harris, A. L. (2000). The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol*, 157(2), 411-421.
- Tan, H. B., Zhong, Y. S., Cheng, Y., & Shen, X. (2011). Rho/ROCK pathway and neural regeneration: a potential therapeutic target for central nervous system and optic nerve damage. *Int J Ophthalmol*, 4(6), 652-657. doi: 10.3980/j.issn.2222-3959.2011.06.16
- Tanaka, K., Kurebayashi, J., Sohda, M., Nomura, T., Prabhakar, U., Yan, L., & Sonoo, H. (2009). The expression of monocyte chemotactic protein-1 in papillary thyroid carcinoma is correlated with lymph node metastasis and tumor recurrence. *Thyroid*, 19(1), 21-25. doi: 10.1089/thy.2008.0237
- Teitelbaum, S. L., & Ross, F. P. (2003). Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet*, 4(8), 638-649. doi: 10.1038/nrg1122
- Torroella-Kouri, M., Silvera, R., Rodriguez, D., Caso, R., Shatry, A., Opiela, S., . . . Lopez, D. M. (2009). Identification of a subpopulation of macrophages in mammary tumor-bearing mice that are neither M1 nor M2 and are less differentiated. *Cancer Res*, 69(11), 4800-4809. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3427
- Tschumperlin, D. J. (2013). Fibroblasts and the ground they walk on. *Physiology (Bethesda)*, 28(6), 380-390. doi: 10.1152/physiol.00024.2013
- Tu, C., Ortega-Cava, C. F., Chen, G., Fernandes, N. D., Cavallo-Medved, D., Sloane, B. F., . . . Band, H. (2008). Lysosomal cathepsin B participates in the podosome-mediated extracellular matrix degradation and invasion via secreted lysosomes in v-Src fibroblasts. *Cancer Res*, 68(22), 9147-9156. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5127
- Turk, V., Stoka, V., Vasiljeva, O., Renko, M., Sun, T., Turk, B., & Turk, D. (2012). Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim Biophys Acta*, 1824(1), 68-88. doi: 10.1016/j.bbapap.2011.10.002
- Turner, C. E. (2000). Paxillin and focal adhesion signalling. *Nat Cell Biol*, 2(12), E231-236. doi: 10.1038/35046659
- Ulrich, T. A., Jain, A., Tanner, K., MacKay, J. L., & Kumar, S. (2010). Probing cellular mechanobiology in three-dimensional culture with collagen-agarose matrices. *Biomaterials*, 31(7), 1875-1884. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.10.047
- van den Dries, K., Meddens, M. B., de Keijzer, S., Shekhar, S., Subramaniam, V., Figdor, C. G., & Cambi, A. (2013). Interplay between myosin IIA-mediated contractility and actin network integrity orchestrates podosome composition and oscillations. *Nat Commun*, 4, 1412. doi: 10.1038/ncomms2402
- Van Goethem, E., Guiet, R., Balor, S., Charriere, G. M., Poincloux, R., Labrousse, A., . . . Le Cabec, V. (2011). Macrophage podosomes go 3D. *Eur J Cell Biol*, 90(2-3), 224-236. doi: 10.1016/j.ejcb.2010.07.011
- Van Goethem, E., Poincloux, R., Gauffre, F., Maridonneau-Parini, I., & Le Cabec, V. (2010). Matrix architecture dictates three-dimensional migration modes of human macrophages: differential involvement of proteases and podosome-like structures. *J Immunol*, 184(2), 1049-1061. doi: 10.4049/jimmunol.0902223

- Varney, M. L., Johansson, S. L., & Singh, R. K. (2005). Tumour-associated macrophage infiltration, neovascularization and aggressiveness in malignant melanoma: role of monocyte chemotactic protein-1 and vascular endothelial growth factor-A. *Melanoma Res*, *15*(5), 417-425.
- Varol, C., Vallon-Eberhard, A., Elinav, E., Aychek, T., Shapira, Y., Luche, H., . . . Jung, S. (2009). Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions. *Immunity*, *31*(3), 502-512. doi: 10.1016/j.immuni.2009.06.025
- Vartiainen, M. K., & Machesky, L. M. (2004). The WASP-Arp2/3 pathway: genetic insights. *Curr Opin Cell Biol*, *16*(2), 174-181. doi: 10.1016/j.ceb.2004.02.004
- Vaughan, R. B., & Trinkaus, J. P. (1966). Movements of epithelial cell sheets in vitro. *J Cell Sci*, *1*(4), 407-413.
- Verollet, C., Charriere, G. M., Labrousse, A., Cougoule, C., Le Cabec, V., & Maridonneau-Parini, I. (2011). Extracellular proteolysis in macrophage migration: losing grip for a breakthrough. *Eur J Immunol*, *41*(10), 2805-2813. doi: 10.1002/eji.201141538
- Vicente-Manzanares, M., Webb, D. J., & Horwitz, A. R. (2005). Cell migration at a glance. *J Cell Sci*, *118*(Pt 21), 4917-4919. doi: 10.1242/jcs.02662
- Viglietto, G., Motti, M. L., Bruni, P., Melillo, R. M., D'Alessio, A., Califano, D., . . . Santoro, M. (2002). Cytoplasmic relocation and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nat Med*, *8*(10), 1136-1144. doi: 10.1038/nm762
- Vignjevic, D., Schoumacher, M., Gavert, N., Janssen, K. P., Jih, G., Lae, M., . . . Robine, S. (2007). Fascin, a novel target of beta-catenin-TCF signaling, is expressed at the invasive front of human colon cancer. *Cancer Res*, *67*(14), 6844-6853. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0929
- Voisin, M. B., Probstl, D., & Nourshargh, S. (2010). Venular basement membranes ubiquitously express matrix protein low-expression regions: characterization in multiple tissues and remodeling during inflammation. *Am J Pathol*, *176*(1), 482-495. doi: 10.2353/ajpath.2010.090510
- Wang, W., Wyckoff, J. B., Frohlich, V. C., Olynykov, Y., Huttelmaier, S., Zavadil, J., . . . Condeelis, J. S. (2002). Single cell behavior in metastatic primary mammary tumors correlated with gene expression patterns revealed by molecular profiling. *Cancer Res*, *62*(21), 6278-6288.
- Watanabe, N., & Higashida, C. (2004). Formins: processive cappers of growing actin filaments. *Exp Cell Res*, *301*(1), 16-22. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.08.020
- Weaver, A. M., Young, M. E., Lee, W. L., & Cooper, J. A. (2003). Integration of signals to the Arp2/3 complex. *Curr Opin Cell Biol*, *15*(1), 23-30.
- Webb, D. J., Donais, K., Whitmore, L. A., Thomas, S. M., Turner, C. E., Parsons, J. T., & Horwitz, A. F. (2004). FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat Cell Biol*, *6*(2), 154-161. doi: 10.1038/ncb1094
- Weber, C., Belge, K. U., von Hundelshausen, P., Draude, G., Steppich, B., Mack, M., . . . Ziegler-Heitbrock, H. W. (2000). Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. *J Leukoc Biol*, *67*(5), 699-704.
- Weber, M., Hauschild, R., Schwarz, J., Moussion, C., de Vries, I., Legler, D. F., . . . Sixt, M. (2013). Interstitial dendritic cell guidance by haptotactic chemokine gradients. *Science*, *339*(6117), 328-332. doi: 10.1126/science.1228456
- Weijer, C. J. (2009). Collective cell migration in development. *J Cell Sci*, *122*(Pt 18), 3215-3223. doi: 10.1242/jcs.036517
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., & Ferrante, A. W., Jr. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*, *112*(12), 1796-1808. doi: 10.1172/JCI19246

- Wiesner, C., El Azzouzi, K., & Linder, S. (2013). A specific subset of RabGTPases controls cell surface exposure of MT1-MMP, extracellular matrix degradation and three-dimensional invasion of macrophages. *J Cell Sci*, *126*(Pt 13), 2820-2833. doi: 10.1242/jcs.122358
- Wiesner, C., Le-Cabec, V., El Azzouzi, K., Maridonneau-Parini, I., & Linder, S. (2014). Podosomes in space: Macrophage migration and matrix degradation in 2D and 3D settings. *Cell Adh Migr*, *8*(3).
- Wilkinson, S., Paterson, H. F., & Marshall, C. J. (2005). Cdc42-MRCK and Rho-ROCK signalling cooperate in myosin phosphorylation and cell invasion. *Nat Cell Biol*, *7*(3), 255-261. doi: 10.1038/ncb1230
- Willingham, S. B., Volkmer, J. P., Gentles, A. J., Sahoo, D., Dalerba, P., Mitra, S. S., . . . Weissman, I. L. (2012). The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPa) interaction is a therapeutic target for human solid tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*(17), 6662-6667. doi: 10.1073/pnas.1121623109
- Wolf, K., Alexander, S., Schacht, V., Coussens, L. M., von Andrian, U. H., van Rheenen, J., . . . Friedl, P. (2009). Collagen-based cell migration models in vitro and in vivo. *Semin Cell Dev Biol*, *20*(8), 931-941. doi: 10.1016/j.semcdb.2009.08.005
- Wolf, K., & Friedl, P. (2011). Extracellular matrix determinants of proteolytic and non-proteolytic cell migration. *Trends Cell Biol*, *21*(12), 736-744. doi: 10.1016/j.tcb.2011.09.006
- Wolf, K., Mazo, I., Leung, H., Engelke, K., von Andrian, U. H., Deryugina, E. I., . . . Friedl, P. (2003). Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol*, *160*(2), 267-277. doi: 10.1083/jcb.200209006
- Wolf, K., Wu, Y. I., Liu, Y., Geiger, J., Tam, E., Overall, C., . . . Friedl, P. (2007). Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion. *Nat Cell Biol*, *9*(8), 893-904. doi: 10.1038/ncb1616
- Woollard, K. J., & Geissmann, F. (2010). Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nat Rev Cardiol*, *7*(2), 77-86. doi: 10.1038/nrcardio.2009.228
- Wyckoff, J. B., Pinner, S. E., Gschmeissner, S., Condeelis, J. S., & Sahai, E. (2006). ROCK- and myosin-dependent matrix deformation enables protease-independent tumor-cell invasion in vivo. *Curr Biol*, *16*(15), 1515-1523. doi: 10.1016/j.cub.2006.05.065
- Wyckoff, J. B., Wang, Y., Lin, E. Y., Li, J. F., Goswami, S., Stanley, E. R., . . . Condeelis, J. (2007). Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. *Cancer Res*, *67*(6), 2649-2656. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1823
- Wynn, T. A. (2008). Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*, *214*(2), 199-210. doi: 10.1002/path.2277
- Xu, W., Baribault, H., & Adamson, E. D. (1998). Vinculin knockout results in heart and brain defects during embryonic development. *Development*, *125*(2), 327-337.
- Yanai, M., Kenyon, C. M., Butler, J. P., Macklem, P. T., & Kelly, S. M. (1996). Intracellular pressure is a motive force for cell motion in Amoeba proteus. *Cell Motil Cytoskeleton*, *33*(1), 22-29. doi: 10.1002/(SICI)1097-0169(1996)33:1<22::AID-CM3>3.0.CO;2-K
- Yang, L., Huang, J., Ren, X., Gorska, A. E., Chytil, A., Aakre, M., . . . Moses, H. L. (2008). Abrogation of TGF beta signaling in mammary carcinomas recruits Gr-1+CD11b+ myeloid cells that promote metastasis. *Cancer Cell*, *13*(1), 23-35. doi: 10.1016/j.ccr.2007.12.004
- Yang, L., Wang, L., & Zheng, Y. (2006). Gene targeting of Cdc42 and Cdc42GAP affirms the critical involvement of Cdc42 in filopodia induction, directed migration, and proliferation in primary mouse embryonic fibroblasts. *Mol Biol Cell*, *17*(11), 4675-4685. doi: 10.1091/mbc.E06-05-0466

- Yona, S., Kim, K. W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., . . . Jung, S. (2013). Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity*, *38*(1), 79-91. doi: 10.1016/j.immuni.2012.12.001
- Yoshida, K., & Soldati, T. (2006). Dissection of amoeboid movement into two mechanically distinct modes. *J Cell Sci*, *119*(Pt 18), 3833-3844. doi: 10.1242/jcs.03152
- Yoshidome, H., Kohno, H., Shida, T., Kimura, F., Shimizu, H., Ohtsuka, M., . . . Miyazaki, M. (2009). Significance of monocyte chemoattractant protein-1 in angiogenesis and survival in colorectal liver metastases. *Int J Oncol*, *34*(4), 923-930.
- Yumura, S., Mori, H., & Fukui, Y. (1984). Localization of actin and myosin for the study of amoeboid movement in Dictyostelium using improved immunofluorescence. *J Cell Biol*, *99*(3), 894-899.
- Zafir-Lavie, I., Michaeli, Y., & Reiter, Y. (2007). Novel antibodies as anticancer agents. *Oncogene*, *26*(25), 3714-3733. doi: 10.1038/sj.onc.1210372
- Zaidel-Bar, R., Cohen, M., Addadi, L., & Geiger, B. (2004). Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes. *Biochem Soc Trans*, *32*(Pt3), 416-420. doi: 10.1042/BST0320416
- Zamir, E., & Geiger, B. (2001). Components of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci*, *114*(Pt 20), 3577-3579.
- Zeisberger, S. M., Odermatt, B., Marty, C., Zehnder-Fjallman, A. H., Ballmer-Hofer, K., & Schwendener, R. A. (2006). Clodronate-liposome-mediated depletion of tumour-associated macrophages: a new and highly effective antiangiogenic therapy approach. *Br J Cancer*, *95*(3), 272-281. doi: 10.1038/sj.bjc.6603240
- Zhang, J., Patel, L., & Pienta, K. J. (2010). CC chemokine ligand 2 (CCL2) promotes prostate cancer tumorigenesis and metastasis. *Cytokine Growth Factor Rev*, *21*(1), 41-48. doi: 10.1016/j.cytogfr.2009.11.009
- Zhang, X., Jiang, G., Cai, Y., Monkley, S. J., Critchley, D. R., & Sheetz, M. P. (2008). Talin depletion reveals independence of initial cell spreading from integrin activation and traction. *Nat Cell Biol*, *10*(9), 1062-1068. doi: 10.1038/ncb1765
- Zhu, X. D., Zhang, J. B., Zhuang, P. Y., Zhu, H. G., Zhang, W., Xiong, Y. Q., . . . Sun, H. C. (2008). High expression of macrophage colony-stimulating factor in peritumoral liver tissue is associated with poor survival after curative resection of hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol*, *26*(16), 2707-2716. doi: 10.1200/JCO.2007.15.6521
- Ziegler-Heitbrock, L. (2007). The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol*, *81*(3), 584-592. doi: 10.1189/jlb.0806510
- Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D. N., . . . Lutz, M. B. (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, *116*(16), e74-80. doi: 10.1182/blood-2010-02-258558
- Zijlmans, H. J., Fleuren, G. J., Baelde, H. J., Eilers, P. H., Kenter, G. G., & Gorter, A. (2006). The absence of CCL2 expression in cervical carcinoma is associated with increased survival and loss of heterozygosity at 17q11.2. *J Pathol*, *208*(4), 507-517. doi: 10.1002/path.1918
- Zou, P., Yoshihara, H., Hosokawa, K., Tai, I., Shinmyozu, K., Tsukahara, F., . . . Suda, T. (2011). p57(Kip2) and p27(Kip1) cooperate to maintain hematopoietic stem cell quiescence through interactions with Hsc70. *Cell Stem Cell*, *9*(3), 247-261. doi: 10.1016/j.stem.2011.07.003

Characterization of the trans-tissular migration of macrophages

The infiltration of macrophages inside tumors is associated with a poor prognosis. Therefore, the specific control of their trans-tissular migration represents an important therapeutic challenge. My thesis has consisted in identifying the mechanisms involved in this migration. Using approaches allowing the observation of the migration behavior of cells directly inside living tissues (intravital microscopy and *ex vivo* tissue explants), I show that macrophages adopt a distinct migration mode *in vivo* depending on the tissue. In a fibrosarcoma (dense tissue), they use a mesenchymal-like migration (protease-dependent), whereas in the healthy surrounding derma, they use an amoeboid-like migration (protease-independent). Moreover, I identified a protein, p27^{kip1}, involved in mesenchymal migration. In conclusion, by showing that the mesenchymal migration of macrophages exists *in vivo*, particularly in tumors, it could become a promising therapeutic target.

KEYWORDS: macrophage, migration, mesenchymal, amoeboid, cancer, tumor, intravital

AUTEUR : Philippe GUI

TITRE : Caractérisation de la migration trans-tissulaire des macrophages

DIRECTRICE DE THESE : Véronique LE CABEC

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE :

Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, le lundi 1^{er} décembre 2014

RESUME :

L'infiltration de macrophages dans les tumeurs est associée à un mauvais pronostic. Le contrôle de leur migration trans-tissulaire représente donc un enjeu thérapeutique important. Ma thèse a consisté à identifier les mécanismes impliqués dans cette migration. Grâce à des approches d'observation directe du comportement migratoire des cellules dans des tissus vivants (microscopie intravital et explants tissulaires *ex vivo*), je montre que les macrophages *in vivo* adoptent un mode de migration distinct selon le tissu. Dans un fibrosarcome (tissu dense), ils ont une migration de type mésenchymateux (dépendante des protéases), tandis que dans le derme sain adjacent, ils ont une migration de type amiboïde (indépendante des protéases). De plus, j'ai identifié une protéine, p27^{kip1}, impliquée dans la migration mésenchymateuse. Ainsi, en montrant que la migration mésenchymateuse des macrophages existe *in vivo*, notamment dans les tumeurs, elle pourra devenir une cible thérapeutique prometteuse.

MOTS CLES : macrophage, migration, mésenchymateux, amiboïde, cancer, tumeur, intravital

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE :

École Doctorale Biologie-Santé-Biotechnologies – Biologie cellulaire

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE :

Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale – CNRS UMR 5089

BP64182

205 route de Narbonne

31077 Toulouse Cedex04