



HAL
open science

Caractérisations phénotypiques et fonctionnelles des cellules stromales mésenchymateuses au cours du traitement du myélome multiple

Léa Lemaitre

► **To cite this version:**

Léa Lemaitre. Caractérisations phénotypiques et fonctionnelles des cellules stromales mésenchymateuses au cours du traitement du myélome multiple. Cancer. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2020. Français. NNT : 2020TOU30279 . tel-03267695

HAL Id: tel-03267695

<https://theses.hal.science/tel-03267695>

Submitted on 22 Jun 2021

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

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



THÈSE

**En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**
Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Léa LEMAITRE

Le 7 juillet 2020

**Caractérisations phénotypiques et fonctionnelles des cellules
stromales mésenchymateuses au cours du traitement du
Myélome multiple**

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **CANCEROLOGIE**

Unité de recherche :

CRCT - Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse

Thèse dirigée par

Bettina COUDERC et Jill CORRE

Jury

M. Nicolas SEVENET, Rapporteur
Mme Florence APPARAILLY, Rapporteur
Mme Patricia LEMARCHAND, Rapporteur
Mme Isabelle ADER, Examinatrice
Mme Bettina COUDERC, Directrice de thèse
Mme Jill CORRE, Co-directrice de thèse

REMERCIEMENTS

Aux rapporteurs et membres du jury

Je remercie le Docteur **Florence APPARAILLY**, le docteur **Patricia LEMARCHAND** et le Professeur **Nicolas SEVENET** d'avoir accepté de juger mon travail de thèse et d'avoir été patient avec tous les rebondissements que nous avons pu avoir pour l'envoi de ce manuscrit.

Merci également aux docteurs **Isabelle ADER-PERARNAU** pour avoir été si bienveillante lors de ma thèse. Merci aussi pour tous les petits conseils que tu as pu m'apporter, aussi bien sur mes travaux que sur ma vie future, lors des comités de thèse et de mes venues à l'EFS. Et bien sur un grand merci d'avoir accepté d'examiner cette thèse.

Aux directeurs de thèse

A madame Bettina COUDERC

Je ne te remercierai jamais assez d'avoir encadré ces longs travaux de thèse, de m'avoir si bien accueilli et montré la voie mais surtout la réflexion scientifique à avoir. Bien entendu aussi pour toutes tes qualités humaines, d'avoir été une mère pour moi, d'anticiper toutes les choses auxquelles je ne pense pas (« mais tu veux faire un post doc à l'étranger... mais ton amoureux pourra te suivre ?! »), d'être toujours là pour me relire, me conseiller, m'aiguiller, à n'importe quel moment, de m'avoir remonté le moral dans les moments difficiles. Mais aussi sur le plan scientifique, de m'avoir appris le vocabulaire scientifique, la transduction, de m'avoir trimbalé dans des supers congrès au Portugal, de m'avoir soutenue sur toutes mes idées loufoques de nouvelles manip à faire. Et bien sûr ta plus grande qualité, ta gentillesse et ta bienveillance envers n'importe qui, qui resteront pour moi un exemple pour toujours.

A madame Jill CORRE

Un grand merci pour nous avoir accueillie avec Bettina dans notre phase de transition d'équipe, de nous avoir proposé ce beau projet sur le microenvironnement du MM. Malgré notre éloignement géographique tu as quand même su rester présente et surtout me former sur la rigueur que tu as dans le travail, l'écriture et la présentation des résultats. Pour finir un grand merci pour ta bienveillance, pour m'avoir, du mieux que tu pouvais, aidé et défendue et bien sûr présentée aux bonnes personnes aux bons moments. Pardon par avance pour les fautes d'orthographe qu'il restera dans ces remerciements, c'est simplement pour ajouter ma touche personnelle à ce manuscrit.

A mes amis de Bordeaux

Les premiers l'équipe de Haut Leveque, des amis de tous les horizons. **Anaëlle** et **Camille**, mes copines de la pause qui sont restées là pour la première garde, et **Mr S** pour m'avoir fichu unes de ses trouilles pendant ma première garde mais aussi pour nous avoir toujours fait bien rire pendant ses 6 mois. Bien sûr à mes amis co-internes de haut Leveque que je garderai toujours dans mon cœur, maman **Manon**, maman **Caro**, maman **Camille** et heureusement pas maman **Elina** et **MarineD** (il en faut bien qui ne soient pas encore maman) et que je continuerai toujours à venir embêter le temps d'un WE à Bordeaux.

Bien sûr **Camille G/B** ma best génialissime co-interne ever, avec un début difficile avec l'épisode du premier jour, de cet écureuil (paix à son âme), de ce co-voiturage de tous les jours, de nos interminables pauses thé, de notre découverte qui fut une vrai et belle rencontre d'une fille tellement géniale avec un cœur d'or, immense, toujours positive et prête à te trouver une solution à tout. Finalement le plus dur a été de se quitter, de finir ce stage et de déménager, la séparation a été dur mais ne nous a pas totalement éloigné et j'en suis tellement heureuse. Tu resteras bien entendu ma grande amie bordelaise que je n'aurai jamais pensé avoir.

Pour finir ce paragraphe sur Bordeaux, mon 2^{ème} stage, ma famille de Bergo, des personnes formidables et humaines, **Eglantine** ma copine sportive, **Jennifer** la première bio-info que j'ai rencontré, **Virginie** qui m'a fait découvrir les consultations d'oncogénétique et bien sur toute l'équipe qui m'a appris à designer des primers et faire mes premières PCR.

A mes amis du labo (de l'équipe 17 à l'équipe 13)

Mes Mentors, **Augustin** et **Benoit**, merci de m'avoir montré la voie, conseillée en toute occasion mais aussi fait bien rigolée quand il le fallait dans ces dernières années. Merci à vous 2 de m'avoir transmis toutes vos connaissances sur les MSC et sur les blagues toujours déplacées, de m'avoir conseillée sur les choses à faire ou pas pour mon avenir et bien sûr aider à devenir la scientifique je suis aujourd'hui. A tous nos western transparents.

Merci à l'équipe 17, à **Julie** qui m'aura appris la rigueur scientifique, à **Elvire** copine de master, à **Nicole** toujours bienveillante et prête à aider et à **Célia** pour m'avoir appris un paquet de choses sur les westerns.

Merci à toute l'équipe 13 pour nous avoir accueilli dans notre changement d'équipe, aux **techniciens de l'UGM** pour m'avoir si bien expliqué votre quotidien et appelé régulièrement pour les prélèvements de patients. A toute l'équipe « coté recherche » pour m'avoir soutenue quand les résultats négatifs se succédaient. **Marianne**, nos petites rando avec les garçons mais aussi ton aide sur « la cytométrie et l'immunologie pour les nuls ». **Andréa** pour m'avoir si bien montré et formé en animalerie, en cytométrie en blagues bizarre et autres expressions Françaises, pour m'avoir soutenue aussi quand ça n'allait pas. **MVMJJ**, qui m'a montré et formé sur la voie des MSC et de l'ortograff, merci pour ces belles années avec des haut, des bas (la petite jupe orange sublime), des gros chats, des rafistolages de bijoux, de moral, les meilleurs plans resto de Toulouse et surtout d'avoir toujours répondu présente pour mes

« petites » manip de dernières minutes. **Nadège**, qui m'a toujours fait comprendre qu'il y a plus grave dans la vie qu'une manip raté, merci de m'avoir si bien enseigné tout ton savoir murin et d'avoir su écouter et conseillé quand ça n'allait pas. **Tchoupi**, merci pour toutes les heures de F- que tu as pu faire pour nous récupérer des cellules et nous avancer notre travail quand on est grave à la bourre, pour m'avoir toujours soutenue dans le ménage et le stock, mais surtout pour m'avoir tellement fait rire ce jour où tu étais avec Axel au téléphone et que burp.... **Sousou** merci pour toutes tes connaissances et ton savoir que tu partages toujours sans compter, pour ta patience, ton écoute et tous les bons conseils que tu as pu m'apporter, pour nos courts trajets à vélo pour aller au labo et bien sur tous tes bons petits plats/gâteaux que je n'oublierai jamais. Et bien sûr **Ludo**, le « chef-cool » merci pour ta connaissance et ton savoir infini et pour m'avoir sorti du pétrin quand il le fallait, pour ton aide scientifique, anglaise, pour toutes les relectures que tu as pu faire, les bons conseils avec les Australiens et bien sûr merci de m'avoir fait confiance pour travailler un peu avec toi.

Il ne faudrait pas oublier « l'autre côté » ma **Laura** des chats merci mille milliards de fois pour ton écoute immense et innombrable, tes analyses et tes conseils bio info tout aussi immense et innombrables (même pendant tes congés...), pour ces heures de sports passé ensemble, ces heures de ménages, de surf, de bons moments, mais aussi ma follow de Lindy! Merci **Lydia**, qui a trouvé que le nord c'était plus sympa que le sud, je t'attends pour ouvrir un hôpital à Saint-jean. Un grand merci aussi aux bioninfo **Julien** le minikeum, toujours présent pour un petit café et pour faire les blagues à 2 balles, à plus tard dans l'car. Merci maman **Manon** pour ta gentillesse, tes bonnes idées, tes jeux sur les pauses midi, **Christophe** et **bad appart** qui sont toujours là quand on a besoin. Merci **Laure** pour ta sincérité, ton honnêteté, ta rigueur et ta justesse face à toute épreuve. Merci **Sab**, merci mille fois pour ton soutien dans ces moments où la vie nous paraît parfois si dur, pour ta sincérité et ta franchise, pour ces belles guinguettes, ciné en plein air qu'on a pu faire et merci de nous avoir tant fait rire avec tes ressemblances.

A nos voisins de couloir

Merci les chibons pour toutes ces belles discussions en salle de pause, le long d'un couloir, **Lucie** tout tes bons conseils et bon plan transduc, **Nono** tout tes petits morceaux de chocolats et ton aide ultime pour corriger toutes ces fautes, **Candice** pour nos discussions sur les MSC et les banalités administratives de l'écol doc, **Gaelle** pour ton aide sur les puces, toutes les petites discussions et nos échanges de maris pour la moto et **Ariana** pour nos échanges en anglais. Merci les valituttis pour tous ces moments d'échanges de tumeur, de protocoles, d'anticorps mais aussi en culture et au cytomètre, **Yoan**, **Edouard**, **Cyp**, **Fanny** et **Lisa**. Merci les Mahas, pour ces petites soirées piscines chez **Virginie**, **Camille**, **Marie**, **Carlos**, merci **Christelle** pour tous tes bons conseils de post doc, **Clara** pour ces petites randos, ces petits échanges sur les manips, et ta gentillesse. Merci les delabesses, **Vincent** pour tes cheveux sublime, ton sourire ta sympathie, **Bastien** pour nous avoir toujours bien fait rire, d'avoir battu Ludo au bad, merci aussi pour tous tes conseils de transduction et **Sylvie** pour ta gentillesse. **Laura** merci pour ta gentillesse et ta disponibilité sans faille, toujours là et toujours prête pour aider ses amies, bien sur tes macarons divins que je n'oublierai jamais, nos randos mais aussi tous nos échanges de protocoles, de transduction, de WB.

A mes amis du master

Ma **Nina** d'amour, **CamilleT**, **Laura macarons** et **Laura BB** merci pour toutes ces supers soirées, pour les déménagements, pour les petits WE avec Lucie, nos échanges de plants (de tomate), merci pour nous avoir fait découvrir tous les bons plats et expressions de chez toi. Merci ma Laura pour ta gentillesse et ta bonne humeur qui arrive toujours quand on en a besoin.

A mes amis de la fac

Merci mon **Corentin**, mon constantin l'africain, mon coco, mon bibi d'amour pour tous ces moments que nous avons vécu ensemble, ces TP à moitié bourré mais toujours préparés, ces quelques moments de musique et ce beau voyage au Laos. Merci mes supers pétasses, ma **vulvine d'amour**, mon **Jb d'amour** (Mr KK te passe le bonjour), mon **Grégou chat** pour toutes ces belles années, ces belles soirées, ces beaux déguisements, ces beaux moments de révisions avec lili-pute ces quelques septembrage ensemble. Merci aussi à **Lulu** et **Sarah** avec qui j'ai cravaché pendant ces 2 années d'internat... Le cake aux olives restera gravé et ne sera plus jamais mangé. A **Marine B** pour ces belles vacances en Espagne et ses longues heures de révisions.

A ma team Toucan et l'élite du TAC

Tiph et **Ludo**, mes petits Toucan, sans le savoir une amitié est née sur les bords de la piscine, vous avez toujours été là. Merci de votre bonne humeur, de votre joie de vivre et de ses cours de natation qui ont permis cette belle rencontre. L'élite du TAC, **Alex** et **Manon**, **Guillaume**, **Antho**, **Lucas**, **Sylvain**, **Isa** et **Cath**, merci pour toutes ces petites bières post entraînement et ces longueurs passés ensemble.

A mes amis de longue date

CamilleN et **Margaux**, ça y est je peux maintenant le dire les études sont enfin FINIE. Ça fait bizarre de dire ça mais ça y est ces interminables études sont clôturées par cette thèse. Je ne vous remercierai jamais assez de tous ces moments que nous avons partagé, de nos années lycées en passant par la fac et jusqu'à la vie active. Et aussi un grand merci à mon **Vivian** bien sûr, mon acolyte de ces innombrables voyages dans les pays européens.

CamilleP te souviens-tu de notre si belle rencontre aux cours Esquirol un jour de pluie avec un parapluie puis perdue de vue puis finalement copine de panier de légumes puis finalement colok avec tomtom l'ours puis finalement véritablement best colok friend for ever. Et **Elina** bien entendu, une rencontre simple au départ qui s'est intensifiée sur une discussion dans mon garage à Bordeaux pour ne finalement jamais s'arrêter. Merci à vous 2 mes acolytes pour m'écouter quand ça ne va pas, me relire quand ça ne va pas, me prendre entre 4 yeux pour me dire que ça n'allait pas, bref merci d'avoir été là et d'être toujours là quand on a besoin « d'aller boire un verre » ou me faire sortir de chez moi pour aller à la comtesse avec tomtom. Merci d'être vous les meufs jvous kiff. Merci **tomtom** d'être un ours au grand cœur, toujours

prêt à râler, à me permettre de m'envoyer en l'air avec un inconnu pour mon anniversaire (je parle de saut en parachute), merci pour m'avoir appris à skier au chalet, d'être venu t'éclater à Tahiti et de m'avoir fait découvrir les PQR.

A ma famille

A mes parents, mes frères et ma sœur

Merci infiniment pour m'avoir toujours soutenue dans tous mes choix loufoques de vie, de la Flute, à la guitare, en passant par le dessin, le concours des beaux-arts, pour finalement finir pharmacienne/scientifique. Merci à mes 2 papa **Yvan** et **Hugo** de m'avoir éduqué comme ils ont pu chacun dans leurs pays, d'avoir supporté mes colères, mes cuillères jetées par terre, mes crises d'ado bref de m'avoir toujours aimé quoi que je fasse (même avec des clous de girofle dans les cigarettes). Merci à mes 2 mamans **Joëlle** et **cricri**, même s'il n'en reste qu'une les 2 m'auront élevé et appris à grandir, me maquiller, m'habiller bref être la personne que je suis maintenant, merci de m'avoir toujours soutenue, quoi qu'il arrive, et attendue patiemment que je rentre à la maison le soir... Merci à mes frères et sœurs, **Vass**, **Yona**, **Silhouette** et **Léo**, d'être comme vous êtes et de ne pas changer, surtout toi ma silhouette qui a toujours dit « jamais je ne ferai des études comme toi », je te souhaite bien du courage pour ces belles années d'études que tu vas traverser, je sais que tu seras un bon médecin. Mon petit Yoda, la patrie de la famille, je suis tellement heureuse que tu ai trouvé cette ci belle voie qui finalement te va si bien. Mon Vass, elle est loin cette vieille époque ou tu m'as donné ton ours en peluche et ou on jouait aux tortues ninja, tu es devenue un grand pro des waramer qui regarde les étoiles, j'espère que tu trouveras celle qui te mériteras. Mon Léo, si rapide mais si intense, tu resteras à jamais gravé dans mon cœur.

A ma famille Alsacienne

Merci **Jérôme** et **Anne**, **Oriane**, **Dani**, **Cécile**, **Livio**, **Papy** et **mamy** de m'avoir si bien accueillie, si bien intégrée à votre famille, fait découvrir l'Alsace et le monde. Je ne pouvais pas rêver mieux comme belle-famille, j'ai une chance incroyable de vous avoir et j'espère que ça durera encore longtemps. Merci pour votre soutien dans toutes les épreuves de la vie, merci d'être toujours là quand on a besoin et même quand on n'a pas besoin. Mais aussi un grand merci aux copains Alsaciens **Bruno**, **Anais**, **Virgile**, **Linda**, **Vincent** et **Claudia**.

A mon amour et mes BB

Et oui je parlerais aussi de mes chats dans ce paragraphe. Merci **Théophile** d'avoir accepté d'élever nos 3 bébé d'amour ensemble **Mr KK** (toujours prêt, en furtif, à manger ce qui passe), **Mara-belle** (la plus parfaite et la plus gentille) et **Bébé Aito** (le plus grand miauteur, voleur de caisse et chasseur de mouche), et d'avoir insisté pour prendre le troisième quand l'occasion s'est présentée. Merci pour m'avoir toujours soutenue dans tous mes choix, pour m'avoir remis les idées en places quand il le fallait, pour t'être si bien occupé de moi pendant l'écriture de ces 2 thèses, pour me supporter tous les jours. Merci de me suivre dans toutes mes péripéties et même à l'autre bout du monde. Merci de toutes tes attentions et merci de m'aimer de plus en plus tous les jours.

REMERCIEMENTS.....	3
INDEX DES FIGURES	11
INDEX DES TABLEAUX	11
RESUME	12
LISTE DES ABREVIATIONS.....	17
INTRODUCTION	20
I. LE MYELOME MULTIPLE	23
A. <i>Diagnostic et pronostic.....</i>	23
1. Signes diagnostiques cliniques et biologiques.....	23
2. Facteurs Pronostiques	25
3. Anomalies génomiques	26
B. <i>Formes cliniques</i>	27
1. Gammapathie monoclonale de signification indéterminée	27
2. MM (a)symptomatique	28
3. Leucémie à plasmocytes.....	28
4. Myélome ostéocondensant et plasmocytome solitaire	28
II. LE TRAITEMENT DU MYELOME	29
A. <i>Les chimiothérapies classiques et glucocorticoïdes</i>	29
1. Les alkylants.....	29
2. Les corticoïdes	31
B. <i>L'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques</i>	32
C. <i>Les thérapies ciblées et traitements ciblant le microenvironnement</i>	33
1. Thérapies ciblant les plasmocytes tumoraux	33
a) Les immunothérapies : les anticorps monoclonaux.....	33
b) Les cellules CAR-T.....	35
2. Ciblant le microenvironnement et les plasmocytes	37
a) Immunomodulateurs	37
b) Inhibiteurs du protéasome.....	37
c) Les inhibiteurs de l'histone désacétylase	38
d) Autres inhibiteurs : Inhibiteurs de mTOR et inhibiteurs de kinases.....	39
D. <i>Les traitements symptomatiques et prophylactiques.....</i>	41
E. <i>Le schéma thérapeutique</i>	41
F. <i>Évaluation de la réponse au traitement</i>	43
1. Critères conventionnels.....	43
2. La MRD	45
III. LE MICROENVIRONNEMENT DU MYELOME	46
A. <i>Les cellules immunitaires dans le MM.....</i>	48
B. <i>Les cellules et composants non immunitaires dans le Myélome</i>	50
1. Lignée myéloïde : les ostéoclastes.....	51
a) Dérégulation de l'axe RANK/RANKL/OPG	52

b) Facteurs sécrétés.....	53
2. Les ostéoblastes	54
a) Voie de signalisation Wnt.....	55
b) Autres facteurs : RUNX2, GFI, IL7, TGFβ.....	57
3. Les adipocytes	58
a) Les adipocytes de la moelle osseuse.....	58
b) Les adipocytes dans le MM.....	60
C. Les cellules stromales mésenchymateuses.....	61
1. Caractéristiques principales des cellules stromales mésenchymateuses.....	61
a) Capacité de différenciation : le rôle des ostéoblastes et des adipocytes.....	61
b) Modulation de l'immunité	62
c) Les récepteurs Toll-like.....	63
2. Thérapies utilisant les cellules stromales mésenchymateuses.....	64
3. Cellules stromales mésenchymateuses et cancer	66
a) Cellules stromales mésenchymateuses dans le cancer	66
b) Le phénotype des cellules stromales mésenchymateuses dans le Myélome Multiple.....	69
c) Effet des cellules stromales mésenchymateuses dans le Myélome.....	71
RESULTATS	74
I. INTRODUCTION DES RESULTATS.....	74
II. PREMIERE PARTIE : ARTICLE I – LA MODIFICATION DU TRANSCRIPTOME DES MSC PERSISTE APRES LE TRAITEMENT INTENSIF DES PATIENTS.....	75
A. <i>Résumé et conclusion</i>	76
B. <i>Article 1: publié en premier auteur</i>	78
III. DEUXIEME PARTIE : ARTICLE 2 – L'INHIBITION DE TLR4 DANS LE MICROENVIRONNEMENT MEDULLAIRE ALTERE LA CROISSANCE DES PLASMOCYTES MALINS	102
A. <i>Résumé et conclusion</i>	103
B. <i>Article 2 : En cours de soumission dans blood (short report) en co-premier auteur</i>	105
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	123
I. LA MODIFICATION DU TRANSCRIPTOME DES MSC PERSISTE APRES LE TRAITEMENT INTENSIF DES PATIENTS ATTEINTS DE MYELOME.....	123
A. <i>Choix de la cohorte</i>	124
B. <i>Analyses transcriptomiques et fonctionnelles des MSC de Myélome</i>	126
1. Dérégulation de la voie Wnt/βcatheine et de l'ostéogenèse.....	128
2. Dérégulation de la voie de coagulation et angiogenèse.....	130
3. Dérégulation de la différenciation adipocytaire.....	132
4. Capacité immunomodulatrice des MSC de Myélome.....	134
C. <i>Lésions osseuses dans le Myélome</i>	135
II. L'INHIBITION DE TLR4 DANS LE MICROENVIRONNEMENT MEDULLAIRE ALTERE LA CROISSANCE DES PLASMOCYTES MALINS	136
A. <i>Investigation de la réponse au TLR4 endogène et exogène</i>	136
B. <i>Support de la croissance des plasmocytes malins</i>	137

C.	<i>TLR4 comme reflet de la progression de la maladie</i>	140
D.	<i>Analyse des MSC natives de la moelle osseuse</i>	140
III.	CONCLUSION.....	141
ANNEXES		143
I.	ARTICLE 3 : ARTICLE EN COURS DE REVISION (IMMUNITY) EN CO-AUTEUR.....	143
	<i>Weulersse M., Asrir A., Pichler A C., Lemaitre L., Braun M., Carrié N., Joubert M V., Le Moine M., Do Souto L., Gaud G., Das I., Brauns E., Scarlata C M., Morandi E., Sundarajan A., Cuisinier M., Buisson L., Maheo S., Kassem S., Agesta A., Pérès M., Verhoeyen E., Martinez A., Mazière J., Dupré L., Gossye T., Pancaldi V., Guilleroy C., Ayyoub M., Dejean A., Saoudi A., Goriely S., Avet-Loiseau H., Bald T., Smyth M J. and Martinet.</i>	143
	<i>Eomes-dependent CD226 loss alters TCR responsiveness and restrains CD8+ T lymphocyte anti-tumor functions</i>	143
II.	ARTICLE 4 : ARTICLE PUBLIE EN CO-AUTEUR.....	201
	<i>Prat M., Le Naour A., Coulson K., Lemée F., Leray H., Jacquemin G., Chirine Rahabi M., Lemaitre L., Authier H, Ferron G, Barret J M., Martinez A., Ayyoub M., Delord J P., Gladieff L., Tabah-Fisch I., Prost J F., Couderc B and Coste A.</i>	201
	<i>Circulating CD14 high CD16 low Intermediate Blood Monocytes as a Biomarker of Ascites Immune Status and Ovarian Cancer Progression</i>	201
III.	ARTICLE 5 : ARTICLE PUBLIE EN CO-AUTEUR.....	211
	<i>Le Naour A., Prat M., Thibault B., Mével R., Lemaitre L., Leray H., Joubert M V., Coulson K., Golzio M., Lefevre L., Mery E., Martinez A., Ferron G., Delord J P., Coste A., and Couderc B.</i>	211
	<i>Tumor cells educate mesenchymal stromal cells to release chemoprotective and immunomodulatory factors</i>	211
BIBLIOGRAPHIE		226

INDEX DES FIGURES

Figure 1: Les différents traitements du MM	40
Figure 2: Schéma thérapeutique "classique" du patient <65ans	43
Figure 3 Compartiments hématopoïétique et non hématopoïétique de la moelle osseuse ...	47
Figure 4: Dialogue entre plasmocytes malins et cellules du microenvironnement	50
Figure 5: Dialogue entre ostéoclastes et ostéoblastes	51
Figure 6 : Voie de signalisation Wnt	56
Figure 7 : Liste des gènes communs.....	127
Figure 8: Impact de DKK1 et Wnt sur la différenciation des MSC	129
Figure 9: Expression de Leptine sur HD et MM BM-MSc	132
Figure 10: Heatmap d'expression de COX2 par les MSC	134
Figure 11: Pourcentage des cellules du microenvironnement dans la moelle des souris atteintes de Myélome	139
Figure 12: Schéma de conclusion	142

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1 - Classification ISS revisitée	26
Tableau 2 - Critères d'évaluation de la réponse au traitement	44
Tableau 3 - Critères de MRD	45

RESUME

Le myélome multiple (MM) est une hémopathie caractérisée par l'accumulation de plasmocytes (PC) malins dans la moelle osseuse pouvant occasionner entre autres des lésions ostéolytiques. Il s'agit d'une maladie extrêmement hétérogène, tant au niveau de la présentation clinique, de la réponse aux traitements, de la survie globale, que sur le plan biologique. L'hypothèse actuelle est que cette hétérogénéité est non seulement due à l'énorme variabilité moléculaire présente au sein des cellules tumorales mais également au microenvironnement des PC tumoraux. Dans ce microenvironnement nous nous intéressons plus particulièrement aux cellules stromales mésenchymateuses (MSC). Leur interaction avec les PC a des conséquences multiples : promotion de la prolifération, de la survie, de la migration et de la chimiorésistance des PC, stimulation de l'angiogenèse, stimulation de l'ostéoclastogenèse et inhibition de l'ostéoblastogenèse.

Mon sujet de thèse porte sur l'analyse phénotypique et fonctionnelle des MSC retrouvées associées aux PC au diagnostic de la maladie et tout au long du traitement. Mon travail de recherche a consisté en la comparaison de différents prélèvements de MSC afin 1) de mettre en évidence le rôle des MSC dans la physiopathologie du myélome aux différents stades de la maladie et 2) d'identifier une cible thérapeutique potentielle au sein du microenvironnement tumoral.

Les prélèvements de patients ont tout d'abord été sélectionnés pour constituer trois groupes homogènes composés de 10 prélèvements de moelle osseuse saine (HD BM-MSC), 12 de moelle osseuse de patients nouvellement diagnostiqués (D BM-MSC), 10 de moelle osseuse de patients dit en rémission (CR BM-MSC) et 9 prélèvements de patients en première rechute (ER BM-MSC). Les MSC ont été isolées à partir des moelles de ces différents groupes et une analyse transcriptomique a été réalisée. Nous avons confirmé les résultats antérieurs du laboratoire soit que les MSC de patients MM ont un profil transcriptomique différents des HD BM-MSC. Parmi les 845 gènes différentiellement exprimés entre HD et MM BM-MSC, nous avons identifié des facteurs connus dans la physiopathologie du myélome (IL6, GDF15, SERPINB2, DKK1, Runx2 ...) mais aussi des facteurs non répertoriés à ce jour. La voie Wnt, et certains facteurs de différenciation osseuse semblent être impliqués. De façon intéressante le profil transcriptomique des MSC ne varie pratiquement pas lors des différents stades du MM

et plus particulièrement suite au traitement que le patient soit en rémission ou en rechute de sa maladie. Ces données suggèrent que le contact des PC avec les MSC pourrait conduire à une modification pérenne du transcriptome des MSC.

Nous avons réalisé une analyse fonctionnelle des différentes MSC afin de corrélérer la différence transcriptomique observée avec une éventuelle différence de fonction. Les résultats montrent que les MSC issus de patients présentent une perte de capacité de différenciation en ostéoblastes et une différenciation facilitée en adipocytes. Concernant leur capacité immuno-modulatrice, les CR BM-MSc ont une fonction immuno suppressive altérée lorsqu'on les compare à celle des ER BM-MSc.

Finalement, nous nous sommes intéressés au gène codant Toll like receptor 4 (TLR4) retrouvé surexprimé chez les MSC de MM par rapport aux HD BM-MSc. TLR4 a été largement décrit pour son rôle dans l'immunité innée. Son rôle dans le cadre du MM reste encore à définir. Notre équipe a montré que l'utilisation d'un inhibiteur de TLR4 (C34) empêche les MM BM-MSc de supporter la croissance de lignées plasmocytaires (MOLP6). J'ai pu démontrer que le traitement, par cet inhibiteur C34, de souris porteuses de MM (modèle murin VkMyC) induit un retard de développement du myélome suggérant une application clinique de nos résultats.

RESUME VULGARISE EN FRANÇAIS

Le Myélome Multiple est une pathologie qui touche les plasmocytes présents dans la moelle osseuse. Son traitement repose sur une association de chimiothérapies et chez les patients jeunes, d'une autogreffe. Malheureusement la plupart des patients rechutent à long terme. Une nouvelle façon d'éradiquer la maladie est de cibler l'environnement proche de la tumeur que l'on appelle microenvironnement tumoral.

Dans cet environnement nous avons pu isoler un type de cellules, les cellules stromales mésenchymateuses (MSC) de la moelle osseuse des patients atteints de Myélome à différents stades de la maladie (au diagnostic et suite après leur traitement) mais aussi de donneurs sains. Une analyse détaillée de ces cellules a pu montrer que même après le traitement des patients ces MSC ne retrouvent pas leur phénotype sain et même chez des patients qui sont dit en rémission. De plus nous avons pu mettre en évidence la surexpression d'un récepteur à la surface des MSC de patients, le TLR4. Nous avons pu montrer *in vitro* sur les cellules et *in vivo*

chez la souris que si on inhibe ce récepteur avec un traitement, le C34, on diminue la progression de la tumeur.

PHENOTYPIC AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF CANCER ASSOCIATED MESENCHYMAL STROMAL CELLS IN MULTIPLE MYELOMA

Multiple myeloma (MM) is a B-cell malignancy characterized by clonal expansion of malignant plasma cells (PC) within the bone marrow (BM). MM patients often experience multiple relapses due to the presence of chemo-resistant residual MM clones. Therefore, there is a critical need to understand the mechanisms that regulate MM chemo-resistance and relapse. The interactions between microenvironment BM cells and malignant PCs play an essential role in MM growth and survival. Mesenchymal stromal cells (MSC) are multipotent BM stromal cells, able to differentiate into osteoblasts and adipocytes which support malignant PC growth through the release of different factors.

A better understanding of the role of these cells in MM relapse is critically required. My work consisted in comparing different samples of MSC to understand their role at different stage of the disease and find a therapeutic target.

To address this question, I created a homogeneous cohort of samples: 10 BM of healthy donors (HD BM-MSC), 12 from newly diagnosis MM patients (D BM-MSC), 10 from MM remission patients (CR BM-MSC) and 9 from MM patients with early relapse (ER BM-MSC). Then I isolated MSC from BM of these different groups and performed a transcriptomic analysis. My results reveal significant differences in expression of 845 genes between HD and MM BM-MSC. Wnt signaling, blood coagulation and angiogenesis appear to be involved in this pathological process.

Surprisingly, the transcriptomic profile of MSC was very similar after treatment in relapse or remission patient. These data indicate that the alteration in MSC gene expression associated with MM development can persist even in the absence of clinical sign of the disease. This suggests that a deep imprinting of MSC cellular program occurs by the contact with MM PCs.

Furthermore, I compare the functional capacity of HD and MM-MSC to differentiate, improve the MM cell growth and immunomodulation. MM-MSC differentiate preferentially

into adipocytes than osteoblasts compared to HD BM-MSC. They both support MM tumor growth by secreted factors. Interestingly, CR BM-MSC decreased their capacity to immunosuppress T cells compared to ER BM-MSC.

Finally, we observed an increase of toll like receptor 4 (TLR4) gene expression by MM BM-MSC compared to HD BM-MSC. TLR4 is a Pattern Recognition Receptor widely describe in innate immunology but not in MM. *In vitro* analysis performed by the laboratory suggest an important role of TLR4 to support tumor growth and TLR4 inhibitor, C34, inhibit MM cell lines growth. I performed this treatment on most relevant MM mouse model, VkMyC, and treatment delayed MM growth. These results suggest a clinical application of our data.

RÉSUMÉ VULGARISÉ EN ANGLAIS

Multiple Myeloma is a pathology which affects bone marrow's plasma cells. For young patients, Its treatment is based on a combination of chemotherapy and transplantation. Unfortunately, most patients part have long-term relapse. Targeting the environment close to the tumor, named the tumor microenvironment, is a new way to eradicate this disease.

In this environment, we have been able to isolate mesenchymal stromal cells (MSC) from patients' bone marrow affected by Myeloma at different stages of the disease (at diagnosis and after their treatment) and from healthy donors. An in-depth MSC analysis has been able to highlight that MSC never return to their healthy phenotype after treatment, even among complete remission patients. Futhermore, we have brought to light an receptor's overexpression on MSC surface, the TLR4. This study showed that, *in vitro* and *in vivo* (on mice), inhibiting TLR4 with a treatment named C34 is decreasing the tumor's progression.

NOMENCLATURE DES GENES

La nomenclature des gènes utilisée dans ce manuscrit respecte la nomenclature du « Hugo gene nomenclature committee » selon la publication :

Hester M. Wain, Elspeth A. Bruford, Ruth C. Lovering, Michael J. Lush, Mathew W. Wright and Sue Povey. Guidelines for Human Gene Nomenclature. Genomics 79(4):464-470 (2002)

et ses mises à jour post-publication.

DISCIPLINE

- Cancérologie
- Hématologie
- Biologie cellulaire

MOTS-CLES

- Cancer
- Myélome Multiple
- Cellules Stromales Mésoenchymateuses
- Microenvironnement Tumoral
- Hématologie
- Analyse Transcriptomique

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE

Institut Universitaire du Cancer Toulouse – Oncopole

1, avenue Irène Joliot-Curie 31059 TOULOUSE Cedex 9

INSERM U1037 : Equipe 13 du Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse (CRCT)

LISTE DES ABREVIATIONS

Acronymes abréviations	et	Définition
Ac		Anticorps
AcMc		Ac Monoclonal
ADN		Acide Désoxyribonucléique
ADNc		ADN complémentaire
AMM		Autorisation de Mise sur le Marché
ATU		Autorisation Temporaire d'Utilisation
ARN		Acide Ribonucléique
BCMA		B-cell maturation antigen
BTZ		Bortezomib
CA		Anomalies chromosomiques
CA-MSC		MSC associées au cancer
CAR-T		Chimeric antigen receptor T
Cbfa-1		Core-binding factor α 1
CCL2		CC-chimiokine Ligand 2
CD		Cluster de différenciation
C/EBP β		CCAAT/Enhancer binding protein β
CFU		Unités formants des colonies
CGH array		Array comparative genomic hybridization
CHU		Centre Hospitalo-Universitaire
CMF		Cytométrie en flux
CMP		Progéniteurs communs myéloïdes
COX2		Cyclooxygénase2
CR		Rémission complète
CRAB		Hypercalcémie, Insuffisance rénale, Anémie, Lésions osseuses
CR BM-MSC		MSC de moelle osseuse provenant de patients en Rémission
CS1		Antigène du sous-ensemble1 CD2
CSF-1		Colony-Stimulating Factor-1
CSH		Cellules Souches Hématopoïétiques
CT		Tomographie assistée par ordinateur
CXCL12		CXC-chemokine ligand 12
D BM-MSC		MSC de moelle osseuse provenant de patients au diagnostic
DC		Cellules dendritique
del(17p)		Délétion 17p
DKK1		Dickkopf-1
DXM		Dexamethasone
ER BM-MSC		MSC de moelle osseuse provenant de patients en Rechute précoce
FABP4		fatty acid binding protein 4
FC		Fold change d'expression

FGF	fibroblast growth factor
FISH	Hybridation In Situ Fluorescente
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor
G-MDSC	Granulocytic-MDSC
GDF15	Growth an differentiation factor 15
Gfi1	Growth factor independence-1
GFP	Green fluorescence protein
GMP	Progéniteurs granulocytaires et macrophagiques
GSEA	Gene set enrichment analysis
GvHD	Maladie du greffon contre l'hôte
HD BM-MSD	MSD de moelle osseuse provenant de donneurs sains
HGF	Hepatocyte derived factor
HLA-DR	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
Hsp	Heat shock protein
ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1
IGF1	insulin growth factor
IFM	Intergroupe Francophone du Myélome
IFN γ	Interféron gamma
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IMiDs	Immunomodulateurs
IMWG	L'International Myeloma Working Group
InVS	Institut de Veille Sanitaire
IRM	Imagerie par résonance magnétique
ISS	International Staging System
IUCT-O	Institut Universitaire de Cancérologie de Toulouse – Oncopole
LDH	Lactate Déshydrogénase
LFA1	Lymphocyte function-associated antigen 1
LPS	Lipopolysaccharide
LRP5/6	Lipoproteins receptor-related proteins 5 et 6
LT/LB	Lymphocytes T/ Lymphocytes B
LTh	Lymphocyte T helper
LTreg	Lymphocyte T régulateur
M-CSF	Macrophage colony stimulating factor
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1
MDSC	Myeloid Derived Suppressor cells
MGUS	Gammopathie Monoclonale de Signification Indéterminée
MIP-1 α	Macrophage inflammatory protein 1 α
MM	Myélome Multiple
MM BM-MSD	MSD de Myélome Multiple
MRD	Maladie résiduelle minimum
MSC	Cellules stromales mésenchymateuses
NF- κ B	Nuclear factor κ B

NGS	Séquençage de Nouvelle Génération
NK	Natural Killer
OB	Ostéoblastes
OC	Ostéoclastes
OPG	Ostéoprotégérine
PAI2	Plamsinogen activator inhibitor2
PBMC	Cellules mononucléaires de sang périphérique
PC	Plasmocytes
PCA	Analyses en composantes principales
PDGF	Platelet-derived growth factor
PFS	Survie sans progression
PGE2	Prostaglandine E2
POEMS	Polyneuropathique, Organomégalie, Endocrinopathie, protéine Monoclonale et Signes cutanés
PPAR γ	Peroxisome proliferator-activated receptor γ
PR	Réponse partielle
PTH	Prothèse totale de hanche
RANK	Receptor Activator of NF- κ B
RANKL	Receptor Activator of NF- κ B Ligand
Runx2	Runt-Related transcription factor 2
sCR	Rémission complète stringente
SDF-1	Facteur dérivé du stroma 1
sFRP	secreted frizzled-related proteins
SLIM	Soixante pourcent, ratio de chaines légères, IRM
SNP-array	Détection des polymorphismes touchant un nucléotide
SP7	Osterix
t(4;14)	Translocation (4 ;14)
tPA	Activateur tissulaire du plasminogène
TEP-CT	Tomographie par émission de positons avec CT
TGF β	Transforming growth factor- β
TLR4	Toll like receptor 4
TNF α	Tumor necrosis factor α
UGM	Unité onco-Génomique du Myélome
VCAM1	Vascular cell adhesion molecule 1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VGPR	Réponse partielle de bonne qualité
VLA-4	Very late antigen 4
VTD	Velcade Thalidomide Dexamethasone
Wnt	Wingless-related integration site1
β 2m	β 2 microglobuline

INTRODUCTION

Le Myélome Multiple (MM) est une pathologie de la personne âgée affectant 4000 nouveaux patients par an en France. Depuis sa découverte en 1844 par Henry Bence Jones par la présence de protéines dans les urines puis décrit en 1880 par Otto Kahler, qui lui donne le nom de maladie de Kahler, de nombreux traitements ont été envisagés. Ce n'est qu'en 1958 que l'on commence à traiter efficacement le MM avec le melphalan qui sera associé en 1962 à la prednisone. Ce traitement restera pendant plusieurs années une référence thérapeutique, jusqu'à l'arrivée de la greffe de moelle osseuse dans les années 1980. Les chimiothérapies cytotoxiques telles que le melphalan, classiquement utilisées dans le MM comme dans d'autres types d'hémopathies malignes ou de cancers solides, allongent la durée de vie du patient. Malgré tout, ces médicaments exposent à des effets indésirables graves et ne permettent pas de rémission complète dans le cadre du MM : on parle alors de résistance au traitement.

Depuis la fin du 20^{ème} siècle, pour pallier à ces résistances et limiter la survenue d'effets indésirables induits par les médicaments, la recherche scientifique vise à améliorer la façon de cibler les cellules tumorales. Ce ciblage peut être obtenu soit en caractérisant la physiologie de la tumeur pour l'éradiquer plus spécifiquement, soit en affectant les cellules qui l'aident à proliférer et qui appartiennent à ce que l'on appelle le microenvironnement tumoral.

Pourquoi ces 2 nouvelles stratégies thérapeutiques sont-elles envisagées :

- La cellule tumorale a comme particularité de ne jamais mourir, ce qui la rend très sensible aux signaux de mort cellulaire, aussi appelés signaux pro-apoptotiques. En 2004, apparaissent les premiers médicaments inhibiteurs du protéasome et notamment le bortezomib. Ces médicaments ciblent plus spécifiquement la cellule tumorale : en inhibant le protéasome, ils bloquent sa progression dans le cycle cellulaire et induisent la mort par apoptose de la cellule tumorale.
- Le microenvironnement tumoral constitue un enjeu pour le traitement de différents cancers. Il est composé de différents types cellulaires qui constituent des cibles possibles pour de nouvelles thérapies. Vers la fin des années 1990, de plus en plus d'études montrent que la tumeur résiste au traitement en échappant à la reconnaissance et à l'élimination par le système immunitaire, c'est-à-dire à

l'immunosurveillance. C'est dans ce contexte qu'arrivent les médicaments immunomodulateurs avec l'utilisation du thalidomide. Ce type de thérapie permet d'exploiter les mécanismes naturels de défense du patient en stimulant le système immunitaire déjà présent. Les anticorps monoclonaux ont été découverts dans les années 1980, mais ce n'est que depuis quelques années qu'ils sont utilisés dans le cadre du MM. Le daratumumab a fait preuve de son efficacité clinique ; ce médicament combine une action spécifique sur la cellule tumorale (en se liant au marqueur CD38 surexprimé par les PC malins) et sur son microenvironnement (il utilise le système immunitaire déjà présent pour tuer la cellule qu'il a préalablement ciblé).

A ce jour, le traitement standard reste pour les patients les plus jeunes une induction à base de chimiothérapies, puis une autogreffe et enfin une période de consolidation par chimiothérapies. Pour les patients plus âgés, chez qui l'autogreffe ne sera pas possible, une chimiothérapie seule est proposée. Ces traitements sont réalisés dans le cas où le patient ne participe pas aux essais thérapeutiques. L'efficacité de ces thérapies reste limitée car environ 75% des patients rechutent dans les 5 ans suivant le diagnostic¹.

En ce qui concerne la cellule tumorale, de nombreuses équipes travaillent sur les anomalies cytogénétiques présentes sur les PC malins pour essayer de prédire une mauvaise réponse au traitement médicamenteux. Ces anomalies peuvent être liées à l'acquisition de délétions, gains, translocations chromosomiques ou trisomies sur les PC malins. D'autres stratégies cherchent à cibler de façon plus précise la tumeur notamment *via* l'expression à la surface cellulaire de certains clusters de différenciation (CD) comme par exemple le CD138.

En ce qui concerne l'implication du microenvironnement, l'étude des cellules stromales mésenchymateuses (MSC) et de leur rôle dans le développement du MM suscite de grands espoirs. Les MSC sont des cellules multipotentes, plastiques et capables de moduler leur activité en fonction de leur environnement. Elles ont différents rôles dont celui de se différencier, entre autres, en OB, adipocytes et chondrocytes, mais peuvent aussi moduler l'immunité par sécrétion de facteurs et cytokines ou encore favoriser l'angiogenèse. Dans les années 2000, les premières analyses phénotypiques des MSC isolées de patients atteints de MM tendent à montrer que ces cellules sont différentes de celles issues de donneurs sains. En effet elles perdent leur capacité de différenciation en OB et sont moins capables d'inhiber l'immunité. De plus, elles sécrètent différentes cytokines et facteurs de croissances leur

permettant de supporter la croissance tumorale. L'ensemble des travaux publiés ont été réalisés au stade du diagnostic de la maladie. Peu de publications se réfèrent au phénotype ou aux implications des MSC au cours du traitement et/ou chez les patients en rechute.

Le but de l'étude présentée ici était d'isoler des MSC de patients au cours du traitement pour essayer de comprendre leur impact sur la tumeur et notamment chez les patients en rechute. Une cohorte de patients a été mise en place, les MSC ont été extraites de prélèvements de moelle osseuse en vue de réaliser une étude transcriptomique. Un transcriptome a donc été corrélé aux différents profils des patients.

I. Le Myélome Multiple

Le Myélome Multiple des os ou maladie de Kahler est une hémopathie lymphoïde maligne caractérisée par le développement d'un ou plusieurs clones de PC malins dans la moelle osseuse^{2,3}. Cette pathologie touche principalement la personne âgée et reste, à l'heure actuelle, incurable. Elle représente 2% de l'ensemble des cancers et 10 à 12% des hémopathies malignes^{4,5}. En 2012, le nombre de nouveaux cas en France est estimé à 4 900 dont 52 % survenant chez l'homme, avec un âge médian de survenue de 75 ans chez la femme et 72 ans chez l'homme. D'après l'Institut de veille sanitaire (InVS) en 2013 en France, la survie nette à 5 ans reste faible, 51% chez l'homme et 55% chez la femme, mais tend à progresser avec l'arrivée de nouvelles thérapies⁶.

A. Diagnostic et pronostic

1. Signes diagnostiques cliniques et biologiques

Le diagnostic du MM repose sur la mise en évidence des conséquences de la maladie sur les aspects biologiques et cliniques⁷. Les critères diagnostiques du MM sont⁸ :

- La présence de plus de 10% de PC malins dans la moelle osseuse ;
- La présence d'au moins un des critères SLiM-CRAB ci-dessous, nouvellement établis en 2014 :
 - Critères SLiM (soixante pourcent, ratio des chaînes légères, IRM) par la présence d'au moins un biomarqueur de malignité :
 - Plus de 60% de PC malins dans la moelle ;
 - Ratio des chaînes légères libres impliquées/non impliquées >100,
 - Au moins une lésion focale sur l'imagerie par résonance magnétique (IRM).
 - Critères CRAB (Calcémie, Insuffisance Rénale, Anémie, lésions osseuses) par la preuve de l'altération des organes pouvant être attribuée aux PC malins :
 - Hypercalcémie : Calcium sérique \geq à 2,75mmol/L (>11 mg/dL) ;
 - Insuffisance rénale : Clairance de la créatinine <40mL/min ou une créatinine sérique > à 177 μ mol/L (2mg/dL) ;
 - Anémie : Hémoglobine < 100 g/L ou perte de plus de 20g/L par rapport à la limite inférieure de la norme ;

- Lésions osseuses : Présence d'au moins une lésion ostéolytique sur radiographie, tomographie assistée par ordinateur (CT) ou, tomographie par émission de positon (TEP-CT).

Le MM est marqué par l'accumulation de PC malins (au moins 10%) dans la moelle osseuse, retrouvée lors du myélogramme. Cette infiltration médullaire va entraîner une anémie visible sur un hémogramme ainsi qu'une insuffisance médullaire globale et donc une altération de l'état général.

Les PC, qu'ils soient malins ou sains, produisent des protéines appelées anticorps et jouent un rôle important dans l'immunité. Ces anticorps, ou immunoglobulines, sont composés de 2 chaînes lourdes et 2 chaînes légères reliées par des ponts disulfures. Ils sont divisés en 5 isotypes selon leur type de chaînes lourdes : les immunoglobulines (Ig) IgG, A, D, E ou M. Environ 50 % des MM sont d'isotype IgG, 20 % d'isotype IgA et 20 % sont de type urinaire (à chaînes légères).

Pour diagnostiquer la maladie, on utilise différentes techniques :

- L'immunofixation ou l'immunoélectrophorèse des protéines sériques permet de typer la protéine monoclonale pour sa chaîne lourde et sa chaîne légère ;
- L'électrophorèse des protéines urinaires permet de mettre en évidence une protéinurie à chaînes légères appelée protéinurie de Bence Jones. L'immunofixation de ces mêmes protéines permet de préciser le type de protéine : kappa ou lambda. Concernant les chaînes légères, le type kappa est 2 fois plus fréquent que le type lambda. Dans ce cas, les Ig à chaînes légères s'accumulent et sont éliminées par le rein provoquant ainsi une insuffisance rénale ;
- Le dosage de β_2 microglobuline (β_2m) sérique permet de refléter la masse tumorale : son taux est donc élevé chez les sujets atteints de MM.

Parmi les symptômes cliniques, on retrouve la présence de lacunes osseuses qui provoquent le plus souvent une hypercalcémie, par dégradation de l'os. Cette hypercalcémie peut être responsable d'une insuffisance rénale liée à la réabsorption passive de calcium par le rein. On retrouve donc ce phénomène associé à une augmentation de la créatininémie. D'autres critères biologiques apparaissent secondairement : une augmentation de la protéine C réactive, de la lactate déshydrogénase et une hypoalbuminémie ⁹.

Suite au diagnostic de la maladie, le médecin évalue le pronostic du patient grâce à la classification de l'International Staging System (ISS) et depuis peu grâce à l'analyse des anomalies cytogénétiques.

2. Facteurs Pronostiques

Plusieurs classifications ont été successivement utilisées pour mesurer en routine l'agressivité du MM :

- La classification de Durie et Salmon est la première à avoir été validée. Elle tient compte des critères biologiques présentés précédemment : le taux d'hémoglobine, la calcémie, la présence de lésions ostéolytiques, le taux d'Ig monoclonal sérique ou urinaire et la créatininémie ;
- L'ISS est la classification pronostique qui fait référence actuellement. Elle est basée sur une analyse uni- et multivariée ainsi que 3 types de modélisations réalisées sur plusieurs groupes de patients. Parmi tous les facteurs pronostiques utilisés, 2 tests montrent un pouvoir prédictif puissant concernant la moyenne de survie des patients mais sont aussi utilisables en routine et peu coûteux : le dosage dans le sang de la β 2m et de l'albumine ^{7,10}. En 2015, l'ISS a été révisé pour inclure les anomalies chromosomiques (CA) et le dosage sérique de la lactate déshydrogénase (LDH). Ces 4 facteurs permettent de classer la maladie en 3 stades¹¹. Ils sont présentés dans le **Tableau 1** ;
- D'autres facteurs influencent le pronostic de la maladie : l'âge du patient, les comorbidités associées ainsi que la réponse au traitement.

	Stade I	Stade II	Stade III
β 2m	<3.5mg/L	Ni stade I ni stade III	\geq 5.5mg/L
Albumine	\geq 3.5g/dL		
Anomalies chromosomiques	Pas de haut risque de CA		Présence de délétion del(17p) et/ou translocation t(4 ;14) et/ou translocation t(14 ;16) ou LDH supérieur à la normale dans le sérum
Lactate déshydrogénase	Normal LDH		

Tableau 1 - Classification ISS revisitée

3. Anomalies génomiques

Certaines spécificités du PC malin peuvent avoir une influence majeure sur le pronostic du patient. C'est pour cela que le pronostic est également étroitement associé aux anomalies cytogénétiques initiales et acquises lors des rechutes. Ces anomalies sont détectées sur les PC triés de moelle osseuse de patients par Hybridation *In Situ* Fluorescente (FISH), détection des polymorphismes touchant un nucléotide (SNP-array) ou séquençage de nouvelle génération (NGS).

Les anomalies cytogénétiques retrouvées associées aux PC peuvent être de bon ou mauvais pronostic. Par exemple, les trisomies 3 et 5 ont été décrites comme orientant vers un bon pronostic¹². D'autres anomalies, comme les translocations (t(4 ;14) et t(14 ;16)), les délétions (del1p32 et del17p), le gain chromosomique (gain 1q) et la trisomie 21, ont été décrites comme orientant vers un mauvais pronostic¹²⁻¹⁴.

B. Formes cliniques

Le diagnostic de cette maladie est à rechercher devant divers tableaux cliniques ^{10,15}

1. Gammopathie monoclonale de signification indéterminée

Le Myélome asymptomatique, aussi appelé « état pré-myélomateux indolent » ou Gammopathie Monoclonale de Signification Indéterminée (MGUS)¹⁶⁻¹⁸, est retrouvé présent dans 3 à 4% de la population générale après 50 ans ¹⁹. Le taux d'évolution vers un MM est de 0,5 à 1% par an selon le type de MGUS. Il précède dans 99 % des cas le MM.

Il est classé selon 3 sous types :

- MGUS Non IgM, définit par la présence de :
 - Protéines monoclonales sériques < 30g/L ;
 - Plasmocytose médullaire < 10% ;
 - Absence de dommage d'organes en lien avec la dyscrasie plasmocytaire (critères CRAB ou amylose).

Son taux de progression est de l'ordre de 1% par an ^{10,20} ;

- MGUS IgM, définit par la présence de :
 - Protéines monoclonales type IgM sériques < 30g/L ;
 - Lymphoplasmocytose médullaire < 10% ;
 - Absence de dommages d'organes en lien avec la dyscrasie lymphoplasmocytaire (anémie, hyperviscosité, ...).

Son taux de progression est de l'ordre de 1 à 5% par an ²¹ ;

- Light chain-MGUS, définit par la présence de :
 - Ratio anormal des chaînes légères libres <0.26 ou >1.65 avec κ élevée chez les patients avec ratio > 1.65 ou λ élevée chez les patients avec ratio <0.26 ;
 - Absence d'Ig monoclonale entière en immunofixation ;
 - Plasmocytose médullaire < 10% ;
 - Absence de dommage de type CRAB ou Amylose ;
 - Protéines Mc urinaires < 500mg/24h.

Son taux de progression est de 0 à 3% par an ²².

2. MM (a)symptomatique

La forme asymptomatique, dite aussi MM indolent ou Smouldering Multiple Myeloma, correspond à une forme sans signe clinique qui a cependant une biologie modifiée par rapport à la normale (décrite ci-dessous), associée à une augmentation des taux sanguins d'Ig (supérieure à 30g/L) et/ou de plasmocytose médullaire (supérieur à 10%).

La forme symptomatique est associée à des signes cliniques spécifiques de la maladie qui découlent de l'envahissement plasmocytaire médullaire. Il a été précédemment détaillé dans la partie diagnostic (critères SLiM-CRAB).

Plusieurs formes sont retrouvées dans les 2 cas selon l'Ig sécrétée par le PC malin. Elle sera, soit à chaîne lourde, IgA ou IgG, retrouvée dans le sang, soit à chaîne légère, retrouvée dans les urines ^{2,3}.

3. Leucémie à plasmocytes

La leucémie à plasmocytes représente 2 à 4% de l'ensemble des MM et est une forme plus agressive que le MM symptomatique. Dans 60% des cas, elle est observée au diagnostic de la maladie (nommée ainsi primitive) et 40% des cas en fin de maladie (dite secondaire). On retrouve un nombre de PC sanguins supérieurs à 20% (2 g/L) ^{23,24}.

4. Myélome ostéocondensant et plasmocytome solitaire

Le MM ostéocondensant (ou ostéosclérique) est très rare et s'associe à une polyneuropathie dans 30 à 50 % des cas. On y retrouve une fibrose et une ostéosclérose des lamelles des os à la place de la lyse de l'os. Il est aussi appelé POEMS syndrome pour son atteinte Polyneuropathique, avec présence d'une Organomégalie, Endocrinopathie, de protéine Monoclonale et de Signes cutanés ²⁵.

Le plasmocytome solitaire représente 3 à 5% des néoplasies plasmocytaires et correspond à une prolifération localisée de PC monoclonaux malins au niveau osseux ou extra-osseux. Il est caractérisé par :

- Lésions isolées de l'os (ou d'un tissu mou) avec PC sur biopsie ;
- Moelle osseuse normale ou plasmocytose médullaire clonale inférieure à 10% selon le type de plasmocytome solitaire ;

- Absence d'anomalie squelettique du rachis et du bassin sur l'imagerie par résonance magnétique ou scanner ;
- Absence de critères CRAB ou amylose.

Son taux de progression vers un MM est de l'ordre de 10% sur 3 ans ²⁶.

II. Le traitement du Myélome

La prise en charge du MM a progressé ces dernières années avec l'introduction de nouvelles molécules faisant s'élever la survie à 5 ans de 29,8% à 39,6% en Europe entre 1997/99 et 2006/08 ²⁷.

Seuls les patients symptomatiques sont traités car le rapport bénéfice/risque du traitement chez les patients asymptomatiques (MGUS le plus souvent) est faible^{16,28}. La prise en charge du MM comprend une chimiothérapie pouvant être associée à une greffe selon l'âge du patient. Les différentes classes de chimiothérapies utilisées seront dans un premier temps détaillées puis dans un second temps les schémas thérapeutiques à suivre en fonction de l'âge du patient seront énoncés.

A. Les chimiothérapies classiques et glucocorticoïdes

La plus ancienne thérapie médicamenteuse contre le cancer est l'introduction des chimiothérapies cytotoxiques et des corticostéroïdes. Ils ont permis de traiter les patients atteints de MM avec l'association de différents médicaments dont ceux utilisés actuellement, les alkylants et les corticoïdes.

1. Les alkylants

Les agents alkylants représentent la plus ancienne classe de médicaments anticancéreux. Leur développement découle des effets du gaz moutarde utilisé pendant la première guerre mondiale. Leur composition électrophile est capable d'interagir avec des composés possédant des radicaux nucléophiles, retrouvés notamment dans les acides nucléiques. Ces molécules peuvent alkyler de façon covalente les bases de l'ADN (acide désoxyribonucléique). Cette liaison covalente peut être monovalente ou bivalente et, dans ce cas, entraîner des ponts intra ou inter-brins. La cytotoxicité du traitement provient de l'alkylation des cellules ayant un fort taux de multiplication comme les cellules tumorales. En effet, ces agents altèrent des processus indispensables à la division cellulaire, la réplication et

la transcription, conduisant à un arrêt du cycle cellulaire. De plus, les lésions induites par cette alkylation produisent souvent des cassures simple ou double-brins induisant l'entrée en apoptose de la cellule. Ces agents alkylants sont subdivisés en 8 sous-classes :

- Les moutardes à l'azote, tels que le melphalan, chlorméthine, chlorambucil et méchlorétamine, induisent préférentiellement des liaisons inter-brins ;
- La sous-classe des oxazaphosphorines composée du cyclophosphamide et de l'ifosfamide. Ils exercent leur action cytotoxique majoritairement par formation de ponts inter-brins ;
- Le témozolomide et la dacarbazine sont des composés monovalents (pas de formation de pont intra ou inter-brins), appartenant à la sous-classe des triazènes et hydrazines, qui forment des adduits sur l'ADN responsables de leur activité cytotoxique ;
- Les molécules appartenant aux éthylène-imines, comme le thiotépa, l'altrétamine et la mitomycine C, forment des ponts intra ou inter-caténaux au niveau de l'ADN induisant la mort cellulaire ;
- La sous-classe des nitroso-urées comprenant la carmustine, la lomustine, la fotémustine, la bendamustine et la streptozocine, peut former des ponts inter-brins induisant une cytotoxicité.
- Les alkyles alcanes sulfonates ou moutardes soufrées sont représentés par le busulfan et le pipobroman. Ils exercent leur activité cytotoxique en formant des ponts intra ou inter-caténaux ;
- Les sels de platine ou les organoplatines, tels que le cisplatine, le carboplatine ou l'oxaliplatine, sont des agents alkylants exerçant leur activité cytotoxique par formation de ponts intra ou inter-brins.

Dans le cadre du MM, les antinéoplasiques cytotoxiques immunosuppresseurs utilisés sont le cyclophosphamide (ENDOXAN®) et le melphalan (ALKERAN®)^{2,29}. La bendamustine (LEVACT®) a obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) en mai 2016³⁰ en première ligne de traitement en association avec la prednisone chez les patients de plus de 65 ans présentant une neuropathie au diagnostic et non éligible à une greffe autologue³¹.

2. Les corticoïdes

Le cortex de la surrénale (corticosurrénale) synthétise une trentaine d'hormones appelées corticostéroïdes. Elles se divisent en 3 grands groupes : les minéralocorticoïdes, les gonadocorticoïdes et les glucocorticoïdes. Ces derniers agissent *via* un récepteur spécifique, intracellulaire, le récepteur aux glucocorticoïdes. Il est retrouvé dans le cytosol de la cellule sous forme de complexe inactif lié à la protéine de choc thermique et à l'immunophiline. Lors de la liaison du glucocorticoïde libre à son récepteur, le complexe se dissocie et seul l'ensemble ligand-récepteur migre dans le noyau. Cet ensemble interagit avec l'ADN et pourra agir de manière directe ou indirecte sur la transcription de gènes. De manière directe, il induit une augmentation du taux de protéines anti-inflammatoires telles que l'interleukine 10 (IL10), l'annexin1 et la protéine IκB. De façon indirecte, le complexe ligand-récepteur permet l'inactivation de facteurs de transcription (AP1, NF-κB et IL6) responsable de l'effet anti-inflammatoire et immunosuppresseur des glucocorticoïdes. Les corticoïdes pourront donc exercer leurs effets sur l'immunité et l'inflammation *via* :

- L'inhibition de la transcription de cytokines pro-inflammatoires ;
- La diminution de l'acide arachidonique (médiateur de l'inflammation) ;
- La diminution de la différenciation des monocytes-macrophages, des polynucléaires neutrophiles, éosinophiles et basophiles ;
- L'inhibition de production et de prolifération des lymphocytes T (LT).

Les corticoïdes de référence utilisés en thérapeutique sont la prednisone (CORTANCYL®), la prednisolone (SOLUPRED®), la méthylprednisolone et la dexaméthasone (DXM) (NEODEX®, DECTANCYL®). Ils sont utilisés dans diverses pathologies pour leur effet anti-inflammatoire et immunosuppresseur. Dans le MM, la DXM est principalement utilisée en première intention en association ^{2,32}.

B. L'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont des cellules dites souches car elles ont la capacité de s'auto-renouveler et se différencier en cellules progénitrices myéloïdes ou lymphoïdes afin de reconstituer l'ensemble du système hématopoïétique. Les PC proviennent des cellules progénitrices lymphoïdes. Une autre façon de cibler la maladie est de l'éradiquer à l'emplacement de sa formation. Dans les années 1970/1980, la greffe de cellules souches fait son apparition en thérapie dans différents cancers hématologiques. Ce n'est qu'en 1996 qu'elle fait son apparition dans le traitement du MM grâce à une étude multicentrique menée par l'Intergroupe Francophone du Myélome (IFM)³³.

Le principe de la greffe se déroule en 3 temps. Au départ le sang du patient est enrichi en progéniteurs CD34+ grâce à des facteurs de croissance puis prélevé par cytophérèse et congelé jusqu'à utilisation : on parle alors de greffon. Par la suite, le patient va subir une aplasie médullaire grâce à une chimiothérapie intensive à base de melphalan. Enfin son greffon lui est réinjecté. Cette greffe est dite autologue car les cellules réimplantées proviennent du patient lui-même. Seuls les patients dits « jeunes » (<65-70 ans) peuvent recevoir une greffe, le rapport bénéfice/risque étant plus faible chez des patients plus âgés.

La première étude IFM, publiée en 1996, a été réalisée à Toulouse. Elle a comparé, auprès de 200 patients, l'effet d'une chimiothérapie de haute dose suivie d'une greffe de CSH à une thérapie classique de 18 cycles. L'étude conclut à une meilleure réponse de l'association autogreffe/chimiothérapie contre chimiothérapie seule, avec une survie sans événement sur 5 ans de 28% (*versus* 10% sous chimiothérapie seule) et un taux de survie globale à 5 ans de 52% (*versus* 12% sous chimiothérapie seule)³³. L'étude de phase III, IFM 2009, réalisée sur 700 personnes en France et en Belgique, a permis de mettre en place la stratégie thérapeutique utilisée actuellement dans le MM (décrite en suivant dans la partie I.E.). Elle montre une meilleure survie sans progression (69% *versus* 33%) et une meilleure réponse complète (58% *versus* 46%) dans le bras comportant 3 cycles de chimiothérapie + greffe + 2 cycles *versus* 8 cycles sans greffe¹.

C. Les thérapies ciblées et traitements ciblant le microenvironnement

Les thérapies cytotoxiques ne sont pas spécifiques des cellules tumorales et ne permettent pas une éradication complète de la maladie. De plus, elles entraînent un certain nombre d'effets indésirables du fait de leur action sur toutes les cellules, y compris les cellules saines. C'est dans cette optique qu'ont été développées les thérapies ciblées aussi appelées thérapies de « nouvelle génération », le but étant de cibler préférentiellement la cellule tumorale en agissant soit sur les anomalies spécifiques de chaque cellule tumorale, soit sur son microenvironnement. Le microenvironnement tumoral correspond à l'environnement proche de la tumeur et a pour but d'aider les cellules tumorales à se développer.

C'est dans cet objectif que plusieurs classes de thérapies ciblées ont été développées. Elles seront ici présentées selon leur cible et leur mécanisme d'action sur le MM.

1. Thérapies ciblant les plasmocytes tumoraux

Ces thérapies innovantes cherchent à cibler des anomalies spécifiques de la tumeur. Elles ont pour but de potentialiser l'effet des chimiothérapies actuellement utilisées et de réduire les effets indésirables causés par l'action non spécifique des cytotoxiques.

a) *Les immunothérapies : les anticorps monoclonaux*

Les anticorps monoclonaux (AcMc) sont des molécules produites par le système immunitaire et permettent de déclencher une attaque ciblée. Ils agissent en reconnaissant et en neutralisant des pathogènes mais peuvent aussi induire une cytotoxicité ou une phagocytose des cellules. Ils sont largement utilisés en thérapie notamment dans les cancers, l'isotype IgG étant le plus utilisé ³⁴. Dans les années 1980, ils sont utilisés pour leur reconnaissance de marqueurs spécifiques situés à la surface de la cellule tumorale. En 1975, Kohler et Milstein ont créé des traitements à partir d'Ac murins ³⁵. Les effets indésirables étant nombreux, la structure de l'Ac a été changée sur une base plus humanisée voire totalement humaine. Ces changements ont constitué les différentes classes d'AcMc :

- Les murins, nommés « -momab », sont en totalité d'origine murine. Par exemple le muromumab, anti CD20, est utilisé dans le traitement des lymphomes non hodgkiniens ;

- Les chimériques, nommés « -ximab », composés à 60-70% d'origine humaine. Par exemple l'infliximab, anti TNF α (tumor necrosis factor α) est utilisé dans les maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, la spondylarthrite ankylosante et le psoriasis ;
- Les humanisés « -zumab », composés à 90% d'origine humaine. On retrouve le bevacizumab, anti VEGF (Vascular endothelial growth factor) indiqué dans plusieurs cancers solides, notamment dans le cancer du sein métastatique.
- Les humains « -mumab », 100% d'origine humaine. Le daratumumab en fait partie et son utilisation dans le MM est détaillée plus bas.

Dans les leucémies lymphoïdes chroniques, les cellules B malignes expriment le CD20, contrairement aux autres cellules non malignes. Le rituximab, anticorps monoclonal chimérique utilisé dans les leucémies va cibler le CD20 et permettre une éradication plus spécifique de la tumeur.

Les médicaments suivants ont une place dans la stratégie de traitement du MM :

- Dans le cadre du MM, le PC malin surexprime le CD38 à sa surface. Le daratumumab est un anticorps monoclonal humain de type IgG1 qui se lie préférentiellement au CD38 de la cellule tumorale. Il permet la lyse tumorale *via* une cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps, une cytotoxicité dépendante du complément ainsi qu'une phagocytose cellulaire dépendante des anticorps. La liaison du daratumumab au CD38 entraîne également une cytotoxicité des cellules immunitaires exprimant CD38, telles que les cellules myéloïdes suppressives et les lymphocytes régulateurs (B et T).

Le daratumumab a obtenu une AMM en février 2018³⁶, pour le traitement du MM après une première rechute, en association avec une bithérapie par lénalidomide/DXM ou par bortezomib/DXM. Cette indication fait suite aux études CASTOR³⁷ et POLLUX³⁸. Il est actuellement utilisé dans l'essai de phase III nommé CASSIOPEIA dans l'objectif d'évaluer sa place en première ligne de traitement du MM.

- L'isatuximab, apparu récemment, il n'a pas encore obtenu d'AMM et bénéficie d'une autorisation temporaire d'utilisation (ATU) dans le MM en rechute, en 4^{ème} ligne de traitement ou plus. C'est un anticorps monoclonal chimérique de type IgG1 qui se lie de façon sélective au CD38. Il agit de la même façon que le daratumumab et va en plus

inhiber les LT régulateurs et activer les cellules natural killer (NK). En 2019, il fait l'objet de 3 études cliniques de phase III en adjuvant du traitement actuel, en première ligne de traitement (NCT03617731), chez les patients réfractaires ou en rechute (NCT03275285, NCT02990338=ICARIA-MM). Le laboratoire pharmaceutique Sanofi présente des premiers résultats encourageants sur son essai de phase III « ICARIA-MM ». Ils montrent, sur 307 patients réfractaires ou en rechute une réduction de 40% du risque de progression grâce à l'utilisation de l'isatuximab en combinaison avec le pomalidomide et la dexaméthasone³⁹.

- L'elotuzumab est un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre l'antigène du sous-ensemble1 CD2 (CS1) humain qui va déclencher une cytotoxicité dépendante des anticorps. CS1 est une glycoprotéine de surface appartenant à la sous famille CD2 et fortement exprimée par les PC malins. Il est en cours d'essai de phase I/II en France (FACET HuLuc63-1703) pour évaluer le rapport bénéfice/risque en combinaison avec le lenalidomide et la dexaméthasone chez des patients en rechute de MM⁴⁰.

D'autres inhibiteurs ciblant spécifiquement la tumeur sont en cours d'évaluation aux États Unis : les inhibiteurs du cycle cellulaire, de la transcription, des télomérases et des inhibiteurs de aurora kinase.

b) Les cellules CAR-T

Ce sont des LT autologues qui ont été génétiquement modifiés *ex vivo* afin de leur faire exprimer un Récepteurs d'Antigène Chimériques (CAR). Ces derniers sont des récepteurs recombinants qui peuvent à la fois lier l'antigène et activer le LT. Depuis le début des années 2000, 3 générations de CAR-T ont vu le jour ⁴¹:

- Les premières générations de CAR étaient seulement pourvues de récepteurs activateurs des LT.
- Les secondes générations ont vu apparaître une double signalisation avec des récepteurs activateurs couplés à des signaux de costimulation.
- Les troisièmes générations combinent au moins 3 domaines de signalisation.

Ces LT, modifiés génétiquement, vont reconnaître et cibler un antigène tumoral spécifique à la surface des cellules. Au cours des dernières années, de nombreuses études ont rapporté leurs bienfaits dans le traitement des hémopathies malignes, principalement sur des

cancers qui touchent les LB, comme le lymphome ou encore la leucémie, en ciblant le CD19 présent à la surface des LB⁴². Dans le cas du MM, de nombreuses études de phase I ont vu le jour. Elles cherchent à cibler l'antigène de maturation des LB (BCMA) qui est présent dans la plupart des cas de MM. L'étude NCT02658929 de phase I, évalue la dose de LT à injecter chez des patients réfractaires ou en rechute. 33 patients ont reçu des doses de cellules CAR-T allant de 50 à 800 millions selon différentes phases. Ce traitement semble efficace car 28 patients répondent : 15 sont en réponse complète, 4 patients sont en maladie stable et 1 seule rechute. Malheureusement 6 des 15 patients en réponse complète ont rechuté dans les mois qui ont suivi et on retrouve une PFS de 11,8 mois. 25 nouveaux essais de phase II et/ou III sont actuellement en cours, aux Etats Unis et en Chine, sur de plus grandes cohortes dans le cadre de patients réfractaires ou en rechute de MM. 3 études de phases II (NCT04133636, NCT03361748, NCT03601078) et 1 étude de phase III (NCT03651128) ont commencé en France en collaboration avec les Etats Unis depuis 2017/2018. Ce traitement prometteur n'a, pour l'instant, fait ses preuves que sur des patients ayant subi plusieurs lignes de chimiothérapies et donne des résultats à court terme car les patients rechutent après quelques mois de traitements seulement⁴³. La présence du système immunitaire reste essentielle dans ce type de pathologie. Or après plusieurs rechutes les patients se retrouvent avec un système immunitaire affaibli et une maladie trop souvent résistante à une immunostimulation.

2. Ciblant le microenvironnement et les plasmocytes

a) *Immunomodulateurs*

La classe des immunomodulateurs (IMiDs) telles que le thalidomide, le lénalidomide (REVLIMID®) et le pomalidomide (IMNOVID®), entraîne une altération de la production de cytokines, une régulation de la co-stimulation des LT ainsi qu'une augmentation de la cytotoxicité des cellules NK³⁴. Ces traitements agissent sur la sécrétion de cytokines (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12) et de protéines pro-angiogéniques (FGF-2 (fibroblast growth factor) et VEGF)⁴⁴. La cible des IMiDs serait une protéine E3 ubiquitine ligase, le céréblon. En présence des IMiDs, le céréblon se lie aux protéines substrats tel qu'ikaros et aiolos, qui sont des facteurs de transcription spécifiques des cellules B. Cela entraîne leur ubiquitination puis leur dégradation par le protéasome⁴⁵. Les protéines ikaros et aiolos sont surexprimées dans les tumeurs malignes lymphoïdes B notamment dans le MM. Les IMiDs modifient le ratio lymphocytaire T circulant chez le sujet sain, diminuant les LT « helper » et augmentant les LT cytotoxiques. Ces médicaments immunomodulateurs augmenteraient le nombre et l'activité cytotoxique des cellules NK impliquées dans l'immunité antitumorale.

Les IMiDs pourraient donc avoir un rôle immunomodulateur mais aussi antitumoral direct en bloquant la prolifération tumorale par arrêt du cycle cellulaire en phase G1 ou en induisant l'apoptose^{44,45}.

b) *Inhibiteurs du protéasome*

Le protéasome joue un rôle important dans la régulation des processus intracellulaires et dans l'homéostasie de la cellule. Ces protéasomes sont présents dans le cytoplasme des cellules. Lorsqu'il y a des protéines anormales ou présentes en trop grand nombre, la cellule a 2 stratégies pour les dégrader : *via* le système lysosomal ou *via* la voie ubiquitine-protéasome. Dans cette dernière voie, les protéines sont marquées par une protéine appelée ubiquitine qui sera reconnue par le protéasome et entrainera la protéolyse. Les cellules cancéreuses quant à elles présentent un dysfonctionnement du cycle cellulaire les rendant insensibles aux signaux de mort cellulaire. Les inhibiteurs du protéasome entraînent un arrêt du cycle cellulaire provoquant ainsi une accumulation de protéines anormales. Cette accumulation de protéines induit la mort par apoptose des cellules tumorales. De plus, de

nouvelles études ont démontré que ces inhibiteurs du protéasome rendraient les cellules tumorales plus sensibles à la chimiothérapie⁴⁶.

Les 2 inhibiteurs utilisés actuellement en pratique inhibent le protéasome en se liant de façon réversible pour le bortezomib (VELCADE®), ou irréversible pour le carfilzomib (KYPROLIS®), sur différents sites du protéasome. Le bortezomib (BTZ) est le premier inhibiteur du protéasome à avoir été utilisé dans le traitement du MM et constitue toujours le traitement de première intention en association^{47,48}. Le carfilzomib est quant à lui seulement utilisé dans les rechutes en association avec le lenalidomide et la DXM. Il a obtenu une AMM dans cette indication en février 2018⁴⁹ suite à l'étude ASPIRE PX-171-009⁵⁰. L'ixazomib (NINLARO®) a obtenu une AMM récemment, en juillet 2017⁵¹, en association au lenalidomide/DXM seulement à partir de la 2ème ligne de traitement. Ces résultats font suite à l'étude de phase III TOURMALINE-MM1 issue d'une cohorte mondiale (Amérique du Nord, Europe et Asie-Pacifique) qui a prouvé son efficacité en adjuvant de l'association lenalidomide/DXM par rapport à l'association seule⁵².

c) Les inhibiteurs de l'histone désacétylase

L'état d'acétylation des histones dépend de 2 enzymes : les acétyltransférases d'histone (qui acétylent l'histone pour garder la chromatine ouverte et permettre ainsi la transcription) et les désacétylases d'histone (qui désacétylent, rendant la chromatine fermée et donc une transcription impossible). Les inhibiteurs de l'histone désacétylase sont de nouveaux antinéoplasiques pouvant corriger la dérégulation transcriptionnelle des gènes impliqués dans l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire. De plus, cette classe ne cible pas seulement les modifications épigénétiques des histones. De nombreuses études ont montré qu'elles peuvent agir aussi sur l'apoptose, l'angiogenèse mais aussi sur la prolifération et la différenciation des cellules, les rendant utiles dans les cas de cancers⁵³.

Les inhibiteurs de l'histone désacétylase sont classés en 4 grandes familles : les acides gras à chaînes courtes, les benzamides, les tétrapeptides cycliques et les dérivés hydroxamiques. Seule cette dernière classe est utilisée dans le cadre du MM avec le vorinostat et le panobinostat (FARYDAK®). Une étude de phase III a été réalisée sur la combinaison vorinostat/BTZ versus BTZ seul et montre une meilleure survie sans progression, ou Progression Free Survival (PFS) avec le vorinostat (7,63 mois versus 6,83 mois

respectivement). Malgré tout, la survie globale reste identique et les effets indésirables nombreux ⁵⁴. Le panobinostat a, quant à lui, obtenu l'AMM en 2016⁵⁵ suite à une étude de phase III PANORAMA_1 ⁵⁶ et une étude de phase II PANORAMA_2 ⁵⁷. Il est depuis indiqué dans le traitement du MM en rechute et/ou réfractaire en association avec le bortezomib/DXM chez un patient qui a reçu au moins 2 lignes de traitements. Il conserve malgré tout, des effets indésirables importants. Il est en cours d'étude de phase II PANORAMA_3 pour évaluer l'efficacité et 3 différentes doses en association avec bortezomib/DXM.

d) Autres inhibiteurs : Inhibiteurs de mTOR et inhibiteurs de kinases

D'autres inhibiteurs existent mais n'ont pour l'instant pas d'AMM dans le traitement du MM. Il existe des inhibiteurs de la voie mTOR comme temsirolimus et everolimus. Temsirolimus a une AMM dans les carcinomes rénaux et le lymphome des cellules du manteau. Aux États-Unis, ce traitement est en cours d'essai dans le MM en association avec le BTZ dans les rechutes ou chez les patients réfractaires. Cette étude de phase I et II montre des résultats prometteurs avec une moindre survenue d'effets indésirables chez ces patients ⁵⁸.

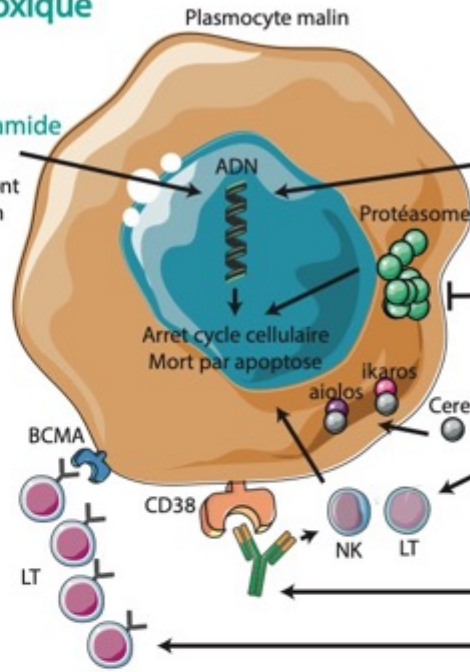
Un inhibiteur de kinases, sorafenib est en cours d'essai dans le MM en phase I/II aux États-Unis (NCT00536575, NCT00687674).

Un schéma récapitulatif des traitements est présenté dans la **Figure 1**

Chimiothérapie cytotoxique et glucocorticoïdes

ALKYLANTS Cyclophosphamide
Melphalan
Formation de pont intra et inter-brin avec l'ADN

CORTICOIDES
Dexaméthasone
Prednisone
anti-inflammatoire immunosuppresseur



Thérapie ciblée

INHIBITEURS D'HISTONE DESACETYLASE

Vorinostat
Panobinostat
Corrige la dérégulation transcriptionnelle des gènes impliqués dans l'apoptose

INHIBITEURS DU PROTEASOME

Bortezomib
Carfilzomib

IMiDs

Thalidomide
Lenalidomide
Pomalidomide
Dégradation ikaro/aiolos
Cytotoxicité NK
Co-stimulation LT

IMMUNOTHERAPIES

Daratumumab
Isatuximab
Cellules CAR-T

Autogreffe

1. Collecte
Les cellules souches sont prélevées par cytophérèse



2. Cryoconservation
Le sang est congelé pour la conservation



4. Ré-injection
Les cellules souches décongelées sont ré-injectées au patient



3. Aplasie
Le patient reçoit une chimiothérapie à haute dose

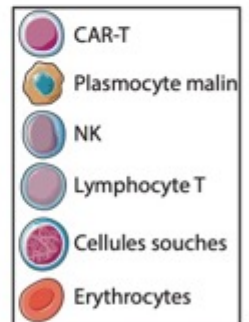


Figure 1: Les différents traitements du MM

Schéma représentatif des différents utilisés actuellement dans le MM, comprenant les chimiothérapies cytotoxiques, les glucocorticoïdes, les thérapies ciblées et l'autogreffe.

D. Les traitements symptomatiques et prophylactiques

Les patients reçoivent un traitement symptomatique des complications cliniques liées à la maladie, appelé traitement de support. Il contient des biphosphonates pendant les 6 premiers mois de traitement, ainsi que de l'érythropoïétine et des facteurs de croissance hématopoïétique granulocytaire humain (G-CSF). Les biphosphonates sont des inhibiteurs de l'activité ostéoclastique utiles dans le cadre du MM pour diminuer la lyse osseuse. On retrouve dans cette classe de médicaments, l'acide zolédronique (ZOMETA®) qui en plus d'inhiber la résorption osseuse a une activité cytostatique directe et pro-apoptotique⁵⁹. Le dénosumab est en cours d'essai mais n'apporte pour l'instant pas d'amélioration supérieure en comparaison à l'acide zolédronique, en termes de survie globale et de progression de la maladie⁶⁰.

Les traitements prophylactiques des effets indésirables médicamenteux sont adaptés selon le schéma thérapeutique choisit. En effet en cas de traitement à base de dexaméthasone, un traitement antibiotique est recommandé (amoxicilline et Bactrim Forte®) ainsi que des antiviraux (valaciclovir) avec la prise de bortezomib et des IMiDs. Pour la prophylaxie thromboembolique, de l'aspirine est instaurée (en cas de faibles comorbidités associées) ou encore des anti-vitamine K ou héparine de bas poids moléculaire (en cas de plusieurs facteurs de risques associés)⁶¹.

E. Le schéma thérapeutique

La prise en charge thérapeutique est définie en accord avec le patient en lien avec le médecin sur la base de l'avis rendu en réunion de concertation pluridisciplinaire. Le traitement du MM se déroule en 3 temps : l'induction, la consolidation et la maintenance. Seul le type de thérapies diffère en fonction de l'âge du patient et de l'inclusion ou non dans un protocole thérapeutique.

Chez un patient de moins de 65-70 ans on associe une chimiothérapie à une autogreffe alors que chez un patient plus âgé, l'autogreffe n'est pas possible (rapport bénéfice/risque insuffisant). Le choix du type de chimiothérapie sera également orienté selon le profil du patient.

Le traitement classique d'un patient de moins de 65-70 ans, non inclus dans un protocole, comporte :

- Une chimiothérapie d'induction à base de BTZ + dexaméthasone + IMiDs (thalidomide ou revlimid) durant 4 cycles pour réduire au maximum la charge tumorale.
- Un prélèvement de cellules souches hématopoïétiques autologues est réalisé suite à une mobilisation de cellules CD34+ par des facteurs croissance quand cela est possible. Ces prélèvements sont réalisés après le 3^{ème} cycle de chimiothérapie d'induction.
- Une intensification au melphalan suivie d'une autogreffe de cellules souches hématopoïétiques.
- Un traitement de consolidation équivalent au traitement d'induction si ce dernier a donné des résultats probants.
- Un traitement de maintenance à base de lenalidomide, instauré dans le mois qui suit la consolidation, pendant 26 cycles (2ans).

Il est représenté en **Figure 2**.

Chez un patient de plus de 65-70 ans, hors protocole, on instaure seulement une chimiothérapie qui peut être :

- MP-THAL: Melphalan Prednisone Thalidomide. Schéma historiquement utilisé qui tend à disparaître.
- Ou MPV: Melphalan Prednisone Velcade® (bortezomib)⁶².
- Ou REV-DEX : Revlimid® (lenalidomide) + dexaméthasone.
- Ou VEL-DEX : Velcade® (bortezomib) + dexaméthasone, pour les sujets les plus fragiles.⁶¹

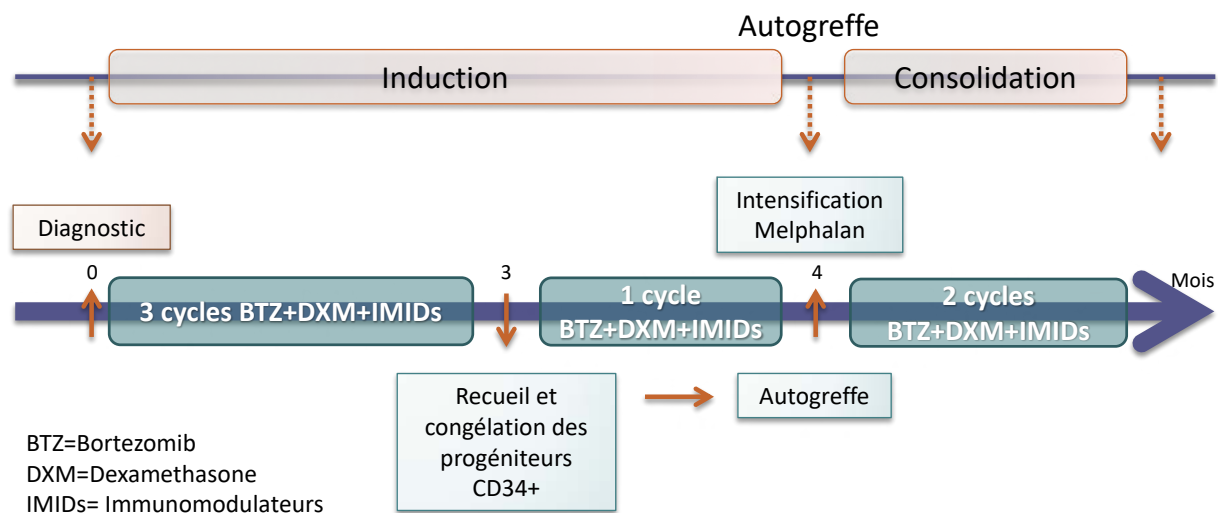


Figure 2: Schéma thérapeutique "classique" du patient <65ans

Schématisation de la prise en charge thérapeutique d'un patient de moins de 65 ans.

F. Évaluation de la réponse au traitement

1. Critères conventionnels

Le traitement du MM est en constante évolution et les patients répondent plus ou moins bien aux nouveaux essais cliniques qui se succèdent. L'International Myeloma Working Group (IMWG) a mis en place en 2006 des critères reproductibles d'évaluation de la réponse aux traitements⁶³:

- Des critères de réponse reposant sur la présence ou non de PC malins dans la moelle osseuse, d'Ig monoclonale urinaire et sanguine.
- Des critères de progression de la maladie basés sur les mêmes critères que ceux de la réponse, complétés par une analyse des lésions osseuses et de la calcémie.
- Des critères de rechute de la maladie avec une analyse complète identique à celle du diagnostic.

Ils sont référencés dans le **Tableau 2**.

Catégories	Sous-catégorie	Critères
Réponse au traitement	Rémission complète stringente (sCR)	Comme la Rémission Complète + - Ratio des chaînes légères libres normal - Immunophénotype plasmocytaire négatif
	Rémission complète (CR)	- Immunofixation sérique et urinaire négative - Disparition des plasmocytomes dans les tissus mous - ≤5% de plasmocytes médullaires
	Réponse partielle de bonne qualité (VGPR)	- Ig monoclonale détectable par immunofixation et non détectable en électrophorèse Ou - Ig monoclonale sérique diminuée de 90% et Ig urinaire <100mg/24h
	Réponse partielle (PR)	- Ig monoclonale sérique diminuée de 50% - Ig monoclonale urinaire diminuée de 90% ou <200mg/24h - Réduction de taille des plasmocytomes de plus de 50%
Progression de la maladie		- Augmentation de 25% par rapport à la valeur la plus basse pour : l'Ig monoclonale sérique ou l'Ig monoclonale urinaire ou le pourcentage d'infiltration plasmocytaire (>10%) - Lésions osseuse (nouvelle ou augmentation de taille) ou plasmocytome des tissus mous - Hypercalcémie (calcémie>11,5mg/dL ou 2,65mmol/L)
Rechute clinique		- Nouvelles lésions osseuses ou extra osseuses - ou Hypercalcémie (calcémie>11,5mg/dL ou 2,65mmol/L) - ou Diminution de l'hémoglobine ≥2g/dL - ou Augmentation de créatinine sérique ≥2mg/dL

Tableau 2 - Critères d'évaluation de la réponse au traitement

2. La MRD

Grace aux nouvelles thérapies, on observe un taux élevé de réponse complète des patients. Il a donc été nécessaire de créer de nouveaux critères de réponses grâce à des analyses plus poussées des cellules tumorales résiduelles dans la moelle osseuse. Il s'agit de l'étude de la maladie résiduelle minimum (MRD) en utilisant des nouvelles technologies : la cytométrie en flux (CMF) ou encore le NGS. C'est dans cette optique que l'IMWG a défini des nouveaux critères de réponse de MRD négative (**Tableau 3**)⁶⁴. En 2008, Paiva *et al* publient des résultats de détection de MRD par CMF sur 295 patients. L'analyse de 125 patients MRD- versus 170 MRD+ révèle une meilleure PFS (respectivement 71 versus 37 mois), une meilleure survie globale (respectivement médiane non atteinte versus 89 mois) ainsi qu'une survie sur 5 ans de l'ordre de 60% versus 22% respectivement chez les MRD- versus MRD+⁶⁵. En 2018, Perrot *et al* confirment ces résultats par analyse des MRD de l'étude IFM2009 sur 700 patients au début de la maintenance et 12 mois post-greffe⁶⁶.

Catégories	Critères
MRD négative prolongée	MRD négative dans la moelle osseuse (par CMF et/ou NGS) et par imagerie. A confirmer sur un intervalle minimum d'1 an
MRD négative en CMF	Absence de clone phénotypiquement anormal dans la moelle osseuse par CMF (avec un minimum de sensibilité de 10^{-5})
MRD négative en NGS	Absence de clone dans la moelle osseuse par NGS. Présence d'un clone= séquençage d'au moins 2 reads identiques en utilisant une plateforme avec une sensibilité $>10^{-5}$
MRD négative moelle et imagerie	MRD négative dans la moelle osseuse (par NGS et/ou CMF) + Disparition des hyper-métabolismes (visible au TEP-scan) ou diminution de la valeur d'absorption standardisée inférieure au médiastin ou diminution inférieure aux tissus mous environnants

Tableau 3 - Critères de MRD

III. Le microenvironnement du Myélome

L'introduction de nouvelles thérapies et de la greffe de cellules souches hématopoïétiques ont permis d'augmenter le taux de réponse et la survie globale des patients atteints de MM. Néanmoins cette pathologie reste incurable, et cibler l'environnement proche de la tumeur semble nécessaire. Les PC malins se développent dans la moelle osseuse grâce au support de l'environnement proche appelé microenvironnement. Il se divise en 2 compartiments :

- Un premier compartiment cellulaire composé de cellules dérivées des cellules souches hématopoïétiques (les lymphocytes, les cellules myéloïdes, les NK, et les ostéoclastes (OC)) et de cellules non hématopoïétiques dérivées de cellules stromales de la moelle osseuse (les fibroblastes, les ostéoblastes (OB), les adipocytes, les chondrocytes, les myocytes et les cellules endothéliales) et les vaisseaux sanguins. Ce premier compartiment est schématisé par la **Figure 3**.
- Un second compartiment non cellulaire composé de la matrice extracellulaire et d'un milieu riche en cytokines, facteurs de croissances et chimiokines sécrétés par les cellules du premier compartiment. Pour plus de clarté, ce compartiment ne sera pas détaillé dans cette étude.

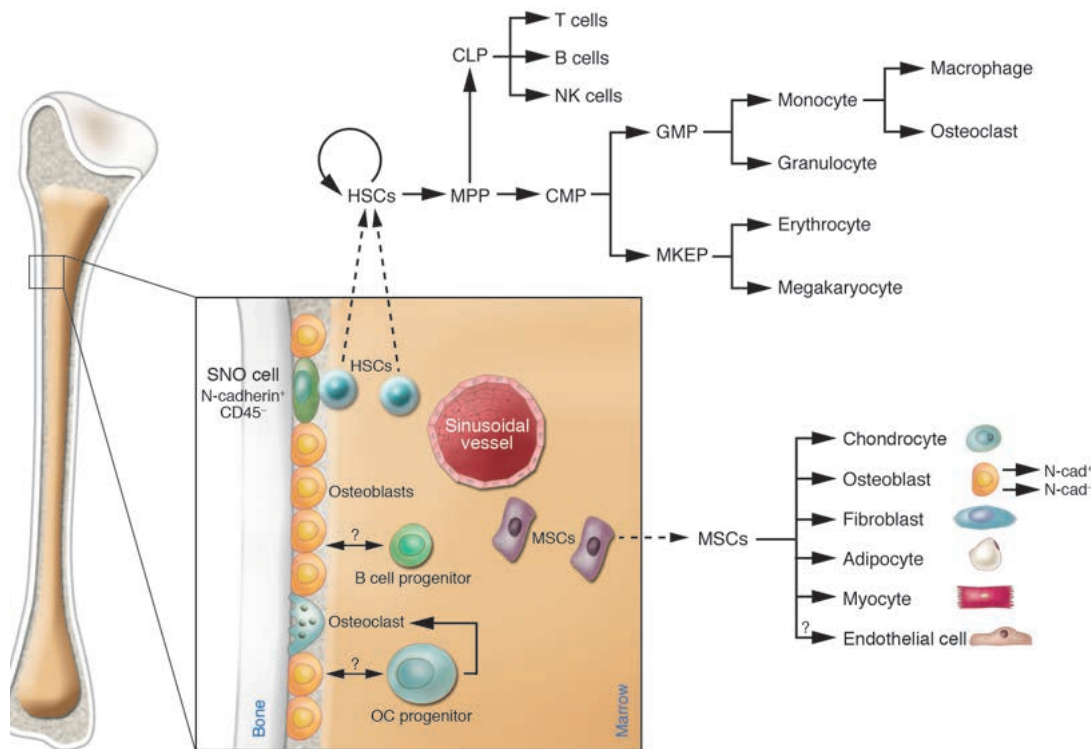


Figure 3 Compartiments hématopoïétique et non hématopoïétique de la moelle osseuse

Le compartiment hématopoïétique est composé de cellules souches hématopoïétiques (HSC) qui peuvent se différencier en progéniteurs multipotents (MPP) puis en progéniteurs communs lymphoïdes (CLP) ou myéloïdes (CMP). Selon les signaux présents dans le microenvironnement, les CMP pourront se différencier en progéniteurs mégacaryocytaires érythroïdes (MKEP) ou progéniteurs granulocytaires et macrophagique (GMP). Dans le compartiment non hématopoïétique, on retrouve les cellules stromales mésenchymateuses qui pourront elles se différencier en chondrocytes, OB, fibroblastes, adipocytes, myocytes et cellules endothéliales. Schéma adapté de Yin T et al⁶⁷.

Au début de la maladie, cet environnement fonctionnel tente d'éradiquer la prolifération des cellules plasmocytaires malignes mais va ensuite dériver pour agir en synergie avec les cellules tumorales et créer un microenvironnement pro-tumoral⁶⁸. Cet échappement de la tumeur au système immunitaire fait l'objet d'études et de développements de nouvelles thérapies, entre autres, *via* l'utilisation des immunomodulateurs faisant partis de l'ensemble des immunothérapies. Les interactions présentes entre les PC malins et les cellules immunitaires et non immunitaires favorisent la progression de la maladie *via* des contacts direct entre ces cellules mais aussi *via* des facteurs sécrétés. Ces interactions sont schématisées dans la **figure 4**⁶⁹.

A. Les cellules immunitaires dans le MM

Dans la moelle osseuse des patients atteints de MM, les cellules du système immunitaire jouent un rôle important pour promouvoir ou inhiber le développement des PC malins. Dans les phases précoces de la maladie, les cellules myéloïdes comme les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules suppressives myéloïdes (MDSC), sont recrutées pour faire face à la tumeur mais peuvent par la suite promouvoir la croissance des PC malins^{70,71}. Seuls les lymphocytes T, provenant de la lignée lymphoïde, seront détaillés dans ce manuscrit.

Les Lymphocytes T sont des cellules du système immunitaire provenant d'un progéniteur lymphoïde commun. Dans le thymus, ils se différencient en 2 types de cellules les LT CD4 dit auxiliaires ou helper (LTh) et les LT CD8 dit cytotoxiques. Ils rejoignent ensuite la circulation sanguine, puis les organes lymphatiques où ils seront mis au contact d'un pathogène grâce aux cellules présentatrices d'antigène (comme par exemple les DC). Suite à cette activation, ils pourront proliférer et exercer leur effet tueur (LT CD8) ou l'activation d'autres cellules du système immunitaire (LT CD4). Dans le cadre du MM, plusieurs hypothèses pourraient être à l'origine de l'échappement des PC malins au contrôle réalisé par le système immunitaire, la première étant une altération de l'activation des LT cytotoxiques par les cellules dendritiques (DC). Dans un contexte non tumoral, la DC initie la réponse immunitaire *via* son dialogue avec le LT⁷². Dans le cadre du MM, les DC semblent perdre leur capacité à stimuler la prolifération des LT « allogéniques » et à produire des cytokines dans le sang des patients⁷³. Dans la moelle osseuse des patients, les DC semblent capables d'activer spécifiquement les LT CD8. Toutefois, comme elles peuvent aussi réguler de façon négative l'expression de certaines sous-unités du protéasome des PC malins, ces derniers deviennent moins immunogènes et donc résistants aux LT CD8⁷⁴. La seconde hypothèse porte sur l'anergie et la non fonctionnalité des LT présents dans la moelle. En effet, Dhodapkar *et al* montrent que des LT de patients ne reconnaissent pas les cellules tumorales autologues *ex vivo* sans stimulation préalable et ne pourraient donc pas exercer leur fonction de lyse tumorale⁷⁵. Guillerey *et al* mettent en avant la présence d'une population de LT CD8+ CD226- (présent dans la moelle de MM) qui ne sont plus capables d'éradiquer la tumeur⁷⁶. Finalement, les résultats décevants de l'utilisation des inhibiteurs des points de contrôle de la réponse

immunitaire (immune checkpoint) dans le MM^{77,78} nous montrent bien la présence d'un LT difficilement stimuable.

En ce qui concerne les LT CD4 ou LTh, il est maintenant établi que ces cellules jouent un rôle important dans la réponse immunitaire aussi bien humorale que cellulaire. Il existe 4 sous-types de LTh :

- Les Th1, qui activent l'immunité à médiation cellulaire (LT CD8, macrophages et NK) *via* la production d'IFN γ et IL2⁷⁹ ;
- Les Th2, qui activent l'immunité à médiation humorale (LB) *via* la production d'IL4, IL5, IL10 et IL13⁷⁹ ;
- Les LTh17, impliqués dans la promotion de l'inflammation *via* la production d'IL17A, IL6 et TNF α ⁸⁰ ;
- Les LT régulateurs (LTreg), qui ont un effet immunomodulateur *via* la sécrétion de TGF β (Transforming growth factor β) et d'IL10⁸¹.

Les études réalisées sur du sang de patients atteints de MM sont très controversées et se contredisent. En comparant des prélèvements de sang issus de patients ou de donneurs sains, Sharma *et al* observent une diminution des cytokines Th1 (IFN γ) associée à une augmentation des cytokines Th2 (IL10 et IL4) chez les patients, suggérant donc un mécanisme plutôt humoral dans le sang des patients atteints de MM⁸². Alors que Feng *et al* observent dans le sang de patients atteints de MM, plus de LTh1, LTh17 et moins de LTreg que chez les donneurs sains, en adéquation avec les cytokines retrouvées dans le sérum⁸³. Prabhala *et al* retrouvent eux aussi une augmentation de LTh17 dans le sang mais aussi dans la moelle des patients atteints de MM associé à une augmentation d'IL17, IL21, IL22 et IL23 dans ces 2 compartiments. Ils observent aussi que l'IL17 produit dans la moelle et dans le sang pourrait être responsable de la promotion de la tumeur⁸⁴.

Finalement, la dernière hypothèse émise qui pourrait être à l'origine de l'échappement des PC malins au système immunitaire est l'environnement immunosuppresseur présent dans la moelle osseuse des patients atteints de MM. Nakamura *et al* étudient la présence de MDSC dans la moelle de patients atteints de myélome. Ils s'aperçoivent que les MDSC induisent une forte sécrétion d'IL18 responsable de l'immunosuppression des LT et de la survie des PC malins⁷¹. Cette immunosuppression est représentée dans la **figure 4**.

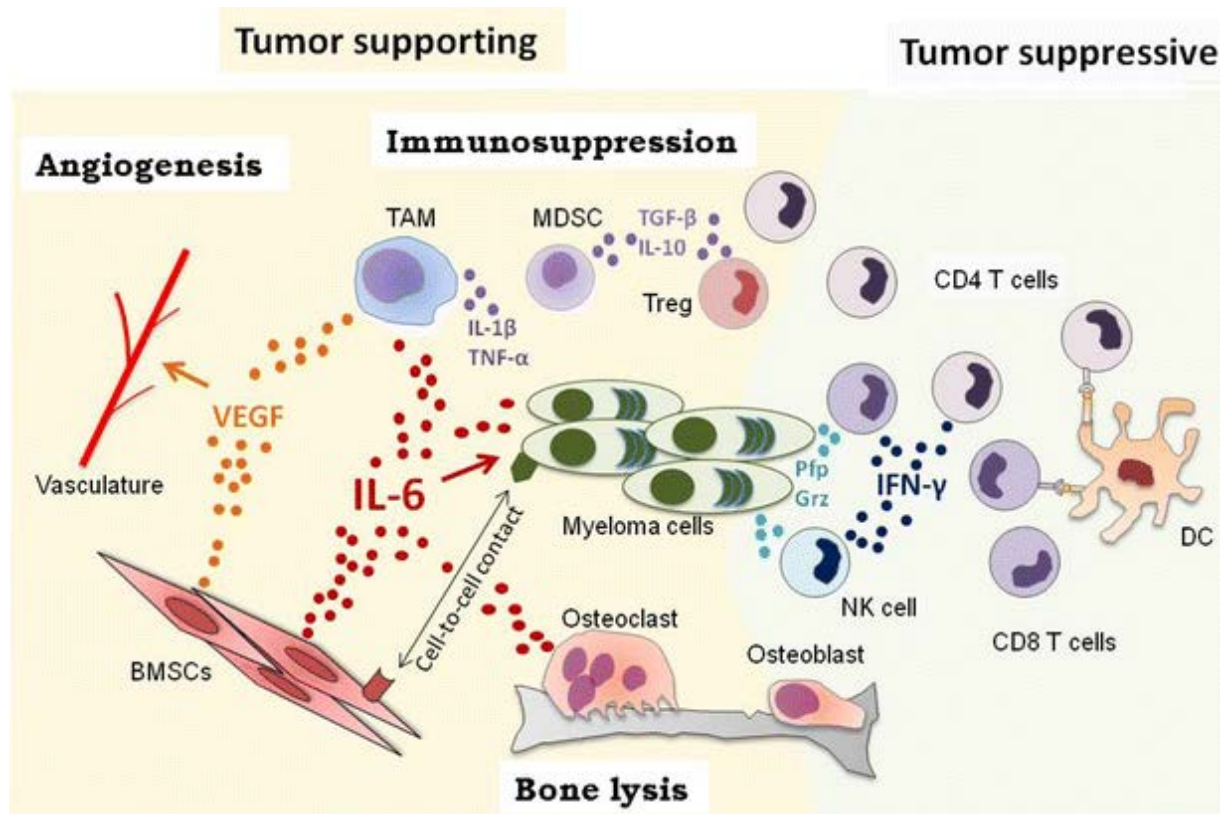


Figure 4: Dialogue entre plasmocytes malins et cellules du microenvironnement

Schématisation de l'échappement des PC malins au contrôle immunitaire réalisé par les LT CD4, LT CD8, NK et DC. Les cellules du microenvironnement agissent en synergie pour promouvoir la croissance des PC malins. Les MDSC, TAM (Tumor associated macrophage), Treg, OC et cellules stromales créent un environnement immunosuppresseur via la sécrétion de cytokines et permettent aux PC malins d'échapper au système immunitaire. Adapté de la Figure 1 de Guillerey et al⁶⁹.

B. Les cellules et composants non immunitaires dans le Myélome

Plusieurs types de cellules non immunitaires présentes dans l'environnement proche des PC malins participent au développement de la maladie, comme par exemple les fibroblastes, les OB, les adipocytes, les MSC mais aussi des composants de la matrice extracellulaire et des vaisseaux, composés de cellules endothéliales. Dans un souci de clarté, seul les OC, OB et adipocytes seront présentés dans cette partie.

1. Lignée myéloïde : les ostéoclastes

Au niveau de la surface de l'os, les GMP provenant de la différenciation des CMP (**Figure 3**), subissent différentes stimulations de l'environnement, entre autres des cellules stromales de la moelle, pour donner des OC. Dans la moelle osseuse, les GMP, suite à une stimulation par du M-CSF (Macrophage colony stimulating factor), donnent des pré-OC. Sous l'influence de 2 facteurs essentiels à la différenciation, RANKL (Receptor Activator of Nuclear factor κ B Ligand) et CSF-1 (Colony-Stimulating Factor-1), les pré-OC pourront donner des OC matures^{85,86}. La dégradation de l'os, ou ostéoclastogénèse, est un mécanisme très régulé qui est en équilibre avec la formation osseuse, ou ostéoblastogénèse. Les OB jouent un rôle critique dans ce phénomène, puisque ce sont elles qui sécrètent différentes protéines nécessaires à cet état d'équilibre, l'ostéoprotégérine (OPG), le M-CSF et RANKL. L'OPG est un leurre de RANK qui va peut piéger RANKL et bloquer la formation des OC⁸⁷. Pour contre balancer cet effet, les OB sécrètent aussi du M-CSF, favorisant la différenciation en OC mature, et RANKL qui peut se fixer sur RANK et réguler la résorption osseuse^{88,89} (**Figure 5** adaptée de W.J. Boyle *et al* et Y Han *et al*^{90,91}).

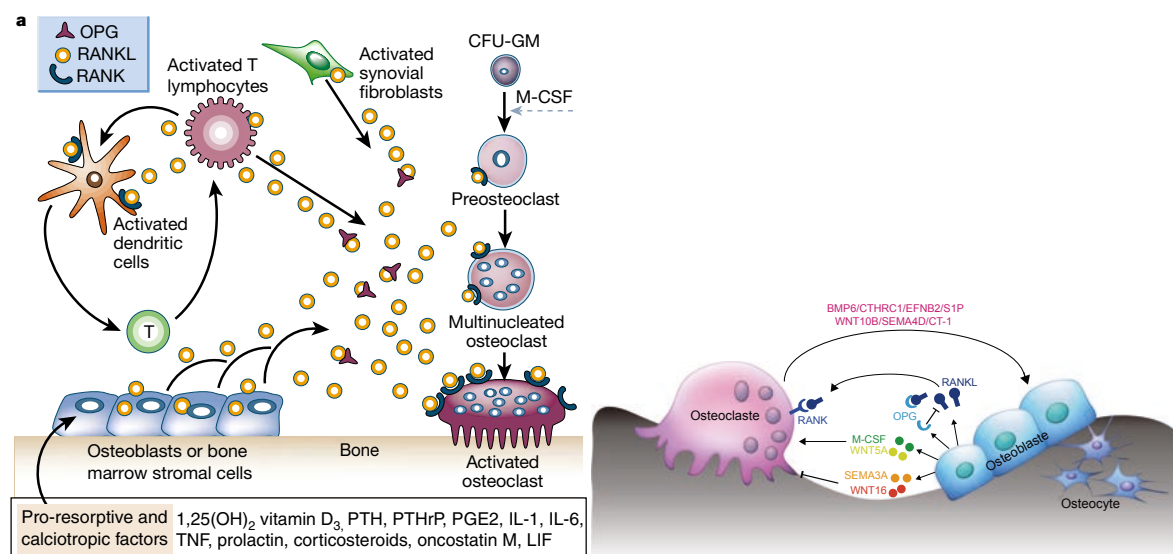


Figure 5: Dialogue entre ostéoclastes et ostéoblastes

Schématisation du dialogue bidirectionnel en OC et OB via la sécrétion de RANKL et OPG par les OB, les fibroblastes et les LT. Adapté de Boyle *et al* et Han *et al*^{90,91}.

Dans le cadre du MM, les OC ont été largement décrits comme jouant un rôle prépondérant dans la pathologie directement ou indirectement *via* la sécrétion bidirectionnelle de facteurs entre les PC malins et les OC mais aussi par modulation du microenvironnement proche qui favorise la dégradation osseuse⁹²⁻¹⁰⁵.

a) *Dérégulation de l'axe RANK/RANKL/OPG*

Un phénomène décrit dans le MM est la dérégulation de l'axe RANKL/OPG dans le sérum et dans la moelle des patients atteints de MM. Terpos *et al* ont identifié une augmentation de RANKL soluble associée à une baisse d'OPG dans le sérum de 121 patients atteints de MM. L'augmentation de ce ratio RANKL soluble/OPG est corrélée à une résorption osseuse importante ainsi qu'au développement du MM¹⁰⁵. Pearse *et al* nous montrent sur des coupes d'immunohistochimie de moelles, la surexpression de RANKL associée à une sous expression d'OPG, sur les coupes de MM par rapport aux moelles saines¹⁰⁶. Plusieurs études ont montré que cette forte expression de RANKL pourrait provenir directement de la sécrétion de RANKL par les PC malins^{102,103} et les LT¹⁰⁷ mais aussi du dialogue entre PC malins et MSC ou pré-OB¹⁰⁰. Le rôle du microenvironnement et notamment des MSC dans ce mécanisme n'est pas encore totalement défini. Le denosumab (Prolia®), anticorps monoclonal de type IgG2, a obtenu l'AMM en 2018 en France dans le cadre du traitement de l'ostéoporose. Il s'agit d'un anticorps humain qui se lie spécifiquement et avec une forte affinité à RANKL, inhibant ainsi la formation et la fonction des OC. Il a été testé dans le cadre du MM sur une étude de phase 3 (NCT01345019) en comparaison avec l'acide zoledronique, sur 1704 patients et n'induit pas d'amélioration en terme de survie sans progression. Il induit les mêmes effets indésirables (neutropénie, thrombopénie, anémie, hypocalcémie et pneumonie) que l'acide zoledronique. Malgré tout, il paraît avoir moins d'effets concernant la toxicité rénale (10% vs 17% chez les patients traités par le denosumab vs acide zoledronique)¹⁰⁸. Cibler l'axe RANK/RANKL semble être une stratégie intéressante mais à améliorer.

b) Facteurs sécrétés

La cytokine CCL-3 (CC-chimiokine Ligand 3), aussi appelée MIP1 α (Macrophage inflammatory protein 1 α), est impliquée dans l'inflammation aigue, plus particulièrement dans les stades tardifs de la différenciation osseuse. Elle est sécrétée par les PC malins^{98,104}. Uneda *et al* ont montré sur des coupes d'immunohistochimie de moelles de 31 patients, que 58% des patients sont MIP1 α + et 42% sont MIP1 α -. MIP1 α semble être corrélé à la présence de lésions osseuses puisque 16/18 patients MIP1 α + (89%) vs 6/13 patients (46%) des MIP1 α - ont des lésions osseuses⁹⁸. Terpos *et al* ont mesuré la concentration de MIP1 α dans le sérum de 86 patients et ont montré une corrélation entre un fort taux de cette cytokine et la présence de destructions osseuses, associés à une mauvaise survie¹⁰⁴. Par ailleurs, CCR1 et CCR5, les récepteurs de cette cytokine, sont présents à la surface des PC malins mais aussi des MSC de la moelle, OC et OB. Lentzsch *et al* suggèrent que dans le cas du MM, MIP1 α en plus de son action sur les OC, pourrait promouvoir la croissance, la survie et la migration des PC malins⁹⁷. Quelques inhibiteurs pharmacologiques de CCR1 ont vu le jour dont le MLN3897 (CCX721, BX471, ...). Ils montrent une décroissance de la tumeur, associée à une diminution du nombre et de la taille des lésions osseuses aussi bien *in vitro* que *in vivo*^{109,110}.

L'IL3 et l'IL6 sont des cytokines sécrétées par les lymphocytes et les MSC respectivement. Elles sont toutes deux retrouvées surexprimées dans la moelle de patients atteints de MM^{96,111}. L'IL3 est connue pour stimuler la différenciation des OC et inhiber celle des OB⁹⁶. L'IL6 est quant à elle connue comme promoteur de survie et inhibiteur de l'apoptose des OC et des PC malins dans le cadre du MM^{111,112}. L'IL17 est une cytokine pro-inflammatoire produite par les LT helper qui peut promouvoir l'activation des OC. Dans le MM, l'utilisation d'un anticorps monoclonal bloquant l'IL17 (AIN457) sur des souris SCIDhu montre une inhibition de la croissance et de la survie des PC malins ainsi qu'une baisse des OC¹¹³.

L'ACTIVIN A, est une glycoprotéine qui régule différentes fonctions biologiques comme l'homéostasie hormonale, la croissance des muscles, l'inflammation mais aussi le remodelage osseux. Vallet *et al* ont retrouvé l'ACTIVIN A augmentée dans le plasma de moelles de patients et corrélée à la présence de lésions osseuses. Ils ont aussi montré qu'en plus d'activer les OC, l'ACTIVIN A pourrait aussi inhiber la différenciation ostéoblastique. L'utilisation d'un inhibiteur d'ACTIVIN, dans un modèle murin SCIDHu, inhibe la croissance tumorale et reverse l'inhibition des OB⁹².

L'ostéopontine est une protéine retrouvée entre autres dans les os. Elle est impliquée dans l'activation des OC et l'angiogenèse, et a donc un double rôle dans le MM. Elle est aussi retrouvée surexprimée dans le sérum et le plasma des patients atteints de MM car produite entre autres par les PC malins et les cellules stromales^{95,101}. Le blocage de l'ostéopontine et du VEGF sur des co-culture de lignées de PC malins avec des OC, semble réduire l'angiogenèse et la dégradation osseuse, suggérant un lien direct entre ostéopontine, VEGF et prolifération des PC malins et OC¹¹⁴.

Le SDF-1 (Stromal cell derived factor-1) ou CXCL12 (CXC-chemokine ligand 12) est une chémokine sécrétée par les cellules stromales caractérisée comme facteur de croissance des progéniteurs des LB, responsables du « homing » des CSH. Cette cytokine se fixe sur son récepteur CXCR4 qui est exprimé à la surface des OC⁹³. Zannettino *et al*, constatent une production importante de SDF-1 par les PC malins de MM eux-mêmes, et que le SDF-1 sanguin est retrouvé positivement corrélé à la présence de lésions osseuses. Ils démontrent *in vitro* que le SDF-1 est responsable des lacunes osseuses et qu'il augmente le nombre et l'expression des gènes d'activation des OC⁹⁴. SDF-1 pourrait donc participer au recrutement des précurseurs ostéoclastiques au niveau de la moelle et favoriser la dégradation osseuse. L'utilisation *in vivo* d'un inhibiteur de CXCR4 (BKT140) montre un ralentissement de la croissance tumorale associé à une augmentation de l'apoptose par les PC malins¹¹⁵.

Le dialogue PC-OC semblent donc jouer un rôle important dans la croissance et le développement des OC mais aussi dans la physiopathologie du MM. L'identification de ces nouvelles cibles apparaît importante pour le développement de nouvelles thérapies. Cependant, l'échec de certaines thérapies dans le ciblage des facteurs pro-ostéoclastiques nous amène à penser qu'il serait intéressant d'y ajouter des traitements visant à améliorer les fonctions ostéoblastiques.

2. Les ostéoblastes

Les OB sont des cellules mononuclées qui proviennent des MSC dont la différenciation est médiée, notamment par l'expression du facteur de transcription RUNX2 (Runt-Related transcription factor 2)¹¹⁶. Le début de la différenciation ostéoblastique nécessite la persistance de l'expression de RUNX2, l'expression d'ostéonectine (SP7) et l'activation des voies de signalisation dont fait partie la voie Wnt (Wingless-related integration site1)^{117,118}. Les OB sont

principalement retrouvés au niveau de la surface de l'os pour aider à former et réparer l'os, en synthétisant de la collagénase, en produisant de l'ostéocalcine et par minéralisation¹¹⁸.

Les premières études réalisées sur les OB dans le cadre du MM, montrent que les PC malins sont capables d'inhiber la prolifération, la différenciation et la fonction des OB *via* des facteurs sécrétés mais aussi par contact direct^{119,120}. Cette inhibition pourrait être causée par différents mécanismes : un déséquilibre de la voie de signalisation Wnt dans les OB et les PC malins, les facteurs de transcription RUNX2/CBFA1 (core-binding factor α 1) ou une modification d'autres facteurs comme l'IL7, TGF β et GFI.

a) *Voie de signalisation Wnt*

La voie Wnt est une voie importante dans le contrôle de l'ostéoblastogenèse. Elle se décompose en 2 voies, la canonique et la non canonique. Les glycoprotéines Wnt se fixent sur le récepteur LRP5/6 (Lipoproteins receptor-related proteins 5 et 6) pour activer la voie canonique et induire la transcription de TCF/LEF impliqué dans la prolifération, la différenciation, l'adhésion, et la survie cellulaire. La voie non canonique quant à elle, fait intervenir le récepteur Ryk/ROR et implique la transcription de AP-1 et NFAT¹²¹. Ces voies sont représentées dans la **figure 6**. On retrouve 2 classes d'antagonistes de cette voie Wnt, les membres de la famille DKK1 (Dickkopf-1) et les protéines sFRP (secreted frizzled-related proteins). Ces 2 classes d'antagonistes entraînent la suppression de la voie Wnt et réduisent donc la fonction des OB^{122,123}.

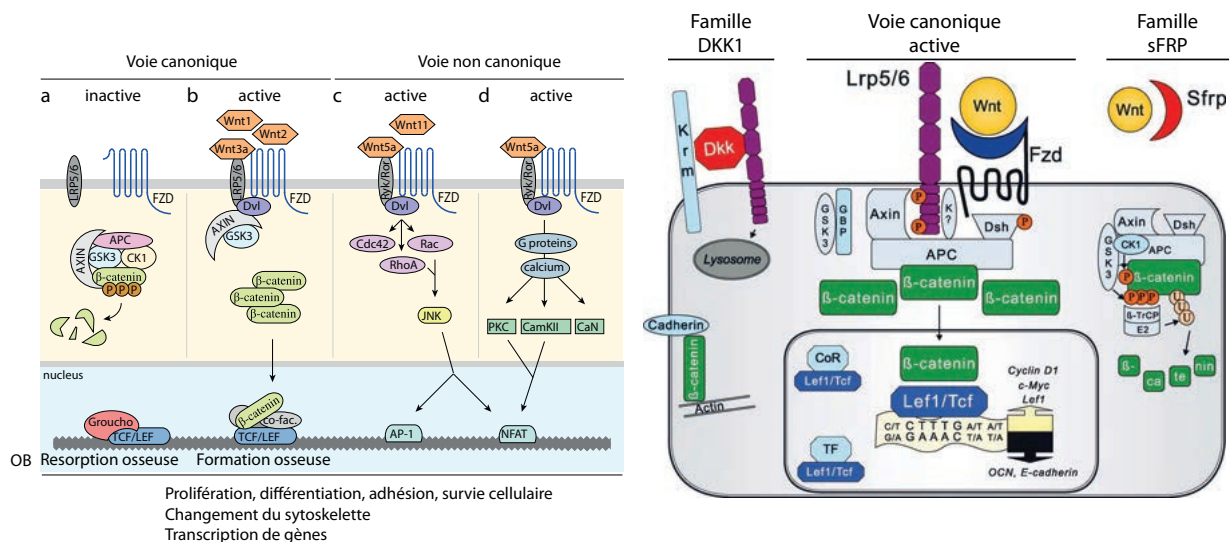


Figure 6 : Voie de signalisation Wnt

Schématisation des voies canoniques et non canoniques par différents facteurs. La voie canonique est activée par Wnt1, Wnt2 et Wnt3a en se liant au récepteur Fzd (Frizzled) et à son corécepteur LRP5/6. Cette activation permet à la β -caténine de transloquer dans le noyau pour activer différentes voies de signalisation. La voie non canonique fait intervenir Wnt5a et Wnt11 en se liant à Ryk/Ror pour activer des programmes transcriptionnels impliquant AP-1 et NFAT. Adapté de Spaan et al¹²¹. La voie canonique active peut être inactivée par DKK1 qui bloque le récepteur LRP5/6 ou par Fzps soluble, sFRP qui rentre en compétition avec Fzd. Adapté de Westendorf et al¹²².

DKK1 est exprimé par les OB, les MSC et depuis peu a été montré comme surexprimé par les PC malins. Un niveau très élevé de DKK1 a été retrouvé dans le sang et la moelle de 173 patients au diagnostic du MM comparé à 45 donneurs sains. Cette étude a aussi été réalisée sur des PC de patients purifiés, elle a comparé ceux des patients avec ou sans lésions osseuses pour connaître la différence d'expression génique responsable de la dégradation osseuse. Tian et al ont pu mettre en évidence la présence de seulement 4 gènes significativement responsables de ces lésions, dont DKK1 fait partie¹²⁴. DKK1 serait donc retrouvé surexprimé par les PC malins et associé à la présence de lésions osseuses chez les patients. Yacoby et al ont testé l'utilisation d'un anticorps anti-DKK1 sur des souris SCID-rab à qui ils ont injecté des PC primaires de patients atteints de MM. L'anti-DKK1 a permis d'augmenter la densité minérale des os mais également de réduire la tumeur¹²⁵. Une étude de phase 1 et des résultats préliminaires de l'étude de phase 2 (NCT01302886) montrent que l'utilisation du BHQ880 (anticorps monoclonal type IgG anti-DKK1), entraîne une augmentation de la résistance de l'os 6 mois après le traitement sur 4/5 patients. Toutefois,

l'administration de cet anticorps ne montre pas d'effet direct contre les PC^{126,127}. D'autres essais sont en cours avec BHQ880 et DKN-01, mais les résultats ne sont pas encore disponibles.

Oshima *et al* retrouvent par western blot la présence de sFRP-2 sur des lignées de MM mais aussi sur des PC de patients présentant des lésions osseuses. L'immunodéplétion de sFRP-2 sur des lignées et des PC de patients *in vitro* restaure la capacité de minéralisation osseuse des lignées MC3T3-E1¹²⁸. Des études cliniques sur l'inhibition de sFRP2 n'ont pas encore été réalisées.

Dans le cadre du MM, la voie Wnt est finalement retrouvée sous-exprimée, alors que dans la plupart des cancers solides elle est retrouvée surexprimée¹²⁹⁻¹³¹.

b) Autres facteurs : RUNX2, GFI, IL7, TGFβ

RUNX2 aussi appelé CBFA1 représente le facteur de transcription important pour la différenciation des MSC vers la voie des OB et non adipocytaire ou chondrogénique¹¹⁶. Giuliani *et al* observent une perte de l'activité RUNX2 sur des pré-OB quand ils sont mis au contact de PC malins. Ils démontrent aussi que cet effet est contact dépendant et que l'IL7 pourrait participer à ce phénomène¹³². Cependant, il semblerait que les PC malins surexpriment RUNX2 par rapport à des PC sains. Trotter *et al* montrent que le niveau de RUNX2 dans les PC malins pourrait être corrélé à l'agressivité de la maladie chez les patients. De plus, cette surexpression améliore la croissance des PC malins et la progression de la maladie¹³³.

GFI1 (Growth factor independence-1) est un facteur de transcription qui se lie à l'ADN et module la chromatine pour modifier l'expression de certains gènes. Un niveau élevé de GFI1 pourrait bloquer l'expression de RUNX2 et inhiber l'ostéoblastogénèse. D'Souza *et al* montrent que des MSC isolées de souris GFI1 KO sont résistantes à la suppression des OB induite par les PC malins¹³⁴. L'IL7 semble aussi intéressante car elle régule de façon négative l'activité transcriptomique de RUNX2 et inhibe donc la différenciation des OB¹³². Elle pourrait aussi être impliquée dans la suppression des OB médiée par GFI1¹³⁴.

Finalement le ciblage de RUNX2, GFI1 et IL7 semble intéressant pour restaurer les OB et éviter la destruction osseuse causée par les PC malins.

Le TGFβ est un facteur de croissance fondamental dans le contrôle de l'ostéoblastogénèse. Il est produit par les OB et libéré lors de la résorption de l'os. Il permet alors de stimuler la prolifération des pré-OB et va limiter la différenciation ostéoclastique, *via*

entre autre, l'OPG^{135,136}. En revanche, dans le cadre du MM, TGF β améliore la sécrétion par les OB d'IGF, d'IL6 et de FGF et stimule ainsi la croissance des PC malins¹³⁷⁻¹³⁹. L'utilisation *in vivo* d'un inhibiteur de TGF β , SD208, semble prometteur puisque qu'il entraîne une augmentation de la différenciation et de la formation osseuse chez les souris et induit l'expression de RUNX2¹⁴⁰. Dans le cadre du MM, l'inhibition de TGF β est capable de restaurer la différenciation des OB et supprime en parallèle la croissance des PC malins sur un modèle murin¹⁴¹.

3. Les adipocytes

Les adipocytes proviennent eux aussi de la différenciation de cellules stromales et n'ont pas les mêmes fonctions selon leur provenance et leur localisation. On distingue 2 provenances principales bien distinctes, le tissu adipeux et le tissu médullaire qui sont tous les deux composés de cellules stromales mésenchymateuses, appelées cellules stromales adipocytaires (souvent pré-adipocytaires) ou MSC respectivement¹⁴². Les adipocytes de la moelle osseuse sont beaucoup moins décrits que ceux retrouvés dans le tissu adipeux. Nous nous intéresserons ici seulement à ceux présents dans la moelle osseuse et aux études qui relatent des adipocytes dans la moelle de MM.

a) Les adipocytes de la moelle osseuse

Le tissu adipeux de la moelle ou adipose médullaire représente 70% du volume total de la moelle osseuse chez un adulte sain et peut augmenter en présence de diverses pathologies¹⁴³. Meunier *et al* commencent à parler d'adiposité médullaire en 1971 avec la mise en évidence au cours du temps d'une augmentation du volume du tissu adipeux de la moelle chez des sujets sains et de façon plus importante encore en cas d'ostéoporose¹⁴⁴. En 2011, Liu *et al* comparent des adipocytes murins provenant de la moelle à ceux provenant du tissu adipeux et retrouvent 3918 gènes différentiellement exprimés. Ils mettent en avant une diminution d'expression de gènes spécifiquement associés à l'adipogenèse (PPAR γ (Peroxisome proliferator-activated receptor γ), FABP4 (fatty acid binding protein 4), Perilipin et adiponectin) et une surexpression de gènes de l'inflammation (C/EBP β (CCAAT/Enhancer binding protein β), RGS2 (regulator of G-protein signaling 2), SFRP4 (secreted frizzled related protein 4), TNF α , TGF β 1, GPR109A (G-protein coupled receptor 109A) et IL6)¹⁴⁵. La première étude réalisée chez l'Homme a été faite en 2013 par Poloni *et al* et a permis de comparer les

adipocytes de 9 moelles osseuses à 10 tissus adipeux sous-cutanés de donneurs sains. Cette étude retrouve une sous-expression de gènes spécifiques du tissu adipeux par les adipocytes de la moelle (Lipoprotéine lipase), Adiponectine, Leptine et aP2 (fatty acid binding protein four) et une expression similaire de PPAR γ , contrairement à ce qui avait été notifié au niveau murin en 2011. De plus, l'expression de cytokines régulatrices de l'hématopoïèse (régulateurs positifs : IL6, IL8, G-CSF, GM-CSF et régulateurs négatifs : IL10, IL17, MIP1 α , TNF α) est retrouvée en quantité égale dans le surnageant de culture des adipocytes de moelle et de tissu adipeux¹⁴⁶. Par ailleurs, la morphogénèse des cellules et l'expression de leur marqueur de surface ne semble pas être modifiée par leur localisation dans la moelle¹⁴⁶.

Dans la moelle osseuse, la totalité des adipokines sécrétées par les adipocytes n'est pas encore entièrement connue. Une revue recense celles retrouvées à l'heure actuelle¹⁴⁷. Les adipocytes sont capables de sécréter par exemple, la leptine et l'adiponectine mais en quantité moindre, par rapport aux adipocytes présents dans le tissu adipeux¹⁴⁷. La régulation de l'adipogénèse dans la moelle semble être dictée par PPAR γ et la voie Wnt est inversement corrélée à la présence d'OB^{148,149}. Il est à noter que les adipocytes expriment aussi RANKL et pourrait par ce biais favoriser la différenciation des OC¹⁵⁰.

Par ailleurs, l'augmentation de l'adipose médullaire semble être corrélée avec l'âge et notamment avec l'ostéoporose^{144,151}. De façon surprenante, elle ne semble pas être corrélée à l'indice de masse corporelle ou du moins au surpoids, puisque l'on retrouve une altération avec principalement une augmentation des adipocytes dans la moelle de patientes atteintes d'anorexie (souvent associé à une ostéoporose)^{152,153}.

b) Les adipocytes dans le MM

Les adipocytes dans le MM font l'objet d'étude seulement que depuis ces 10 dernières années. Une étude récente réalisée par Trotter *et al* s'est focalisée sur l'analyse *in vitro* et *in vivo* de lignées murines d'adipocytes (3T3-L1) et de MM (5TGM-1). Ils retrouvent dans la moelle des souris, une augmentation des adipocytes matures par rapport à de la moelle saine, capables de sécréter MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) et SDF-1 qui sont connus pour supporter la croissance des PC malins. De plus, dans leur analyse *in vitro* ils retrouvent une activation de la voie Wnt par les adipocytes matures¹⁵⁴. Enfin, on retrouve plusieurs adipokines connues dans le tissu adipeux : la leptine, l'adiponectine et l'adipsine.

La sécrétion de leptine a été rapportée comme élevée dans le sérum de patients atteints de MM et semble promouvoir la croissance des PC malins¹⁵⁵. Elle semble, avec l'adipsine, améliorer l'expression de protéines de l'autophagie et induire par ce mécanisme une chimiorésistance par diminution de la mort par apoptose des lignées de MM¹⁵⁶. Sur le plan clinique, 2 études ont réalisé une analyse des adipokines sur le sérum de respectivement 174 et 73 patients atteints de MM. Elles montrent que le niveau de leptine n'est pas corrélé aux risque de la maladie^{157,158}.

L'adiponectine quant à elle est retrouvée diminuée dans le sérum des patients¹⁵⁵. Un niveau bas d'adiponectine est retrouvé corrélé à l'agressivité de la maladie et pourrait avoir un rôle protecteur contre le MM^{157,158} mais le mécanisme par lequel l'adiponectine pourrait être néfaste pour la cellule de MM n'est malheureusement pas encore établi.

L'étude des adipocytes dans la moelle de patients atteints de MM reste encore trop peu étudiée et représente un enjeu important. Ces cellules pourraient participer à la promotion de la tumeur, soit directement par les adipokines qu'elles sécrètent, soit en modifiant le microenvironnement, comme par exemple en réduisant l'ostéoblastogenèse. Le lien entre adipocyte et MM n'étant pas encore totalement établi, nous ne savons pas à l'heure actuelle si cette augmentation de volume adipocytaire dans la moelle de MM est la cause ou la conséquence de la maladie. Dans cette optique, il semble intéressant de regarder plus en amont de ces cellules, en commençant par leurs précurseurs, les MSC.

C. Les cellules stromales mésenchymateuses

1. Caractéristiques principales des cellules stromales mésenchymateuses

a) Capacité de différenciation : le rôle des ostéoblastes et des adipocytes

En 1974, Friedenstein est le premier à identifier des cellules stromales multipotentes provenant de la moelle osseuse et précurseurs de différentes lignées du tissu mésenchymateux^{159,160}. Ces cellules, appelées cellules stromales mésenchymateuses, sont décrites comme multipotentes, c'est à dire capables de se différencier en différents types cellulaires. Cette transdifférenciation *in vitro* peut donner des cellules mésodermiques (adipocytes, chondrocytes, OB) mais aussi endodermiques (cellules musculaires et pulmonaires) et ectodermiques (cellules épithéliales et neuronales). Caplan considère les MSC comme des cellules souches car elles ont, en plus de leur capacité de différenciation, la capacité de s'auto-renouveler¹⁶¹. La communauté internationale scientifique considère ces cellules comme stromales (et non souches) car personne n'a réussi à prouver leur capacité d'auto-renouvellement *in vivo*.

The International Society for Cellular Therapy propose en 2006 des critères requis pour définir une cellule comme MSC¹⁶² :

- Leur adhérence au plastique,
- Un phénotype particulier avec l'expression à leur surface d'antigènes spécifiques comme CD105, CD73 et CD90. La non-expression de marqueurs hématopoïétiques tels que CD45, CD34, CD14 (ou CD11b), CD79 (ou CD19) et le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (HLA-DR),
- Leur capacité à se différencier *in vitro* en OB, adipocytes et chondrocytes.

Décrites au départ comme originaires de la moelle osseuse¹⁶¹, elles ont été retrouvées depuis plusieurs années dans les différents organes où elles ont été recherchées. Elles proviennent de tissus adultes comme le tissu adipeux¹⁶³ et le sang périphérique¹⁶⁴ mais aussi de tissus néonataux comme le sang du cordon ombilical, la membrane amniotique ou encore le placenta^{165,166}. Dans le cadre de notre étude nous nous sommes intéressés aux MSC de la moelle osseuse, c'est pour cela que seule leur fonction dans la moelle osseuse sera détaillée dans ce manuscrit.

Outre leur capacité de régénération tissulaire par différenciation en différents types de tissus, leur rôle physiologique est double. D'une part, elles se différencient pour créer, entre autres, des OB qui se positionnent autour des cellules hématopoïétiques et forment ainsi une niche, ou du moins un cocon de protection autour des CSH, en les protégeant des signaux extérieurs de différenciation, d'activation et d'apoptose¹⁶⁷. D'autre part, les MSC maintiennent cette niche dans un état quiescent grâce à leur activité antiproliférative. Pour bloquer la prolifération des CSH, la MSC peut se différencier en fibroblaste ou chondrocyte et sécréter des facteurs pour inhiber la prolifération des LT par exemple. De plus, les MSC ont aussi la capacité de moduler les cellules de l'immunité. Elles peuvent agir sur différentes cellules immunitaires telles que les LT, les NK, les LB, les monocytes, macrophages et les DC^{168,169}.

b) Modulation de l'immunité

Les MSC jouent un double rôle dans l'inflammation. Selon le contexte elles peuvent exercer des effets pro ou anti-inflammatoires de manière indirecte *via* les cellules immunitaires. En présence d'un environnement inflammatoire, par exemple avec un taux élevé de TNF α et d'IFN γ , les MSC adoptent un phénotype plus immunosuppresseur *via* la sécrétion de facteurs qui suppriment la prolifération des LT (IDO, PGE2, NO, TGF β , ...)¹⁶⁹ et inhibent les NK et les neutrophiles. Dans un contexte non inflammatoire, avec de faibles niveaux en IFN γ et TNF α , les MSC sécrètent des facteurs (MIP1 α , RANTES, CXCL9 et CXCL10) visant à améliorer la réponse des LT et à recruter les lymphocytes sur le site touché^{169,170}.

Elles ont aussi la capacité de polariser les macrophages vers un phénotype pro-tumoral par la sécrétion de cytokines (IL-8, IL-6, LIF, ...)¹⁷¹. Par exemple dans le cancer ovarien, Le Naour *et al* ont montré que les MSC associées au cancer sont capables de polariser des monocytes sains vers un phénotype pro-tumoral *via* la sécrétion de cytokines (IL-8, IL-6, LIF, CXCL1/2, CCL5, CXCL3, 5 et 6). Inversement, *in vivo*, lorsqu'ils bloquent le récepteur (CXCR 1/2) à ces chimiokines, le phénotype des macrophages change pour devenir anti-tumoral¹⁷². D'autres études, dont celle de Espagnolle *et al*, montrent que le contact direct entre macrophages anti-inflammatoires et MSC induit un phénotype particulier des MSC, davantage immunosuppresseur¹⁷³.

c) Les récepteurs Toll-like

Cette modulation du système immunitaire pourrait aussi être due à l'expression de TLR (Toll like receptor) par les MSC¹⁷⁴. La grande famille des TLR comprend 13 TLR qui sont des glycoprotéines de membrane, reconnaissant des signaux de danger pour mobiliser les cellules immunitaires adaptatives et innées¹⁷⁵. Dans le cadre du MM, ils ont été longuement étudiés quant à leur expression sur les PC malins. En effet, des études ont montré que les PC malins de patients étaient capables d'exprimer certains TLR (TLR1 est exprimé pratiquement chez 100% des patients, TLR2 semble être absent, TLR8 est exprimé par 50%, ...) ¹⁷⁶. Chaque TLR est stimulé par un ligand qui lui est propre et entraîne des mécanismes spécifiques à chacun¹⁷⁷. Pour les MSC, TLR3 et TLR4 sont clairement décrits comme impliqués dans leur pouvoir immunomodulateur¹⁷⁸. TLR3 lie des virus et stimule la production d'IFN et d'IL12p70. TLR4 se lie aux LPS (lipopolysaccharide) et stimule rapidement la prolifération et la survie des LT CD4¹⁷⁷.

Lu *et al* ont comparé des MSC provenant de tumeurs hématologiques (leucémie aiguë myéloïde) et tumeurs solides (cancer du poumon) à des MSC provenant de moelle de donneurs sains. Ils retrouvent une surexpression de TLR4 dans les MSC des différents cancers et mettent en évidence un phénotype sécrétoire bien spécifique de ces MSC TLR4+ riche en IL6, IL8 et MCP-1. Finalement, ces MSC TLR4+ auraient plutôt un phénotype pro-tumoral de par leurs cytokines pro-tumorales sécrétées mais aussi en inhibant la prolifération et la fonction des NK¹⁷⁹.

Toutes ces études démontrent que les MSC sont des cellules modulables, sensibles aux facteurs sécrétés et aux cellules du microenvironnement mais peuvent elles-mêmes modifier les cellules qui le composent.

2. Thérapies utilisant les cellules stromales mésenchymateuses

Les MSC ont une capacité de régénération tissulaire, un pouvoir immunosuppresseur et sont utilisées en thérapie cellulaire et médecine régénérative. A l'heure actuelle, environ 700 essais cliniques sont recensés pour l'utilisation des MSC dans les maladies inflammatoires et des lésions d'organes.

Dans les maladies orthopédiques, on les retrouve associées à des réparations de fractures osseuses¹⁸⁰, dans la reconstruction de l'os lors d'ostéonécroses¹⁸¹, mais aussi dans la réparation du cartilage et l'arthrose. 844 greffes de MSC autologues ont été réalisées dans le traitement d'arthrose. Ces études réalisées à partir de MSC de patients mises en culture puis réinjectées au patient montrent leur efficacité, mais surtout une bonne tolérance avec peu d'effets indésirables et dans certains cas une efficacité¹⁸². Dans une étude réalisée en Espagne, 15 patients atteints d'arthrose du genou ont reçu une injection allogénique intra-articulaire de 40 millions de MSC lors d'une étude clinique de phase I/II (NCT01586312). Cette intervention a permis d'éviter la chirurgie, une diminution de la douleur et d'augmenter significativement la qualité du cartilage¹⁸³. Dans l'étude de phase I (NCT01585857), ADIPOA, menée en France entre 2012 et 2014, 18 patients atteints d'arthrose ont reçu des doses croissantes de MSC en une injection intra articulaires (allant de $2 \cdot 10^6$ cellules à $50 \cdot 10^6$ cellules). 6 mois après l'injection les patients n'ont pas d'effets indésirables graves et même avec les doses les plus faibles, on observe une baisse de la douleur¹⁸⁴. Ce traitement efficace et innovateur est actuellement en cours de phase II en comparaison à un placebo. Leur effet serait dû non seulement à leur capacité de régénération du cartilage mais aussi à leurs propriétés immun-modulatrices. En effet une augmentation des LT régulateurs et une diminution des monocytes ont été mis en évidence dans les 3 mois suivant l'injection de MSC dans cette étude ADIPOA¹⁸⁵.

Dans les thérapies cardiovasculaires, les MSC pourraient jouer un rôle dans la reconstruction des cellules cardiaques de par les facteurs qu'elles sécrètent. L'injection intracardiaque de MSC chez 30 patients atteints d'ischémie myocardique a permis, dans l'étude POSEIDON, d'améliorer les conditions de vie des patients en améliorant le remodelage ventriculaire¹⁸⁶. De la même façon l'essai clinique de phase I MESAMI (NCT01076920) a été réalisée chez des patients atteints d'ischémies myocardiques. Ces 10 patients ont reçu $61,5 \cdot 10^6$ MSC en moyenne par une injection intraventriculaire autour du ventricule

défectueux. Dans les 12 mois qui ont suivis l'opération les patients ont une amélioration de la fraction d'éjection ventriculaire gauche et du volume ventriculaire gauche télésystolique¹⁸⁷. Suite au succès de cette étude, un essai de phase II est en cours pour comparer l'utilisation des MSC dans cette pathologie face à un placebo, MESAMI 2 (NCT02462330).

Les MSC sont aussi en cours d'étude dans la réparation tissulaire lors des brûlures ou des plaies. Ces cellules ont la capacité d'impacter l'inflammation, de favoriser une ré-épithélialisation, la régénération des tissus, la vascularisation et le remodelage de la matrice extracellulaire. Elles vont donc par ces mécanismes pouvoir contribuer à la régénération des tissus cicatriciels et des plaies¹⁸⁸. Les limites de cette utilisation sont dues au nombre important de cellules à injecter, à l'origine des cellules (la cellule autologue évite le rejet), aux facteurs de croissance ainsi qu'au support physique biocompatible et adapté à la plaie¹⁸⁹.

Les MSC ont un intérêt dans la sclérose en plaque, les lésions de la moelle épinière, les accidents vasculaires cérébraux et les maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson. Dans cette pathologie, une étude a été réalisée sur 12 patients qui ont reçu une transplantation de MSC bilatérale dans la zone subventriculaire cérébrale (2 millions de cellules par kilo). Les 8 patients pris en charge au début de leur pathologie ont vu des améliorations plus importantes (au niveau des signes cliniques) que les patients pris en charge plus tardivement, ainsi que l'arrêt de progression de leur maladie¹⁹⁰.

Actuellement, les recherches se tournent vers leurs caractéristiques immunosuppressives dans les rejets de greffes. De nombreuses études ont décrit l'impact de l'utilisation des MSC dans les maladies auto-immunes (comme la polyarthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux disséminé et la maladie de Crohn) mais aussi dans la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD). Dans un essai réalisé en 2009, 32 patients ont reçu 2 ou 8 millions de MSC/kg pour traiter le rejet de greffon contre l'hôte : 94% des patients ont répondu positivement au traitement sans différence significative entre les 2 doses de MSC injectées¹⁹¹.

Le potentiel thérapeutique des MSC s'est considérablement amélioré depuis leur découverte dans les années 70 et de nombreux essais thérapeutiques ont vu le jour, et ce grâce à leurs propriétés multipotentes, régénératrices et immunosuppressives. Cependant, leur utilisation dans le cancer reste en cours d'évaluation.

3. Cellules stromales mésenchymateuses et cancer

Les MSC sont des cellules dites plastiques, elles ont la capacité de moduler leurs fonctions selon le type de tissu où elles se trouvent et selon l'environnement dans lequel elles sont. Elles sont présentes dans de nombreux tissus et sont connues pour migrer activement vers les sites de lésions tissulaires pour participer à leur réparation. Le cancer est considéré comme une « plaie qui ne guérit jamais » et nécessite donc un recrutement permanent de MSC. Lorsque la MSC se trouve au niveau du site tumoral, un dialogue bidirectionnel s'installe et conduit à un changement de phénotype de la MSC vers un phénotype pro-tumoral, on parle alors de CA-MSc pour MSC associée au cancer (ou encore TA-MSc pour MSC associée à la tumeur).

a) Cellules stromales mésenchymateuses dans le cancer

Depuis ces dernières années, plusieurs études se sont intéressées au rôle physiologique des MSC dans la carcinogénèse.

(1) Recrutement des cellules stromales mésenchymateuses par la tumeur

Lorsque la tumeur s'installe dans un tissu (solide ou hématologique), elle recrute des cellules du microenvironnement dont les MSC. Shannon *et al* ont injecté des MSC murines (exprimant la luciférase) à des souris porteuses de cancer du sein. Ils ont mis en culture des MSC provenant de moelle osseuse (tibias) de souris Balb/C et C57Bl/6, qu'ils ont ensuite transduit avec un adénovirus recombinant exprimant fLuc. Par la suite, la lignée murine de cancer du sein (4T1) est injectée en sous cutanée, puis 10 jours plus tard, les MSC fLUC sont injectées en intra veineuses dans la queue. Ils retrouvent après 12 jours une co-localisation de MSC luc+ avec les cellules tumorales¹⁹². Guangwen *et al* ont reconstitué une moelle de souris irradiée à partir d'une injection intra-osseuse de MSC provenant de souris transgéniques où toutes les cellules expriment une protéine fluorescente verte (GFP). Suite à l'injection de cellules d'une lignée de lymphome (EL4), ils observent un recrutement important de MSC GFP+ (provenant de la moelle osseuse) au niveau du site tumoral¹⁹³. Les MSC se retrouvent guidées par la tumeur grâce aux facteurs sécrétés par cette dernière. En effet, il est maintenant établi depuis de nombreuses années que la tumeur sécrète des chimiokines et des facteurs de croissance pour recruter les cellules et créer son propre environnement. La

sécrétion de CCL2, CCL5, CXCL12 et CXCL16, mais aussi des facteurs de croissance comme l'IGF1, le FGF-2, le VEGF, le PDGF (Platelet-derived growth factor), TGF β ¹⁹⁴ par la tumeur permet le recrutement des MSC. Les différents facteurs responsables du chimiotactisme des MSC dépendent du type de cancer et de la composition du microenvironnement tumoral.

(2) Communication Bidirectionnelle pour créer des cellules stromales mésenchymateuses associées au cancer

Au niveau du site tumoral, une communication s'établit entre les MSC et la tumeur permettant ainsi sa croissance, sa survie et la migration de cellules métastatiques par la suite vers d'autres organes. Une fois la MSC modifiée par la tumeur, on parle de CA-MSC pour MSC associées au cancer.

Mandel *et al* montrent que la co-injection de MSC avec des cellules de cancer ovarien dans des souris immunodéficientes entraîne une augmentation de la croissance tumorale 10 fois plus importante et améliore leur capacité métastatique¹⁹⁵.

Dans les cancers ovariens, Castells *et al* montrent que les CA-MSC favorisent l'angiogenèse permettant ainsi d'accélérer la croissance tumorale *via* notamment la sécrétion de cytokines pro-angiogéniques, IL-6, IL-8 et VEGF, par les cellules tumorales mais aussi par les macrophages¹⁷¹. Une revue de Kristin A et Charis Eng explique que les MSC sécrètent des protéines morphogéniques osseuses importantes pour la différenciation des cellules souches hématopoïétiques et pour la prolifération des cellules tumorales¹⁹⁶.

Dans la plupart des cancers, on retrouve une inflammation importante au niveau du site tumoral organisée pour contrer la tumeur. Cette dernière recrute des MSC pour réduire l'immunostimulation présente, notamment dans les cancers solides. Les CA-MSC sont capables de sécréter des facteurs qui vont polariser et modifier d'autres cellules présentes dans le microenvironnement, comme par exemple les macrophages. Dans un modèle murin de lymphome, les CA-MSC présentes au niveau du site tumoral expriment un niveau important de cytokines telle que l'IL-5, IL-6, CXCL1, CCL2, CCL7, CCL12 et VEGF. CCL2, CCL7 et CCL12 sont des chimiokines ligands de CCR2 exprimées à la surface des monocytes et des macrophages pro-tumoraux. Les MSC, *via* ces cytokines, chimio-attirent les monocytes et macrophages au niveau de la tumeur¹⁹³.

Le microenvironnement tumoral peut aussi contribuer à la progression tumorale et à la chimiorésistance grâce à la formation de nanotubes. Ils permettent la connexion intercellulaire entre les cellules tumorales et les cellules du microenvironnement dont les MSC. Ils vont ainsi permettre la communication cellulaire *via* le transfert de différentes molécules comme les ions, les organelles ou encore des mitochondries. Cette communication favorise les échanges entre les cellules tumorales et les MSC permettant ainsi de favoriser la chimiorésistance¹⁹⁷.

En résumé, un dialogue bidirectionnel s'installe entre la tumeur et les MSC *via* un contact direct cellule-cellule ou *via* la sécrétion de cytokines, d'autres facteurs de croissance, la création de nanotubes ou encore d'exosomes. Cette interaction permet principalement de promouvoir la croissance tumorale *via* l'angiogenèse, l'immunosuppression mais surtout grâce au dialogue avec les autres cellules du microenvironnement.

b) *Le phénotype des cellules stromales mésenchymateuses dans le Myélome Multiple*

Dans le cadre du MM, on retrouve un phénotype particulier de ces MSC qui a été décrit comme différent des MSC de donneurs sains et pourrait jouer un rôle dans le développement de la tumeur^{111,198–200}.

(1) *Origine et phénotype des cellules stromales mésenchymateuses associées au Myélome Multiple*

L'origine des MSC associées au Myélome (MM-MS) n'est pas encore totalement établie. Les MSC étant des cellules très plastiques, elles pourraient soit devenir pro-tumorales suite à une éducation par les cellules tumorales et/ou le microenvironnement tumoral, soit être déjà pro-tumorales au départ et favoriser l'installation des PC malins.

Dans les premières études qui établissent le lien entre MSC et MM, Gunn *et al* montrent que des MSC saines produisent différentes cytokines dont l'IL6. Il est donc possible que l'environnement des MSC au départ soit propice au développement du PC malin. Lorsque des lignées de MM sont mises en présence de sécrétomes de MSC saines, les cellules tumorales expriment fortement DKK1 qui inhibe la différenciation des MSC en OB²⁰¹. En 2014, Garcia-Gomez A *et al* ont analysé le profil transcriptomique des MSC provenant de moelle osseuse (malades ou saines) en présence ou en absence d'une lignée plasmocytaire (MM1S). 2583 gènes sont retrouvés différentiellement exprimés entre des MSC en co-culture avec cette lignée et des MSC en monoculture, qu'elles proviennent de patients atteints de MM ou de donneurs sains. Dans cette liste de gènes, on retrouve principalement des gènes surexprimés par la co-culture comme par exemple des chimiokines (CXCL1, CXCL5 et CXCL6). Ces chimiokines sont impliquées dans la prolifération des PC malins et la promotion de l'angiogenèse. D'autres gènes impliqués dans la prolifération des PC malins (CCL2, CCL3, CD44, EXT1, FN1, HAS2, HGF, IL1b, IL6, IL8, IL16), dans l'activation des OC (CCL2, 3, 4, 20, CHSY1, IL1b, IL6, IL32, LIF) et dans l'inhibition des OB (CCL3, EREG) sont retrouvés surexprimés par les MSC en présence de MM1S²⁰². Cette étude nous montre que les PC malins modifient les MSC pour promouvoir leur croissance tumorale au sein de la moelle.

(2) Différence entre cellules stromales mésenchymateuses de Myélome et de donneurs sains

Comprendre les mécanismes qui permettent d'expliquer la transformation phénotypique d'une MSC saine vers une MM BM-MSc et les modifications de sécrétomes associées permettraient de mieux comprendre et cibler les MSC dans le MM. Pour cela, plusieurs études ont analysé les différences qui existent entre des HD BM-MSc et des MM BM-MSc.

En 2001, Wallace R est le premier à montrer une différence entre des MSC de MM et des MSC de donneurs sains : il parle alors de cellules progénitrices mésenchymales. Il analyse les cytokines sécrétées par des MSC de patients au diagnostic de la maladie. Il note que les MM BM-MSc expriment plus de cytokines IL1 β et TNF α que les HD BM-MSc¹⁹⁸.

En 2007, un profil d'expression génique a permis de comparer le transcriptome de MSC saines à celui de MSC isolées de moelle de patients. Corre *et al* ont mis en évidence 145 gènes différentiellement exprimés entre MM BM-MSc et HD BM-MSc dont 94 sont retrouvés surexprimés par les MM BM-MSc. On retrouve une surexpression des facteurs de croissance déjà décrits comme impliqués dans le MM (IL1 β , IL-6 et DDK1) mais aussi des nouveaux facteurs de croissance comme GDF15 qui augmentent la survie et la chimiorésistance des PC malins (de lignées et de patients)^{111,203}.

D'autres différences sont rapportées, notamment une augmentation de l'expression de gènes associés à la sénescence (senescence-associated β -galactosidase), une augmentation de la capacité à supporter la croissance hématopoïétique (CD34+)²⁰⁴ et une capacité immunosuppressive modifiée²⁰⁵.

Toutes ces études nous prouvent que les MSC de MM sont fonctionnellement différentes des MSC saines probablement dans l'optique de favoriser la croissance tumorale.

c) Effet des cellules stromales mésenchymateuses dans le Myélome

(1) Expression de cytokines

Les MM BM-MSc sont capables de promouvoir la croissance tumorale *via* différents mécanismes. Le premier est la sécrétion de facteurs de croissance et de chimiokines comme l'IL-10, TNF α , HGF (Hepatocyte derived factor)²⁰⁶ ou encore GDF15²⁰³ et l'IL-6²⁰¹. En 2009, McNee a identifié un transcrite régulé positivement chez les MM BM-MSc, *PADI2*, qui induit directement une augmentation de l'expression d'IL6 par les MM BM-MSc²⁰⁷.

Dans la physiopathologie du MM, on retrouve une balance OB/OC dérégulée vers une augmentation en OC qui induit des lésions osseuses. Comme décrit précédemment, les MM BM-MSc perdent cette capacité à se différencier en OB^{111,200} et sécrètent des cytokines qui favorisent le développement des OC comme IL1 β , IL6, IL17, CCL3, CCL4, SDF-1, TNF α ,...

(2) Effet sur l'apoptose

En 2010, Wang a montré que le contact direct de MSc avec des lignées de MM entraîne une surexpression de la survivine impliquée dans l'inhibition de la mort par apoptose des PC malins²⁰⁸. Ces résultats indiquent donc que les MSc peuvent supporter la croissance tumorale en inhibant la mort des PC malins médiée par la survivine.

(3) Communication avec les plasmocytes malins

Le dialogue entre MSc et PC malin peut se faire de différentes façons, soit par contact direct, soit de manière indirecte par la sécrétion de cytokines ou encore par l'intermédiaire d'exosomes. Ces exosomes correspondent à de petites vésicules (de quelques nanomètres) qui sont produites par différents types de cellules et relâchées dans le milieu extracellulaire. Dans le cadre du MM, Roccaro *et al* montrent que des exosomes dérivés de MSc issues de patients favorisent la prolifération de lignées plasmocytaires alors que celles provenant de MSc saines réduisent cette prolifération²⁰⁹.

(4) Expression des protéines de la matrice extracellulaire

Différentes études ont montré que les MM BM-MSC expriment plus de collagène IV, fibronectine et VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule-1) que les HD BM-MSC^{111,198}. Les PC malins et les MSC dialoguent par contact direct grâce à des molécules de surface VCAM-1 pour les MSC et l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ VLA-4 (very late antigen 4) pour les PC malins. Cette interaction est importante pour leur développement, et est retrouvée associée à une ostéolyse importante. Un anticorps bloquant anti- $\alpha 4$ a montré des résultats intéressants sur le modèle murin 5TGM de MM²¹⁰.

(5) Immunomodulation

Dans un contexte inflammatoire, c'est-à-dire en présence de LT activés provenant de cellules mononuclées de sang périphérique (PBMC) de donneurs sains, les MM BM-MSC perdent leur capacité d'immunosuppression²¹¹. Li *et al* suggèrent une diminution de la capacité inhibitrice des MM BM-MSC. Les LT, en présence de MM BM-MSC, expriment des marqueurs d'activation tels que CD29 et CD69 contrairement à ceux présents avec des HD BM-MSC. De la même façon, la mort des LT par apoptose est plus importante en présence des HD BM-MSC. Leurs résultats suggèrent aussi que ces LT provenant de patients atteints de MM peuvent interagir avec des MSC saines et induire une diminution de leurs facteurs de différenciation ostéoblastique (phosphatase alcaline, RunX2 et ostéocalcine)²¹¹. Giallongo *et al* s'intéressent à l'effet immunosuppresseur sur un autre type de cellules, les cellules myéloïdes suppressives granulocytaires (G-MDSC). Ils ont mis en co-culture des MSC saines ou des MSC provenant de patients atteints de MM avec des PBMC. Ils ont ensuite trié par des billes magnétiques les G-MDSC qui ont été pré-éduqué par les MSC et mis en co-culture avec des LT. Dans leur cas, seule les G-MDSC qui ont été éduquées avec des MM BM-MSC sont capables de bloquer la prolifération des LT. L'effet immunosuppresseur pourrait provenir de l'éducation des g-MDSC par les MM BM-MSC²⁰⁵.

L'étude des cellules stromales de la moelle osseuse reste peu développée d'un point de vue translationnel et présente pourtant un enjeu important puisque de nouvelles cibles thérapeutiques pourraient être identifiées. C'est dans cette optique que ce travail sur les MSC a été réalisé. L'objectif principal de l'étude était de comprendre le rôle des MSC dans la rechute du patient. Pour répondre à cette problématique nous avons comparé le génotype et le phénotype des MSC de donneurs sains et de patients atteints de MM à différents stades de la maladie, afin d'identifier une implication potentielle des MSC dans le processus de la rechute, quasiment inéluctable dans le MM.

Dans le cas où une différence pouvait être notée, l'objectif secondaire de cette étude était d'identifier les voies de signalisation activées par les gènes différentiellement exprimés et d'évaluer leur influence dans la progression de la maladie (mécanistique et mise en évidence d'une cible thérapeutique potentielle).

Ce manuscrit sera divisé en 2 parties : la première comprenant l'analyse transcriptomique et l'étude fonctionnelle des MSC, la deuxième concernant la découverte d'une cible thérapeutique potentielle et de son étude dans un modèle murin de Myélome.

RESULTATS

I. Introduction des résultats

Comme décrit précédemment, les MSC semblent être continuellement recrutées pour devenir un compartiment à part du microenvironnement tumoral. Elles jouent un rôle dans l'initiation et la promotion des PC malins et influencent le microenvironnement tumoral. Leur impact sur la rechute après traitement n'a jusqu'ici jamais été étudié. Pour répondre à cette question, nous avons procédé ainsi : nous avons utilisé une bibliothèque d'échantillons de moelle osseuse constituée à l'Unité de Génomique du Myélome, au sein de l'Institut Universitaire du Cancer de Toulouse. Tous les patients inclus ont donné leur consentement signé pour ces analyses conformément à la Déclaration d'Helsinki (référéncé dans l'article Lemaitre et al²¹²).

Dans un premier temps, nous avons défini des critères pour constituer une cohorte de patients atteints de MM la plus homogène et représentative possible. Dans ces critères, on retrouve un choix en terme d'âge, de types de traitements reçus et en termes de stade de la maladie (au diagnostic, en rechute ou en rémission complète). Dans un deuxième temps, les MSC de ces patients ont mises en culture comme décrit dans la littérature¹⁶² et extraites 21 jours plus tard pour réaliser une étude transcriptomique.

Les 2 articles présentés en première et deuxième partie dans ce manuscrit se sont référés à cette même analyse transcriptomique. Dans la première partie nous avons mis en évidence des différences transcriptomiques et fonctionnelles entre MM et HD BM-MS. Dans la deuxième partie nous avons découvert une cible thérapeutique potentielle, le TLR4

II. Première partie : Article I – La modification du transcriptome des MSC persiste après le traitement intensif des patients

Imprinting of Mesenchymal Stromal Cell Transcriptome Persists even after Treatment in Patients with Multiple Myeloma

Lea Lemaitre¹, Laura Do Souto Ferreira¹, Marie-Véronique Joubert¹, Hervé Avet-Loiseau^{1, 2, 3}, Ludovic Martinet¹, Jill Corre^{1, 2¶*} and Bettina Couderc^{1, 2, 3¶*}

¹ UMR 1037 – INSERM – Toulouse, France

² Université de Toulouse, France

³ Institut Claudius Regaud (IUCT-Oncopole), Toulouse, France

¶ J. Corre and B. Couderc are co-senior authors

* Correspondence:

J. Corre (PhD) or B. Couderc (Pr)

IUCT-Oncopole

1 avenue Irene Joliot Curie

31052 Toulouse

France

Tel. +3353156173

Corre.jill@iuct-oncopole.fr couderc.bettina@iuct-oncopole.fr

ACKNOWLEDGMENTS

LL was funded in part by a grant from the Groupe de recherche de l'Institut Claudius Regaud (GRICR).

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no potential conflicts of interest.

Keywords: multiple myeloma, mesenchymal stromal cells, transcriptome, imprinting, adipogenesis, immunogenicity

A. Résumé et conclusion

Le Myélome est une hémopathie maligne caractérisée par une accumulation de PC malins dans la moelle osseuse des patients. Cette pathologie est associée à des signes cliniques spécifiques incluant l'accumulation d'immunoglobulines sécrétées par les PC malins et une lyse osseuse causée par un déséquilibre entre la création et la destruction de l'os (par les OB et les OC respectivement). Malgré toutes les thérapies utilisées à l'heure actuelle, les patients rechutent toujours. Le microenvironnement semble jouer un rôle important dans le développement de cette pathologie et en particulier les MSC sont connues pour leur capacité à promouvoir la croissance et induire une chimiorésistance de différents types de tumeurs dont le MM. Elles peuvent agir aussi bien par contact direct avec les PC malins que par des facteurs sécrétés mais aussi en modulant les autres cellules du microenvironnement. Toutes les études réalisées sur des BM-MSK ont été réalisées sur des patients au diagnostic de la maladie, aucune ne porte sur leur implication possible dans la rechute du patient.

Pour répondre à cette question, nous avons créé une cohorte comprenant des échantillons de prélèvements de moelle osseuse à différents temps de la maladie : 12 ont été réalisés sur des patients au diagnostic (D BM-MSK) et 19 ont été réalisés sur de patients venant en consultation après leur traitement pour le suivi de la pathologie (9 au moment de la rechute (ER BM-MSK) et 10 sur des patients en rémission complète (CR BM-MSK) au moment du prélèvement). Ces cellules ont été comparées à des cellules issues de 10 prélèvements de moelle osseuse de donneurs sains (HD BM-MSK). Nous avons isolé et mis en culture les MSC provenant de ces moelles, pendant 21 jours. Les cellules ont alors été soit utilisées pour des expériences *ex vivo* soit lysées pour en extraire l'ARNm (acide ribonucléique messager) afin de réaliser une analyse transcriptomique. Notre première étape a été de comparer les MSC de patients en rémission complète à celles retrouvées au moment de la rechute. De façon surprenante, au niveau transcriptomique, aucun gène n'a été retrouvé différentiellement exprimé entre ER BM-MSK et CR BM-MSK lors de l'analyse non supervisée de ces 2 groupes. Il semblerait donc que le profil transcriptomique des MSC ne reflète pas ou peu la masse tumorale. Suite à ces résultats, nous avons voulu savoir si, après le traitement des patients, les MSC retrouvent un phénotype sain, pour cela nous avons comparé des HD BM-MSK à nos 3 groupes : D BM-MSK, ER BM-MSK et CR BM-MSK. Nous avons retrouvé, sur une seconde analyse non supervisée, l'expression de 2747 gènes différentiellement exprimés entre HD et

MM BM-MSC dont 440 sont retrouvés significatifs (p-value ajustée $\leq 0,05$). L'analyse en composante principale nous indique par ailleurs, la présence de 3 groupes distincts : les HD BM-MSC, les D BM-MSC et les MSC post traitement (ER + CR BM-MSC). Nous mettons en évidence une modification des MSC qui perdure tout au long du traitement du MM (diagnostic, rémission et rechute). Ces données suggèrent un profil transcriptomique spécifique au diagnostic de la maladie qui évolue après le traitement mais ne revient pas vers un phénotype sain. Les PC malins modifient donc le phénotype des MSC et cette modification, reste ancrée même après un traitement intensif. Nous ne pouvons pas affirmer de façon sûre que cette variation épigénétique ait lieu avant ou après le développement des PC malins, à savoir s'il est la cause ou la conséquence de la pathologie.

Nous avons donc réalisé par la suite une analyse GSEA (Gene set enrichment analysis) sur la liste des gènes retrouvés différentiellement exprimés entre HD et MM BM-MSC. Nous avons pu mettre en lumière une régulation négative de l'expression des gènes appartenant à la voie de signalisation Wnt ainsi qu'une modification de l'activité suppressive des LT. La voie Wnt étant impliquée dans la différenciation des MSC en OB, nous avons par la suite voulu analyser *in vitro* cette capacité de différenciation des MSC sur les différents groupes.

Nous observons en effet que leur perte de capacité de différenciation en OB déjà présente au diagnostic, persiste même après le traitement intensif des patients. De plus, cette perte de différenciation ostéoblastique semble orienter les MSC, suite au traitement, vers un phénotype plus adipocytaire, empêchant ainsi le développement des OB. Ces données sont en lien avec les données cliniques puisqu'en effet à long terme les lacunes osseuses persistent et le patient rechute. En cherchant des facteurs phénotypiques des MSC pouvant prédire la rechute des patients, nous n'avons pas mis en évidence une variation significative dans leur multipotence entre les MSC issues du traitement intensif. Les données que nous mettons en avant dans cette étude semblent en accord avec les données cliniques des patients.

De plus, l'analyse GSEA réalisée sur la comparaison HD vs MM BM-MSC, ayant montré une régulation négative de l'expression de gènes impliqués dans l'immunité, nous avons voulu analyser la capacité immunomodulatrice des MSC des différents groupes. De manière surprenante, nous avons observé une perte des capacités immunosuppressives des CR BM-MSC alors que les ER BM-MSC ont la possibilité de limiter la prolifération des LT CD8 de façon plus importante. Ces résultats suggèrent une perte de l'immunosuppression suite au


traitement et donc un contrôle par le système immunitaire de la maladie, qui à la rechute se retrouve supprimé, entre autres par les MSC. La voie de recherche la plus prometteuse concernant les MSC pour la mise en place de nouvelles thérapies concernerait donc l'étude de leur capacité immunomodulatrice et son contrôle.

B. [Article 1: publié en premier auteur](#)



Article

Imprinting of Mesenchymal Stromal Cell Transcriptome Persists even after Treatment in Patients with Multiple Myeloma

Léa Lemaitre ¹, Laura Do Souto Ferreira ¹, Marie-Véronique Joubert ¹, Hervé Avet-Loiseau ^{1,2,3}, Ludovic Martinet ¹, Jill Corre ^{1,2,3,*} and Bettina Couderc ^{1,2,4,*} 

¹ UMR 1037 INSERM, 31059 Toulouse, France; lea.lemaitre@inserm.fr (L.L.);

dosoutoferreira.laura@iuct-oncopole.fr (L.D.S.F.); marie-veronique.joubert@inserm.fr (M.-V.J.);

avetloiseau.herve@iuct-oncopole.fr (H.A.-L.); ludovic.martinet@inserm.fr (L.M.)

² Université Paul Sabatier, Toulouse 3 University, 31062 Toulouse, France

³ Institut Universitaire du Cancer de Toulouse-Oncopole, 1 avenue Irene Joliot Curie, 31052 Toulouse, France

⁴ Institut Claudius Regaud, IUCT-O, 31052 Toulouse, France

* Correspondence: Corre.jill@iuct-oncopole.fr (J.C.); couderc.bettina@iuct-oncopole.fr (B.C.);

Tel.: +33-5315-6173 (J.C.)

† J. Corre and B. Couderc are co-senior authors.

Received: 26 April 2020; Accepted: 22 May 2020; Published: 28 May 2020



Abstract: Introduction. Multiple myeloma (MM) is a B-cell neoplasm characterized by clonal expansion of malignant plasma cells (MM cells) in the bone-marrow (BM) compartment. BM mesenchymal stromal cells (MSC) from newly diagnosed MM patients were shown to be involved in MM pathogenesis and chemoresistance. The patients displayed a distinct transcriptome and were functionally different from healthy donors' (HD) MSC. Our aim was to determine whether MM-MSC also contributed to relapse. Methods. We obtained and characterized patients' MSC samples at diagnosis, two years after intensive treatment, without relapse and at relapse. Results. Transcriptomic analysis revealed differences in gene expression between HD and MM-MSC, whatever the stage of the disease. An easier differentiation towards adipogenesis at the expense of osteoblastogenesis was observed, even in patients displaying a complete response to treatment. Although their transcriptome was similar, we found that MSC from relapsed patients had an increased immunosuppressive ability, compared to those from patients in remission. Conclusion. We demonstrated that imprinting of MSC transcriptome demonstrated at diagnosis of MM, persisted even after the apparent disappearance of MM cells induced by treatment, suggesting the maintenance of a local context favorable to relapse.

Keywords: multiple myeloma; mesenchymal stromal cells; transcriptome; imprinting; adipogenesis; immunogenicity

1. Introduction

Multiple myeloma (MM) is a hematological malignancy characterized by the abnormal expansion of clonal plasma cells [1]. Despite a huge improvement in survival in the last two decades, most MM patients relapse after a period of remission that is extremely variable from one patient to another. While this relapse is probably due to the selection of chemoresistant-MM cell clones [2,3], some authors have posited the influence of the microenvironment on the recurrence of MM [4,5].

MM develops in the bone marrow, which also contains mesenchymal stromal cells (MSC) that are non-hematopoietic multipotent progenitor cells. MSC are implicated in the pathogenesis of many solid cancers and hematological malignancies, including MM [6]. In MM, they are involved in the growth of malignant cells [7], the acquisition of chemoresistance [8,9], and in the abolition of

the anti-tumor immune response [9]. They are involved in the different steps of tumor progression, in several ways [10]. They directly induce MM cell expansion through the huge amount of cytokines that they produce [6] and via the secreted exosomes [11]. They can dialogue directly with MM cells through close contact [7,12] and membrane exchange, inducing chemoresistance acquisition [13]. They also play a role in the recruitment of other microenvironment cells involved in tumor cell growth, chemoresistance acquisition, and depletion of the immune responses [14–16]

Our own studies and that of other authors have shown that MSC from patients with newly diagnosed MM are abnormal [11,17], as they acquire pro-tumor potentialities. For example, transcriptomic analysis showed that MSC from newly diagnosed MM patients expressed abnormally high levels of GDF15 and IL-6 [11], two cytokines implicated in MM cell growth and chemoresistance [18,19]. To determine whether MM BM-MSCs also play a role in MM relapse, we analyzed the phenotype and transcriptome of MM BM-MSCs throughout the different stages of the MM disease history—at diagnosis, during remission after intensive treatment, and at relapse. MSCs are self-renewing and multipotent progenitors and as such present an asymmetric division with one cell retaining its strain character and one differentiating cell. Our aim was to determine whether the phenotypic modifications of MSCs induced by the appearance of MM cells in the BM occur in the progenitor cells or the differentiated cells. In the first case, the acquisition of the MSC-associated cancer character would be perennial, whereas in the second, the cells would be expected to return to their original phenotype, when the patient is in remission with a complete response. Our second goal was to determine which MSC abnormalities could potentially be involved in MM relapse.

2. Results

2.1. Patients' Samples

We performed this study by isolating MSCs from newly diagnosed MM patients (D BM-MSCs) (group 1, D BM-MSCs, $n = 12$) or from patients treated for newly diagnosed MM, through first-line, high-dose melphalan with autologous stem cell transplantation (post treatment BM-MSCs) ($n = 19$). Table 1 summarizes the patients' characteristics. There were 8 men and 4 women in the diagnosis group, the median age at diagnosis was 51 \pm 6 years, and there were 6 men and 13 women in the post-treatment group and the median age at diagnosis was 59 \pm 5 years. MSCs were isolated either at early relapse (ER BM-MSCs) (group 2, $n = 9$) or in complete remission (CR BM-MSCs) (group 3, $n = 10$). The bone marrow aspirations for the treated patients were performed 9 to 24 months post-transplant, with a median of 16 \pm 4 months for the ER BM-MSCs group, 5 to 24 months for the post-transplant group, and 15 \pm 6 months for the CR BM-MSCs group. Since January 1 2020, the patients in group 3 were still in complete remission, according to the consensus recommendations of the International Myeloma Working Group [20], between 4 and 6 years post-treatment, except for two patients who relapsed more than two years after the analysis (indicated with a star in Table 1). We used MSCs from the healthy donors (HD BM-MSCs) (group 4, $n = 10$) as the control cells.

Table 1. Patient characteristics.

	Patient Number	Male/Female	Age (Years)	Treatment	MSC Samples Obtained at (Months Post-Transplant)
Early Relapse	ER1	M	64	4VTD ¹ /HD Mel + ASCT ² /2VTD	14
	ER2	M	56	3VTD/HD Mel + ASCT/2VTD	9
	ER3	F	65	4VTD/HD Mel + ASCT/2VTD	23

Table 1. Cont.

Patient Number	Male/Female	Age (Years)	Treatment	MSC Samples Obtained at (Months Post-Transplant)
ER4	M	42	4VTD/HD Mel + ASCT/2VTD	18
ER5	F	54	4VTD/HD Mel + ASCT/Unknown ³	24
ER6	F	50	4VTD/HD Mel + ASCT/2VTD	12
ER7	F	61	4VTD/HD Mel + ASCT/2VTD	12
ER8	F	59	xVTD/HD MEL + ASCT/Unknown	15
ER9	F	64	4VTD/HD Mel + ASCT/xVTD	19
CR1*	M	54	xVTD/HD Mel + ASCT/Unknown ³	13
CR2	F	65	4VTD/Unknown	22
CR3	F	62	xVTD/HD Mel + ASCT/Unknown	5
CR4	F	52	4VTD/HD Mel + ASCT/xVTD	6
CR5*	F	65	4VTD/HD Mel + ASCT/Unknown	24
CR6	M	67	xVTD/HD Mel + ASCT/Unknown	14
CR7	F	64	4VTD/HD Mel + ASCT/xVTD	12
CR8	F	63	4VTD/HD Mel + ASCT/Unknown	21
CR9	F	59	5VTD/HD Mel + ASCT/2VTD	8
CR10	M	56	4VTD/HD Mel + ASCT/Unknown	24

¹ Velcade Thalidomide Dexamethasone, ² High-Dose Melphalan + Autologous Stem Cell Transplantation, ³ Unknown Number of cycles, * Patients relapsing 2 years post sampling. Healthy donors (6 males and 4 females) were from 20 to 34 years old. Patients at diagnosis (8 males and 4 females) were from 37 to 59 years old.

Freshly collected MSC were selected by their plastic adherence and maintained in standard culture conditions, as described in the Material and Methods. Their identity was verified by flow cytometry analysis (Figure S1). HD and MM BM-MS (including ER, CR, and D BM-MS) displayed similar morphology with irregular shape and evidence of branching (data not shown). There were no significant differences in the percent expression of the MSC defining markers, between the HD and the MM BM-MS, whatever the disease stage (Figure S1).

2.2. Transcriptomic Profile

To assess differences in gene expression between MSC isolated from the patients at early relapse (ER BM-MS) or in complete remission (CR BM-MS), an unbiased transcriptomic analysis was performed from the samples analyzed at passage 1 in culture. A heat map was generated, showing the raw-scaled log fragments per kilobase of exon model per million reads mapped (FPKM) +1 expression values. This process readily grouped the samples by type (ER vs. CR BM-MS, Figure 1A). No gene was significantly differentially expressed between the two groups ($p < 0.05$). Whether the patient was in complete remission or at an early relapse stage had little impact on the MSC transcriptome.

Figure 1

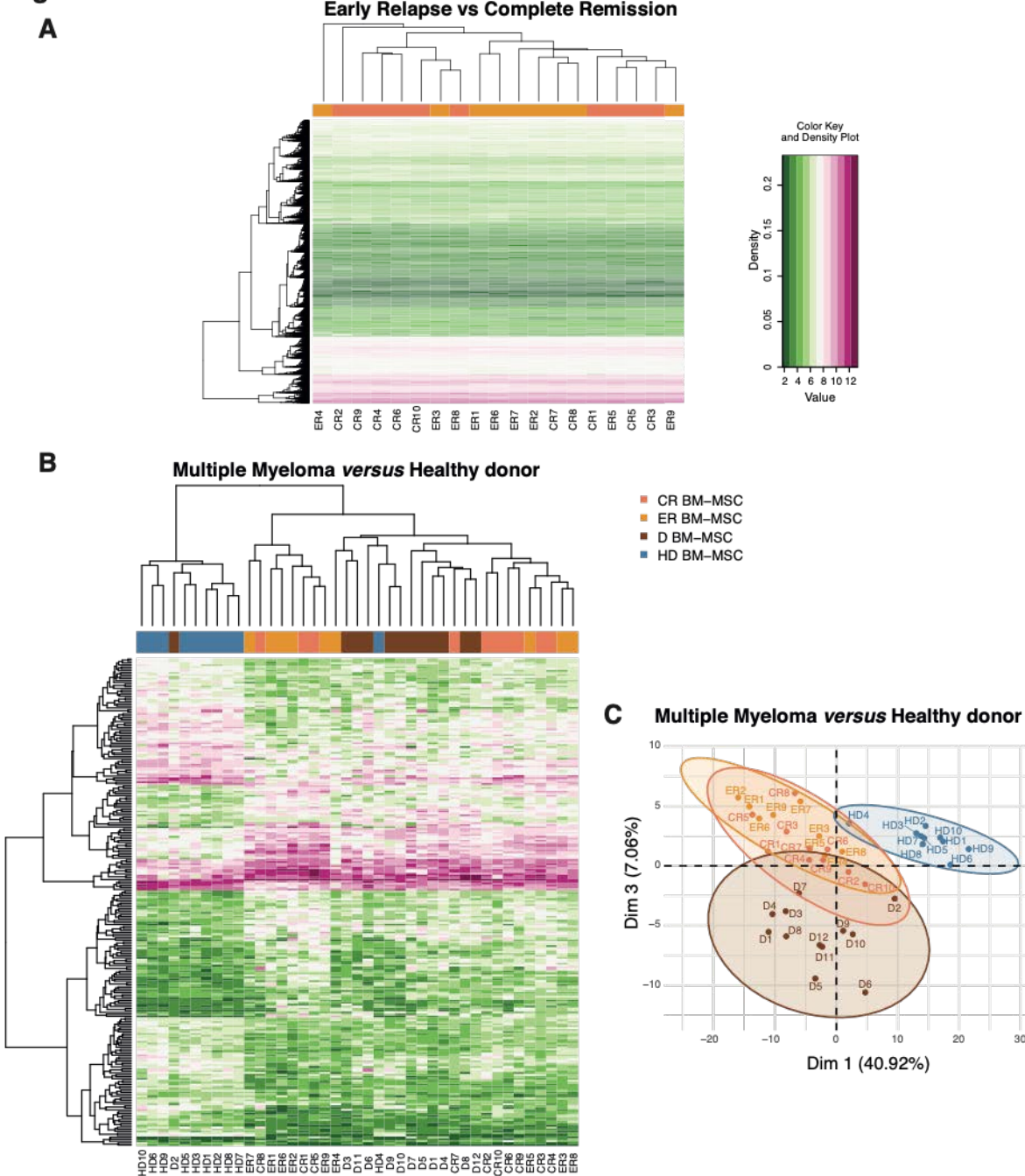


Figure 1. Transcriptional profile of ER and CR BM-MSC and clustering differences between HD and MM BM-MSC. **(A)** Unsupervised gene expression analysis of ER BM-MSC ($n = 9$) and CR BM-MSC ($n = 10$), representing a heatmap, with underexpression of green and overexpression of pink. No differences were observed between ER BM-MSC and CR BM-MSC, after the MM treatment. **(B)** Heatmap of 231 (108 upregulated in pink and 123 downregulated in green) differentially expressed genes in the MM BM-MSC (ER, CR and D BM-MSC) versus the HD BM-MSC. Expression data were filtered by the adjusted p -value < 0.05 and $2 < FC < 0.5$. **(C)** Two-dimensional principal component analysis (PCA) of all MSC subtypes with representation of dimensions 1 and 3. There are three clusters based on the differences in their transcriptomic profiles. Expression data were filtered by the adjusted p -value < 0.05 and $2 < FC < 0.5$.

Then, we compared the transcriptomic profile of MSC isolated from patients who had received their treatment (patients at ER or CR) to the transcriptomic profile of MSC from newly diagnosed patients or healthy donors. The objective was to determine whether MSC from the treated patients displayed a “normalized” transcriptome (i.e., similar or close to HD BM-MSc) or whether it was identical to the transcriptome of D BM-MSc. Figure 1B shows that two groups could be distinguished—HD BM-MSc and MM BM-MSc (including ER, CR and D BM-MSc), whatever the disease stage. D BM-MSc and MSC from the treated patients displayed a similar transcriptome and strongly differed from that of the HD BM-MSc. A total of 2747 genes were differentially expressed between HD BM-MSc and MM BM-MSc, at all stages, of which 440 had an adjusted p -value < 0.05 (lists of up- and downregulated genes can be provided upon request). Principal component analysis (PCA) confirmed the heatmap results 40.92% genes explained the differences between MM BM-MSc and HD BM-MSc and 7.06% explained the differences between D BM-MSc and the other three groups (Figure 1C). This suggests that the imprinting of the MSC transcriptome induced by MM cells persisted after intensive treatment, even for patients in complete remission.

We performed volcano plots in order to represent genes that are differentially expressed in the four groups (Figure 2A, Figure 3A and Figure S2A). Three groups could be distinguished based on the expression of 57% of the analyzed genes. The transcriptome of the treated patients’ MSC could be distinguished from that of D BM-MSc, since 1121 genes were differentially expressed between the two groups, with an adjusted p -value < 0.05 and $2 < \text{Fold Change (FC)} < 0.5$. The transcriptome of the treated patients’ MSC was slightly different from that of D BM-MSc and was very different from that of HD BM-MSc. Therefore, there was no reversion of the MM BM-MSc phenotype after intensive treatment, even when the patients were in complete remission. In addition, intensive treatment induced an additional variation in the transcriptome of MM BM-MSc.

Figure 2

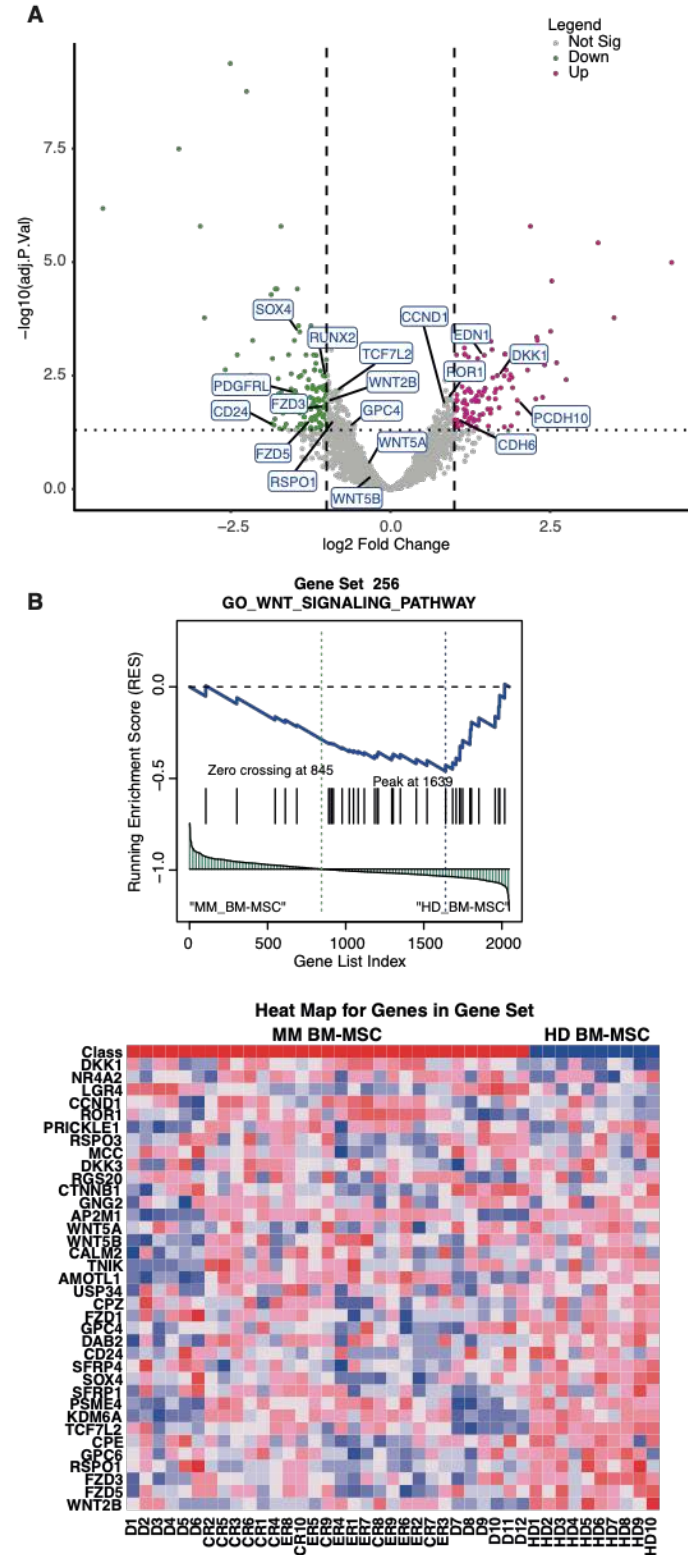


Figure 2. Wnt pathways involved in the difference between MM BM-MSC and HD BM-MSC. Volcano plot of differentially expressed genes in MM vs. HD BM-MSC with the impact of genes on osteogenesis and the Wnt pathway (A). Representative Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) of the MM vs. HD BM-MSC list of expressed genes with the pathway of Gene Set 256 (GO Wnt signaling pathway). Wnt signaling pathway was downregulated by MM vs. HD BM-MSC. The corresponding heatmap of the represented genes is also shown (B).

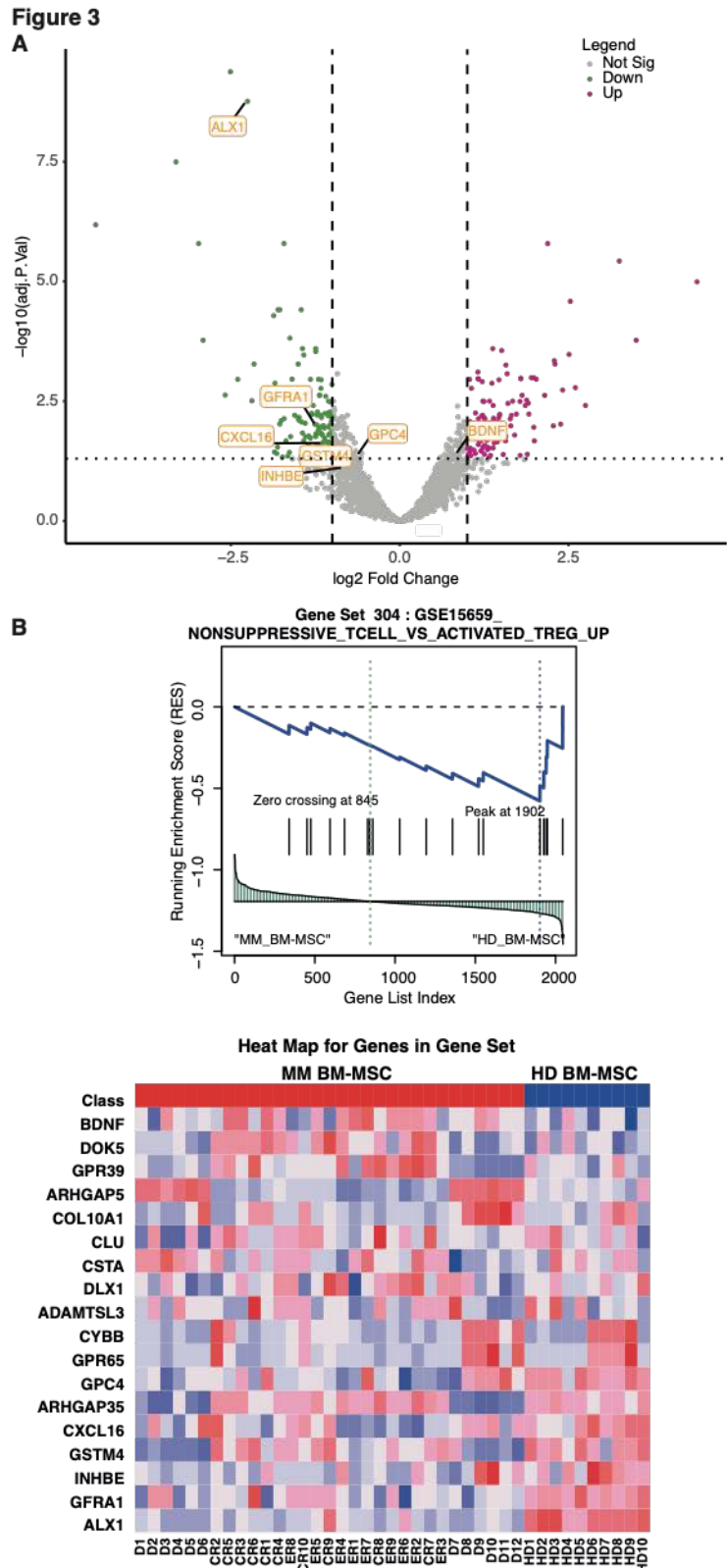


Figure 3. Immunity pathways involved in the difference between MM BM-MS and HD BM-MS. Volcano plot of the differentially expressed genes from MM vs. HD BM-MS, with the impact of genes from the immunity pathway. (A) Representative GSEA of MM vs. the HD BM-MS list of the expressed genes with the pathway of Gene Set 304 (GSE15659 non-suppressive T cell vs. activated T reg). Immunity pathway is downregulated by MM vs. HD BM-MS. The corresponding heatmap of the represented genes is also shown (B).

2.3. Signaling Pathways Activated in Patients with a History of Multiple Myeloma

Since MSC are known to be involved in the pathogenesis of MM [10,11] and because even patients achieving CR have a high probability of relapse, we focused on the common genes that were differentially expressed between the HD and MM patients, whatever the disease stage. One hundred seventy-four genes were differentially expressed between the HD BM-MSK and MM BM-MSK, and were common between the D BM-MSK, ER BM-MSK, and CR BM-MSK. Differentially expressed genes between HD BM-MSK and MM BM-MSK were analyzed with the Gene Set Enrichment Analysis (GSEA). This predicted dysregulation of four canonical pathways in the MM BM-MSK as compared to the HD BM-MSK. These included (1) the osteoblastogenesis pathway—reduced expression of *RUNX2*, *PDGFRL*, *WNT2B*, and overexpression of *DDK1* (Figure 2A); (2) the Wnt pathway—reduced expression of *WNT2B*, *WNT5A*, *WNT5B*, *SOX4*, *CD24*, *FZD3*, *RSPQ1*, *TCF7L2*, and *GPC4* and overexpression of *DKK1*, *ROR1*, *PCDH10*, *EDN1*, *CDH6*, and *CCND1* (Figure 2A,B); (3) the extracellular matrix organization (integrins)-encoded genes with a reduced expression of *ITGA11* and *COL12A1* and overexpression of *ITGA2* and *NTN4*; and (4) the coagulation pathway with an increased expression of *DPP4*, *IRGA2*, *CFH*, *F2RL*, *PLAT*, *SERPINB2*, and *TFPI* (Figure S2A,B). We also evidenced dysregulation of several genes involved in the non-suppressive_T cell_versus_activated_T reg signaling pathway (Figure 3A), with a reduced expression of *ALX1*, *GFRA1*, *CXCL16*, *GPC4*, *GSTM4*, and *INHBE* and overexpression of *BDNF* and *DOK5* in the MM BM-MSK compared with HD BM-MSK (Figure 3A,B).

2.4. Functional Characterization of MM-MSK

MSK are known to promote the survival and even the growth of malignant plasma cells. We, therefore, compared the pro-survival activity of patient-derived MSK at different disease stages (D, ER, and CR BM-MSK) by performing co-culture experiments. No difference in pro-survival activity was observed between MSK groups.

Here, we have shown that the onset of the pathology induces a change in the MSK transcriptome that persists even after the curative treatment. However, MSK after treatment had a slightly different transcriptome than D BM-MSK. We aimed to determine whether this slight difference was towards normalization of the MSK phenotype or whether the treatment turned MSK into an even more pro-tumoral phenotype.

Since the osteoblast differentiation pathway and the Wnt pathway seemed to alternate (Figure 2A,B) and because many authors have reported the impaired osteoblastic potential of D BM-MSK [21–24], we compared the potential for adipocyte and osteoblast differentiation of MSK in the groups of patients, using RT-PCR analysis of specific gene expression, as described in the Materials and Methods section. Prior to this analysis, we used colorimetric tests to verify that post-treatment BM-MSK (ER and CR BM-MSK) were able to differentiate into adipocytes and osteoblasts [21]. Both post-treatment and HD BM-MSK differentiated into adipocytes (Figure 4A) and osteoblasts (Figure 4B,C), after 21 days of culture with the differentiation media. Post-treatment BM-MSK exhibited a significant increase in lipid accumulation between D0 and D21 of adipocyte differentiation (Figure 4A) and seemed to differentiate more likely into adipocytes than HD BM-MSK. On the other hand, the capacity for osteoblastic differentiation was impaired in post-treatment BM-MSK, including MSK from patients in complete remission (Figure 4B). Hence, post-treatment BM-MSK differentiated preferentially into adipocytes rather than osteoblasts, whatever the disease stage, thus, confirming the transcriptomic profile. To confirm this observation, we analyzed the expression of several genes involved in the multipotency of the MSK. Post-treatment BM-MSK overexpressed the genes implicated in adipocyte differentiation (*PPAR γ* and adiponectin) (Figure 4D), while the expression of osterix, alkaline phosphatase, and Runx2 (involved in osteoblast differentiation) were down-regulated (Figure 4E). Of note, the increase in the expression of genes involved in adipogenesis was three-fold higher in post-treatment BM-MSK than in HD BM-MSK.

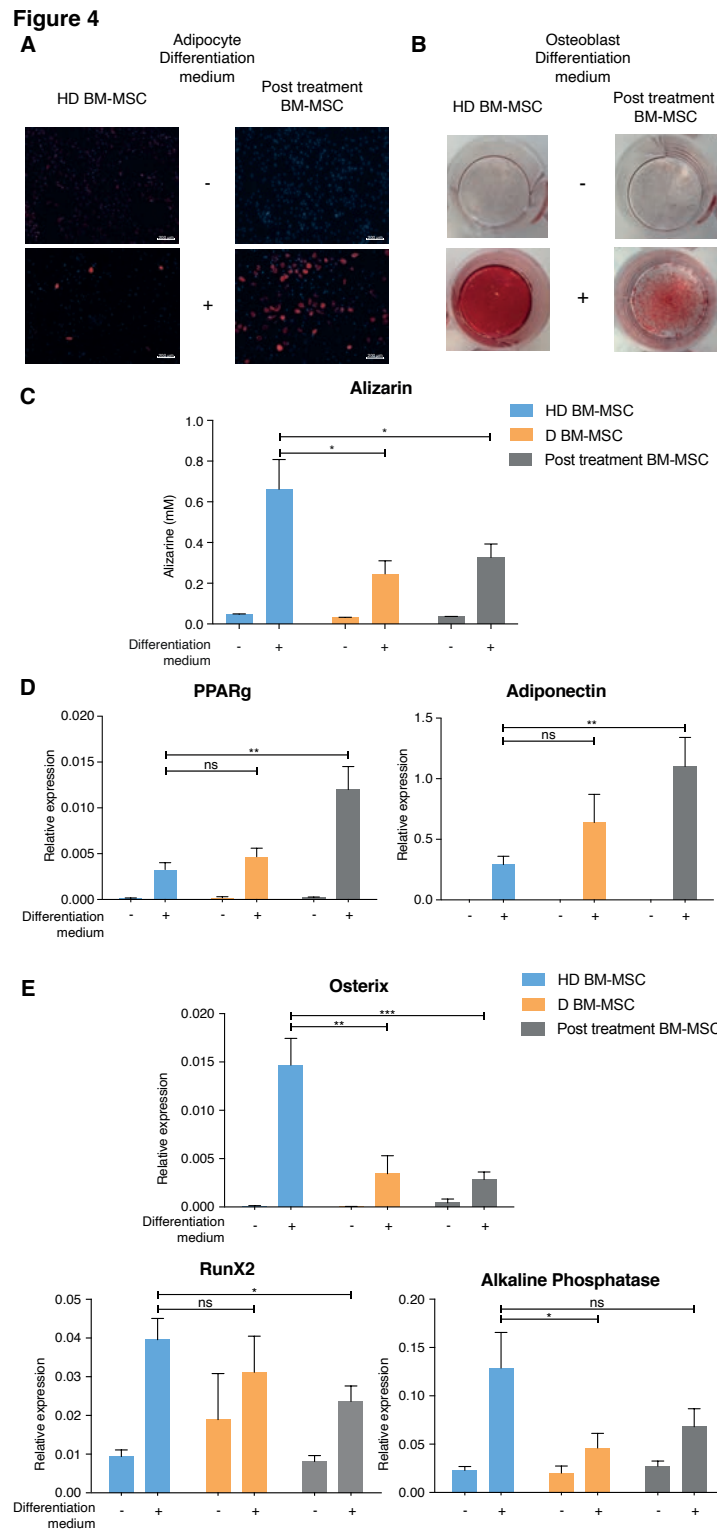


Figure 4. Colorimetric tests in adipocyte or osteoblast differentiation medium (A–C) or for 14 days before RT-qPCR analysis. (D,E) Colorimetric test was performed with Nile red for adipocyte (A) (magnification X5) and alizarin red for osteoblast (B,C). Alizarin Red Staining quantification using the assay. Data are expressed as the mean \pm SEM (HD BM-MSC $n = 10$; D BM-MSC $n = 9$, post treatment BM-MSC $n = 17$) with the error bars representing the standard deviations (C). RT-PCR of PPARgamma (PPAR γ) and adiponectin were up regulated after adipocyte differentiation of post-treatment BM-MSC, compared to HD BM-MSC (D); and Osterix, Runx2, and Alkaline phosphatase were down regulated after osteoblast differentiation of post-treatment BM-MSC compared to HD BM-MSC (E). Data are mean \pm SEM of the relative expression from seven independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

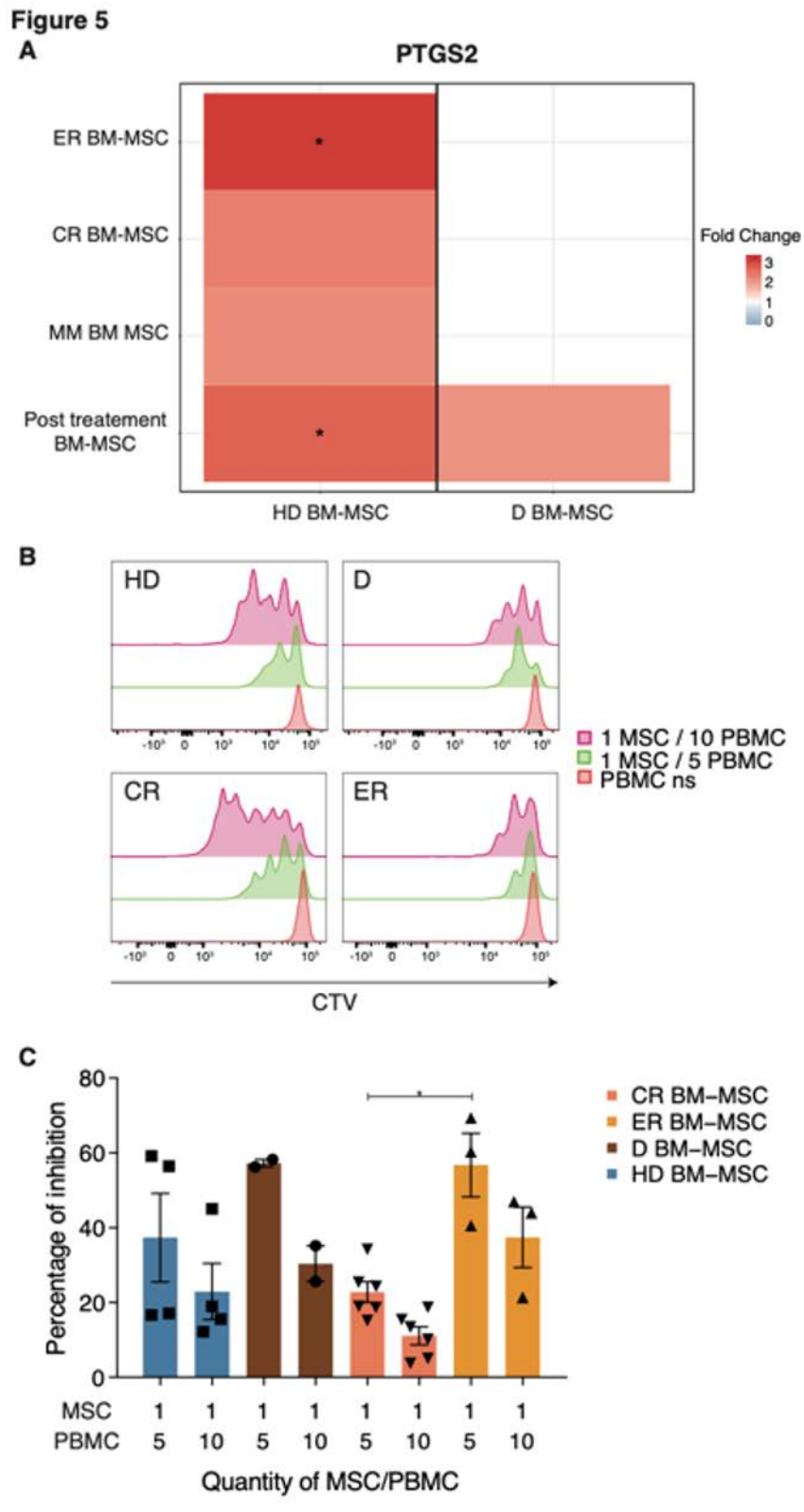


Figure 5. Modulation of immunity. Heatmap representation of *PTGS2* FC, between HD, D, ER, CR

BM-MSC, or a combination of all MM (D, ER, and CR) BM-MSC, from red for upregulation to blue for downregulation. Groups on the left were compared to the bottom ones (A). Inhibitory effect of MSC from HD and MM BM-MSC on PBMC proliferation. Effect of MSC on cytotoxic CD8 T-cell proliferation. HD BM-MSC ($n = 4$), D BM-MSC ($n = 2$), CR BM-MSC ($n = 6$), and ER BM-MSC ($n = 3$) were cultured in the presence of increasing number of cell trace violet (CTV)-labeled PBMC for 5 days at the concentration of 1/5 or 1/10 MSC/PBMC, respectively. Then, all cells were harvested and analyzed by flow cytometry. Representative figure of different CD8 T-cell proliferation is shown with CTV. Non-stimulated PBMC in red represent the control of non-proliferation and was CTV-positive. 1MSC/5PBMC (green) and 1MSC/10PBMC (pink) show the CD8 proliferation inversely correlated with MSC quantity (B). Percentage of inhibition was calculated as follows: $100 - (\text{percentage of CD8 T-cell proliferation with MSC} / \text{percentage of CD8 T-cell proliferation without MSC}) \times 100$. Significant difference was observed between ER and CR BM-MSC. HD BM-MSC are representing in blue (■) D BM-MSC in brown (●), CR BM-MSC in salmon (▼) and ER BM-MSC in orange (▲). Data are expressed as mean \pm SEM of the inhibition percentage of CD8 T lymphocytes. Each experiment was performed in triplicates from three independent experiments; (C). * $p < 0.05$.

3. Discussion

The issue of whether MSC are involved in the development of MM is now resolved. Several studies have reported the pro-tumoral role of MSC, whether through the growth factors or the exosomes they secrete, or by direct contact [6–8], but also through the recruitment of the immune system cells [25]. It is also known that D BM-MSC display an abnormal phenotype, when compared to HD BM-MSC [11,26]. However, whether the change in MSC phenotype involved the development of MM or whether it was solely a consequence of the disease remains to be determined. For this reason, several groups, including ours, have investigated the monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), bearing patients' MSC. Indeed, all MM patients previously presented an MGUS, while 10 percent of people over 65-years old displayed an MGUS. We showed in a small cohort that some MGUS subjects displayed an MM BM-MSC phenotype and others displayed an HD BM-MSC phenotype [11]. Unfortunately, we were unable to conclude whether the abnormal phenotype was predictive of malignant progression.

Another important unsolved question was whether MSC played a role in the relapse process of MM. To address this issue, we compared CR BM-MSC to ER BM-MSC. We showed that the transcriptome of MSC from patients who had completed their treatment presented only very small differences from that of patients in apparent complete response and those relapsing. Two of the patients in the CR BM-MSC group relapsed a few months after the analysis, but no specificity in their transcriptome was detected. This suggests that the MSC phenotype cannot predict whether a patient will relapse.

MSC from patients who had completed treatment had a transcriptome that was essentially identical to that of D BM-MSC. Once modification of the MSC was achieved, the change was permanent, even when the patient was in remission after achieving a CR. This suggests persistent printing, whatever the disease stage. However, as significant progress was recently made for response evaluation in MM with the development of high-sensitivity minimal residual disease [27], it would be of interest to compare MSC from patients in CR with Minimal residual disease (MRD) $< 10^{-6}$ and MSC from patients in CR with positive MRD. We wish we could have used a paired samples cohort (diagnosis-remission-relapse) from the same patients for this study, but this purpose was not realistic, given the current median progression free survival of the MM patients. We only studied one patient with two time points (diagnosis and remission); as shown in Figure S3, transcriptomes were almost identical, with no significant differences, according to the heatmap.

By analyzing genes that were differently expressed between the MSC of patients with a history of MM and those of HD, we highlight the activation of five signaling pathways in the MM microenvironment. These pathways were already mentioned by several authors as being involved in cancer [26,28–31]. We were first interested in those already involved in MM pathogenesis, namely the osteoblastogenesis and Wnt signaling pathways [28]. Modulation of the Wnt/ β catenin signaling pathway in MSC was shown to induce a decrease in the expression of *RUNX2*, leading to

osteoblastogenesis inhibition [24]. Liu et al. notably showed the involvement of adipocyte-secreted adipokines in MM progression and chemoresistance acquisition, via the upregulation of the expression of autophagic proteins in MM cells, leading to a suppression of the caspase cleavage and apoptosis in MM cells [9]. This was also observed in acute myeloid leukemia [32] and in solid tumors, such as prostate cancer [33]. We now showed that post-treatment BM-MSC did indeed differentiate more easily into adipocytes than into osteoblasts. We notably observed that expression of leptin was down-regulated in post-treatment BM-MSC, which was also in favor of the defect in osteogenesis [34]. The ability to better differentiate into adipocytes appeared as soon as MM was diagnosed. It persisted after treatment with variation in gene expression (Figure 4). The expression of adiponectin and PPAR γ was significantly increased in MSC from the treated patients. This variation could be related to the effect of treatment [35]. Indeed, a change in the MSC phenotype, after chemotherapy, related to the entry of MSC into senescence was already reported [36].

On the one hand, the fact that MSCs differentiate more easily into adipocytes is in favor of a greater pro-tumoral effect [33]. Indeed, several studies have demonstrated the involvement of adipocytes in the progression of cancer, including MM [35–37]. The fact that MSC from patients are better differentiated into adipocytes is certainly in keeping with the pro-tumoral effect of MSC, although it is still too early to establish the link between this ability and relapse. The impairment of the osteoblastic defect that persists after treatment, even in patients in CR, could explain why osteoblastic lesions never heal [38].

It was also shown that the immunomodulatory effect of MSC might play a role in their pro-tumoral effect, by decreasing the anti-tumoral immune response mediated by CD8+ T-lymphocytes [39,40]. Kanamura et al. showed that MM is characterized by a defect in the recruitment and activation of CD8+ T-lymphocytes [41]. We therefore analyzed the immunosuppressive ability of MSC in the four groups and assessed the expression of genes involved in the LT activation. We found a difference in expression between HD and MM BM-MSC, with a significant MM overexpression of *BDNF* and underexpression of *ALX1*, *GFRA1*, *CXCL16*, *GSTM4*, *INHBE*, and *GPC4* (Figure 3B). Interestingly, the expression of *CXCL16* was different between early relapsed patients and those in CR BM-MSC. Concerning the immune checkpoint involved genes, we did not observe any significant difference between the different groups of samples. However, we did find a tendency of a higher expression of CD274 (PD-L1) in the MSC samples from CR BM-MSC, as compared to D and ER BM-MSC. These patients had a higher expression of CD86, CD48, and *HLADPB1*. The expression of CD40, *HLADRB1*, and PDL-2 (*PDCD1LG2*) showed no variation across the samples (Figure S4). Together with this transcriptome's modification, we found a functional difference between the CR and ER BM-MSC, according to their immunosuppressive ability. CR BM-MSC behaved like HD BM-MSC, whereas ER BM-MSC behaved like D BM-MSC, i.e., with an increased immunosuppressive ability. However, we are unable at present to establish whether this functional transformation of MSC was a cause or a consequence of the growth of MM plasma cells. Overall, the presence of MM plasma cells in the BM induced changes, maybe epigenetic reprogramming, which switched the MSC towards a persistent pro-tumoral phenotype. These data suggest that MSC could play a role in the MM relapse, possibly by promoting the growth of the minimal residual cells.

4. Materials and Methods

4.1. Human Samples

4.1.1. MSC Samples

Fresh BM aspirates from 31 patients with MM were collected at diagnosis (D BM-MSC), post-treatment, in complete response (CR BM-MSC) or at early relapse (ER BM-MSC), at the Institut Universitaire du Cancer de Toulouse-Oncopole through the Intergroupe Francophone du Myélome network. All patients gave written informed consent and collection was approved by the French Committee for the Protection of Persons (CPP; DC-2012-1654) on April 2012, as well as by the local

IUCT-Oncopole review boards. Primary BM MM cells were purified by using magnetic anti-human CD138 microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). MM BM-MSCs were obtained from the CD138-negative fraction and prepared, as previously described [11]. For the HD BM-MSCs, the BM aspirations were harvested from healthy donors who gave their written informed consent, according to the recommendations of the Ethics Committee of the Toulouse University Hospital.

4.1.2. PBMC Samples

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) obtained from the *Établissement Français du Sang* (Toulouse, France) were isolated by Ficoll-Hypaque 5GE (Healthcare) density centrifugation.

4.2. Isolation of BM MSC

Freshly collected MSC were selected by their plastic adherence and were maintained in standard culture conditions. After 21 days, MSC were analyzed through flow cytometry for surface antigen expression—monocyte markers (CD11b and CD14), plasma cell markers (CD138 and CD38), and MSC markers (CD73+ CD90+ CD105+ and CD45-). There were no significant differences in the percent expression of the MSC-defining markers between the HD and the MM BM-MSCs, whatever the disease stage (Supplementary Figure S1). BM-MSCs were separated into two groups, one of 2.10^5 cells collected and frozen with 350 μ L RLT (RNeasy Minikit Qiagen, Hilden, Germany) + 10% β mercaptoethanol (Sigma-aldrich, Missouri, USA) for transcriptomic analysis, and another which was expanded at 1000 cell/cm² as P1 for functional analysis.

4.3. Transcriptomic Analysis

RNA from sorted MM and HD BM-MSCs was extracted using the RNeasy Minikit (Ref: 74106, Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions. Then, cDNA synthesis, *in vitro* transcription and fragmentation of cRNA were performed using the GeneChip 3'IVT PLUS Reagent kit, (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. After assessment of RNA integrity (Agilent Small RNA Analysis kits, Agilent 2100 Bioanalyser, Agilent, Santa Clara, CA, USA), biotinylated RNA was hybridized with the Affymetrix HG-U133 plus 2.0 GeneChip microarrays (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA), and analysis was performed as described previously. Raw Affymetrix cell intensity files (.CEL) were used for the differential expression analysis.

4.4. Statistical Analysis

4.4.1. PCA

Raw intensities were processed and normalized by functional robust multi-array average (RMA), using the *Affy* package from the R/Bioconductor. From the raw expression values, we performed a principal component analysis (PCA). The first dimension dissociated the samples left to right. HD BM-MSCs clustered on the right and MM BM-MSCs clustered on the left. The third dimension separated the diagnostics at the bottom and the ER and CR BM-MSCs at the top.

4.4.2. Heatmap

From these data, we retrieved the significant genes differentially expressed between the HD and the patients with a fold change between 2 and 0.5. We then plotted them as a heatmap to see the clustering between the four groups, using these differentially expressed genes, but also between the genes.

4.4.3. GSEA

We performed Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) to identify the enriched gene sets (FDR < 0.25, nominal *p*-value cutoff < 0.05). Enriched gene sets from (Gene Set 256: GO Wnt signaling pathway, Gene Set 28: Hallmark coagulation, and Gene Set 304: GSE15659 non-suppressive T-cell vs.

activated T-reg) were plotted as a heatmap and enrichment plot, using the GSEA1.0 Broad institute software for R. Gene set hallmarks used for this analysis can be found in the GSEA MSig database (<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/index.jsp>). Here, we used the H, Hallmark gene sets, C2, the curated gene sets, C5, the GO gene sets, C6, the oncogenic gene sets, and C7, the immunological gene set.

4.4.4. MSC Differentiation Assay

2.10^4 cells/well were cultured in 24- or 6-well culture plates, with complete Minimum Essential Medium α (MEM α) (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) or with StemMACS AdipoDiff Media or StemMACS OsteoDiff Media (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), for adipocyte and osteoblast differentiation, respectively. The medium was changed twice a week. All 24-well cultures were stopped after 21 days, for colorimetric testing. Alizarin red staining—the cells were fixed with 70% ethanol, stained with 2% Alizarin Red for 10 min, washed with H₂O, and analyzed. For quantification, the plates were thawed, destained by the addition of 800 μ L of 10% acetic acid chloride monohydrate. The optical density was then measured at OD405 and the relative ratio of the cells cultured in the osteogenic conditions were determined, relative to the cells cultured in the stromal medium. [21]. For adipocyte differentiation, the Nile red (Sigma-aldrich, Missouri, USA) stain was assessed according to the manufacturer's guidelines. Cultures in the 6-well plates were stopped after 14 days for the RT-PCR tests and the cells were harvested using trypsin with EDTA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

4.4.5. Quantitative RT-PCR

The cells were lysed using the RNeasy Minikit (Qiagen, Hilden, Germany), followed by direct reverse transcription, using the SuperScriptTM VILOTM Master Mix (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Quantitative PCR (qPCR) was performed using the LightCycler[®] 480 Probes Master on a LightCycler[®] (Roche, Bâle, Swiss), using the Taqman probes (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) (Table S1). The expression of individual genes was normalized to GAPDH, through the $\Delta\Delta C_t$ method.

4.4.6. Co-Culture of MSC and T-Lymphocytes

PBMC from HD were stained with the Cell Trace Violet (CTV) (ThermoFisher, Waltham, MA, USA), prior to stimulation, followed by CTV dilution assessment, 5 days later. At day 0, they were mixed with MSC in a 50/50 MEM α and Rosewell's Park Memorial Institute-1640 (RPMI) (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% FBS and 0.5% of ciprofloxacin complete medium. PBMC were seeded in triplicates at the concentration of 1.10^5 cells/100 μ L RPMI/well, with various MSC concentrations (20 10^3 , 10 10^3 , 5 10^3 , or 0 MSC/100 μ L MEM α /well), and were stimulated with or without anti-CD2/CD3/CD28 microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). After 5 days in co-culture, all cells were harvested and the CD8 T-cells were analyzed by flow cytometry. CD8 T-cells were selected with a combination of different markers (viable cell, CD90-, CD73-, CD45+, CD3+, CD4-, CD8+) and CTV-negative was quantified to express cell proliferation. The percentage of inhibition was calculated as follows: $100 - (\text{percentage of CD8 T-cell proliferation with MSC} / \text{percentage of CD8 T-cell proliferation without MSC}) \times 100$.

5. Conclusions

The presence of MM plasma cells was already known to lead to a change in the phenotype of MSC. Here, we show for the first time that this change is perennial, since it lasts throughout the course of the disease, including complete remission and early relapse. Further analyses are required to identify new therapeutic targets from these pro-tumoral MSC.

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/21/11/3854/s1>.

Author Contributions: Methodology, Formal Analysis, Investigation, and Data Curation: L.L. performed the collection and assembly of data, data analysis, and interpretation. L.D.S.F. and M.-V.J. were involved in the collection and assembly of data. Project Administration: H.A.-L. and L.M.—provision of study material or patients. Conceptualization, Writing—Original Draft Preparation, Review and Editing: J.C. and B.C.—they performed the conception and design, data analysis and interpretation, manuscript writing, and the funding acquisition. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded in part by a grant (HAL-2018) from “Intergroupe francophone du myeloma”. L.L. was funded in part by a grant from the Groupe de recherche de l’Institut Claudius Regaud (GRICR).

Acknowledgments: We acknowledge Ray Cooke for copyediting the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no potential conflict of interest.

References

- Palumbo, A.; Anderson, K. Multiple Myeloma. *N. Engl. J. Med.* **2011**, *364*, 1046–1060. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Raab, M.S.; Podar, K.; Breitkreutz, I.; Richardson, P.G.; Anderson, K.C. Multiple myeloma. *Lancet* **2009**, *374*, 324–339. [[CrossRef](#)]
- Corre, J.; Cleyne, A.; Robiou du Pont, S.; Buisson, L.; Bolli, N.; Attal, M.; Munshi, N.; Avet-Loiseau, H. Multiple myeloma clonal evolution in homogeneously treated patients. *Leukemia* **2018**, *32*, 2636–2647. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Roodman, G.D. Novel targets for myeloma bone disease. *Expert Opin. Ther. Targets* **2008**, *12*, 1377–1387. [[CrossRef](#)]
- Di Marzo, L.; Desantis, V.; Solimando, A.G.; Ruggieri, S.; Annese, T.; Nico, B.; Fumarulo, R.; Vacca, A.; Frassanito, M.A. Microenvironment drug resistance in multiple myeloma: Emerging new players. *Oncotarget* **2016**, *7*, 60698–60711. [[CrossRef](#)]
- Xu, S.; De Veirman, K.; De Becker, A.; Vanderkerken, K.; Van Riet, I. Mesenchymal stem cells in multiple myeloma: A therapeutical tool or target? *Leukemia* **2018**, *32*, 1500–1514. [[CrossRef](#)]
- Provan, D.; O’Shaughnessy, D.F. Recent advances in haematology. *BMJ* **1999**, *318*, 991–994. [[CrossRef](#)]
- Epstein, J.; Yaccoby, S. Consequences of interactions between the bone marrow stroma and myeloma. *Hematol. J.* **2003**, *4*, 310–314. [[CrossRef](#)]
- Liu, Z.; Xu, J.; He, J.; Liu, H.; Lin, P.; Wan, X.; Navone, N.M.; Tong, Q.; Kwak, L.W.; Orlowski, R.Z.; et al. Mature adipocytes in bone marrow protect myeloma cells against chemotherapy through autophagy activation. *Oncotarget* **2015**, *6*, 34329–34341. [[CrossRef](#)]
- Yang, H.; Zheng, Y.; Zhang, Y.; Cao, Z.; Jiang, Y. Mesenchymal stem cells derived from multiple myeloma patients protect against chemotherapy through autophagy-dependent activation of NF- κ B signaling. *Leuk. Res.* **2017**, *60*, 82–88. [[CrossRef](#)]
- Corre, J.; Mahtouk, K.; Attal, M.; Gadelorge, M.; Huynh, A.; Fleury-Cappellesso, S.; Danho, C.; Laharrague, P.; Klein, B.; Rème, T.; et al. Bone marrow mesenchymal stem cells are abnormal in multiple myeloma. *Leukemia* **2007**, *21*, 1079–1088. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wang, H.; Leng, Y.; Gong, Y. Bone Marrow Fat and Hematopoiesis. *Front. Endocrinol.* **2018**, *9*, 694. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Brown, R.; Kabani, K.; Favaloro, J.; Yang, S.; Ho, P.J.; Gibson, J.; Fromm, P.; Suen, H.; Woodland, N.; Nassif, N.; et al. CD86+ or HLA-G+ can be transferred via trogocytosis from myeloma cells to T cells and are associated with poor prognosis. *Blood* **2012**, *120*, 2055–2063. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Beider, K.; Bitner, H.; Leiba, M.; Gutwein, O.; Koren-Michowitz, M.; Ostrovsky, O.; Abraham, M.; Wald, H.; Galun, E.; Peled, A.; et al. Multiple myeloma cells recruit tumor-supportive macrophages through the CXCR4/CXCL12 axis and promote their polarization toward the M2 phenotype. *Oncotarget* **2014**, *5*, 11283–11296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kim, J.; Denu, R.A.; Dollar, B.A.; Escalante, L.E.; Kuether, J.P.; Callander, N.S.; Asimakopoulos, F.; Hematti, P. Macrophages and mesenchymal stromal cells support survival and proliferation of multiple myeloma cells. *Br. J. Haematol.* **2012**, *158*, 336–346. [[CrossRef](#)]
- André, T.; Najjar, M.; Stamatopoulos, B.; Pieters, K.; Pradier, O.; Bron, D.; Meuleman, N.; Lagneaux, L. Immune impairments in multiple myeloma bone marrow mesenchymal stromal cells. *Cancer Immunol. Immunother.* **2015**, *64*, 213–224. [[CrossRef](#)]

17. Garayoa, M.; Garcia, J.L.; Santamaria, C.; Garcia-Gomez, A.; Blanco, J.F.; Pandiella, A.; Hernández, J.M.; Sanchez-Guijo, F.M.; del Cañizo, M.-C.; Gutiérrez, N.C.; et al. Mesenchymal stem cells from multiple myeloma patients display distinct genomic profile as compared with those from normal donors. *Leukemia* **2009**, *23*, 1515–1527. [[CrossRef](#)]
18. Rossi, J.-F.; Lu, Z.-Y.; Jourdan, M.; Klein, B. Interleukin-6 as a Therapeutic Target. *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21*, 1248–1257. [[CrossRef](#)]
19. Corre, J.; Labat, E.; Espagnol, N.; Hebraud, B.; Avet-Loiseau, H.; Roussel, M.; Huynh, A.; Gadelorge, M.; Cordelier, P.; Klein, B.; et al. Bioactivity and Prognostic Significance of Growth Differentiation Factor GDF15 Secreted by Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Multiple Myeloma. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 1395–1406. [[CrossRef](#)]
20. Mahtouk, K.; Hose, D.; Rème, T.; De Vos, J.; Jourdan, M.; Moreaux, J.; Fiol, G.; Raab, M.; Jourdan, E.; Grau, V.; et al. Expression of EGF-family receptors and amphiregulin in multiple myeloma. Amphiregulin is a growth factor for myeloma cells. *Oncogene* **2005**, *24*, 3512–3524. [[CrossRef](#)]
21. Pinzone, J.J.; Hall, B.M.; Thudi, N.K.; Vonau, M.; Qiang, Y.-W.; Rosol, T.J.; Shaughnessy, J.D. The role of Dickkopf-1 in bone development, homeostasis, and disease. *Blood* **2009**, *113*, 517–525. [[CrossRef](#)]
22. Christodoulides, C. The Wnt antagonist Dickkopf-1 and its receptors are coordinately regulated during early human adipogenesis. *J. Cell Sci.* **2006**, *119*, 2613–2620. [[CrossRef](#)]
23. Gaur, T.; Lengner, C.J.; Hovhannisyann, H.; Bhat, R.A.; Bodine, P.V.N.; Komm, B.S.; Javed, A.; van Wijnen, A.J.; Stein, J.L.; Stein, G.S.; et al. Canonical WNT Signaling Promotes Osteogenesis by Directly Stimulating *Runx2* Gene Expression. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 33132–33140. [[CrossRef](#)]
24. Lynch, K.; De Veirman, K.; Egan, H.; Leonard, N.; O'Malley, G.; Ritter, T.; Ryan, A.; O'Dwyer, M. Mesenchymal Stromal Cell Sialylation Modulates Antitumor Immune Responses In Multiple Myeloma. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* **2019**, *19*, e93–e94. [[CrossRef](#)]
25. Fernando, R.C.; Mazzotti, D.R.; Azevedo, H.; Sandes, A.F.; Rizzatti, E.G.; de Oliveira, M.B.; Alves, V.L.F.; Eugênio, A.I.P.; de Carvalho, F.; Dalboni, M.A.; et al. Transcriptome Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Multiple Myeloma Patients Reveals Downregulation of Genes Involved in Cell Cycle Progression, Immune Response, and Bone Metabolism. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1056. [[CrossRef](#)]
26. Paiva, B.; Gutiérrez, N.C.; Rosiñol, L.; Vidriales, M.-B.; Montalbán, M.-Á.; Martínez-López, J.; Mateos, M.-V.; Cibeira, M.-T.; Cordón, L.; Oriol, A.; et al. High-risk cytogenetics and persistent minimal residual disease by multiparameter flow cytometry predict unsustainable complete response after autologous stem cell transplantation in multiple myeloma. *Blood* **2012**, *119*, 687–691. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Spaan, I.; Raymakers, R.A.; van de Stolpe, A.; Peperzak, V. Wnt signaling in multiple myeloma: A central player in disease with therapeutic potential. *J. Hematol. Oncol. J. Hematol. Oncol.* **2018**, *11*, 67. [[CrossRef](#)]
28. Nitzsche, F.; Müller, C.; Lukomska, B.; Jolkkonen, J.; Deten, A.; Boltze, J. Concise Review: MSC Adhesion Cascade-Insights into Homing and Transendothelial Migration: MSC Adhesion Cascade. *STEM Cells* **2017**, *35*, 1446–1460. [[CrossRef](#)]
29. Jakubikova, J.; Cholujova, D.; Hideshima, T.; Gronesova, P.; Soltysova, A.; Harada, T.; Joo, J.; Kong, S.-Y.; Szalat, R.E.; Richardson, P.G.; et al. A novel 3D mesenchymal stem cell model of the multiple myeloma bone marrow niche: Biologic and clinical applications. *Oncotarget* **2016**, *7*, 77326–77341. [[CrossRef](#)]
30. Silachev, D.; Goryunov, K.; Shpilyuk, M.; Beznoschenko, O.; Morozova, N.; Kraevaya, E.; Popkov, V.; Pevzner, I.; Zorova, L.; Evtushenko, E.; et al. Effect of MSCs and MSC-Derived Extracellular Vesicles on Human Blood Coagulation. *Cells* **2019**, *8*, 258. [[CrossRef](#)]
31. Azadniv, M.; Myers, J.R.; McMurray, H.R.; Guo, N.; Rock, P.; Coppage, M.L.; Ashton, J.; Becker, M.W.; Calvi, L.M.; Liesveld, J.L. Bone marrow mesenchymal stromal cells from acute myelogenous leukemia patients demonstrate adipogenic differentiation propensity with implications for leukemia cell support. *Leukemia* **2020**, *34*, 391–403. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Laurent, V.; Guérard, A.; Mazerolles, C.; Le Gonidec, S.; Toulet, A.; Nieto, L.; Zaidi, F.; Majed, B.; Garandeau, D.; Socrier, Y.; et al. Periprostatic adipocytes act as a driving force for prostate cancer progression in obesity. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 10230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Hamrick, M.W.; Pennington, C.; Newton, D.; Xie, D.; Isales, C. Leptin deficiency produces contrasting phenotypes in bones of the limb and spine. *Bone* **2004**, *34*, 376–383. [[CrossRef](#)]
34. Morris, E.V.; Edwards, C.M. Bone marrow adiposity and multiple myeloma. *Bone* **2019**, *118*, 42–46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

35. Allegra, A.; Innao, V.; Gerace, D.; Allegra, A.G.; Vaddinelli, D.; Bianco, O.; Musolino, C. The adipose organ and multiple myeloma: Impact of adipokines on tumor growth and potential sites for therapeutic intervention. *Eur. J. Intern. Med.* **2018**, *53*, 12–20. [[CrossRef](#)]
36. Falank, C.; Fairfield, H.; Reagan, M.R. Signaling Interplay between Bone Marrow Adipose Tissue and Multiple Myeloma cells. *Front. Endocrinol.* **2016**, *7*, 67. [[CrossRef](#)]
37. Silbermann, R.; Roodman, G.D. Myeloma bone disease: Pathophysiology and management. *J. Bone Oncol.* **2013**, *2*, 59–69. [[CrossRef](#)]
38. Martinet, L.; Fleury-Cappellesso, S.; Gadelorge, M.; Dietrich, G.; Bourin, P.; Fournié, J.-J.; Poupot, R. A regulatory cross-talk between V γ 9V δ 2 T lymphocytes and mesenchymal stem cells: Immunomodulation. *Eur. J. Immunol.* **2009**, *39*, 752–762. [[CrossRef](#)]
39. Arnulf, B.; Lecourt, S.; Soulier, J.; Ternaux, B.; Lacassagne, M.-N.; Crinquette, A.; Dessoly, J.; Sciaini, A.-K.; Benbunan, M.; Chomienne, C.; et al. Phenotypic and functional characterization of bone marrow mesenchymal stem cells derived from patients with multiple myeloma. *Leukemia* **2007**, *21*, 158–163. [[CrossRef](#)]
40. Nakamura, K.; Kassem, S.; Cleyne, A.; Chrétien, M.-L.; Guillerey, C.; Putz, E.M.; Bald, T.; Förster, I.; Vuckovic, S.; Hill, G.R.; et al. Dysregulated IL-18 Is a Key Driver of Immunosuppression and a Possible Therapeutic Target in the Multiple Myeloma Microenvironment. *Cancer Cell* **2018**, *33*, 634–648.e5. [[CrossRef](#)]
41. Gregory, C.A.; Gunn, W.G.; Peister, A.; Prockop, D.J. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: Comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal. Biochem.* **2004**, *329*, 77–84. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Supplemental data

Material and methods

Flow cytometry antibody and staining

MSC and PBMC were stained with different combinations of monoclonal antibody anti-CD14-BUV395 (BD Biosciences), -CD138-BV421 (BD Biosciences), -CD11b-BV605 (BD Biosciences), -CD90-PerCpCy5.5 (BD Biosciences), -CD105-PE (eBioscience), -CD38-PECy7 (BD Biosciences), -CD73-APC (BD Biosciences), -CD45-AF700 (BD Biosciences), -viability-BV510 (BioLegend), -CD8-BUV395 (BD Biosciences), -CD3-BV711 (BD Biosciences), -CD4-FITC (BD Biosciences), -CD45-PE (BD Biosciences), fixable viability Dye eFluor 780 (ThermoFisher) and used at dilutions according to manufacturers' instructions. Then they were acquired with a Fortessa X20 flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo Software (TreeStar).

Table 1

Gene	Assay ID
GAPDH	Hs02786624_g1
SP7	Hs01866874_s1
RUNX2	Hs01047973_m1
ALPL	Hs01029144_m1
PTHR1	Hs00174895_m1
IBSP	Hs00173720_m1
PPARg	Hs00234592_m1
AdipoQ	Hs00605917_m1
LEP	Hs00174877_m1

Figure legends

Figure S1: Cytometry was performed with MM and HD BM-MSC culture and shows 99.9% cells negative for the hematopoietic lineage (CD45-), monocyte-negative (CD14-, CD11b-), B cell-negative (CD20), plasma cell-negative (CD138-) and positive for MSC markers CD73+,

CD90+, CD105+ (A). Histogram of the FMO control compared to HD (blue) and MM (orange) MSC-positive markers CD73, CD90 and CD105 (B).

Figure S2: Coagulation pathway involved in difference between MM BM-MSC and HD BM-MSC

Volcano plot of differentially expressed genes in MM vs. HD BM-MSC with impact of genes on coagulation pathway (A). Representative GSEA of MM vs. HD BM-MSC list of expressed genes with pathway Gene Set 28 (Hallmark coagulation). Coagulation is upregulated by MM vs. HD BM-MSC. The corresponding heatmap of represented genes is also shown (B).

Figure S3: Transcriptional profile of D BM-MSC and CR BM-MSC from the same patient

Unsupervised gene expression analysis of D BM-MSC (n=1) and CR BM-MSC (n=1) representing a heatmap with under expression in green and overexpression in pink. No significant differences were observed between D BM-MSC and CR BM-MSC after MM treatment.

Figure S4: Volcano plot of differentially expressed genes in MM vs. HD BM-MSC with impact of immune checkpoint genes

Representative genes of MM vs. HD BM-MSC list of ligand of immune checkpoint genes.

Figure S1

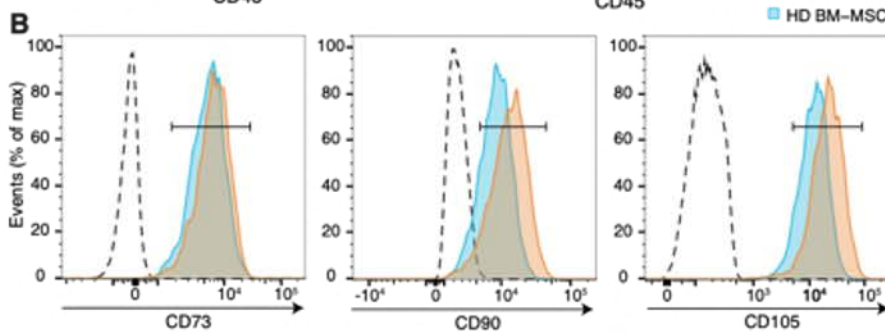
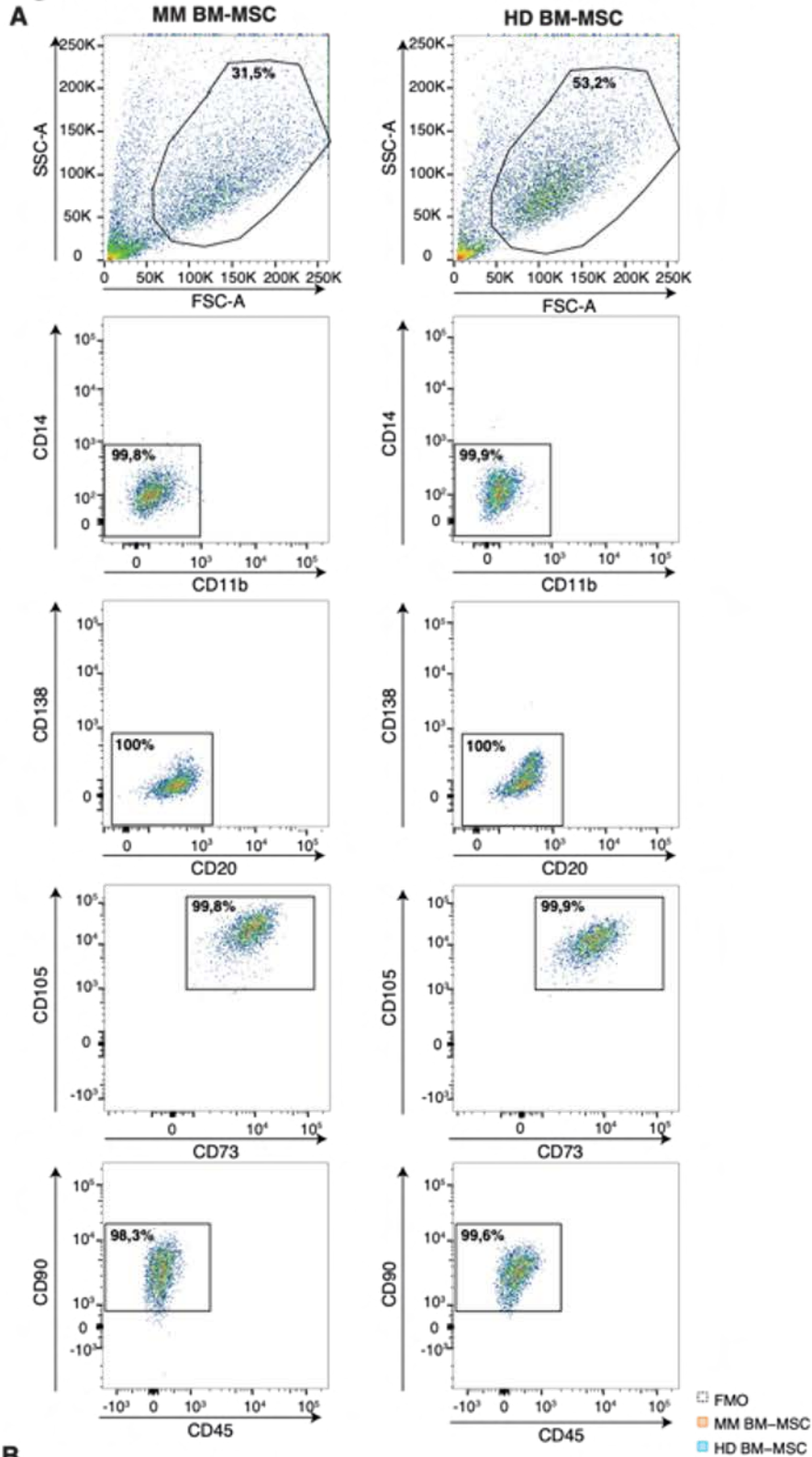


Figure S2

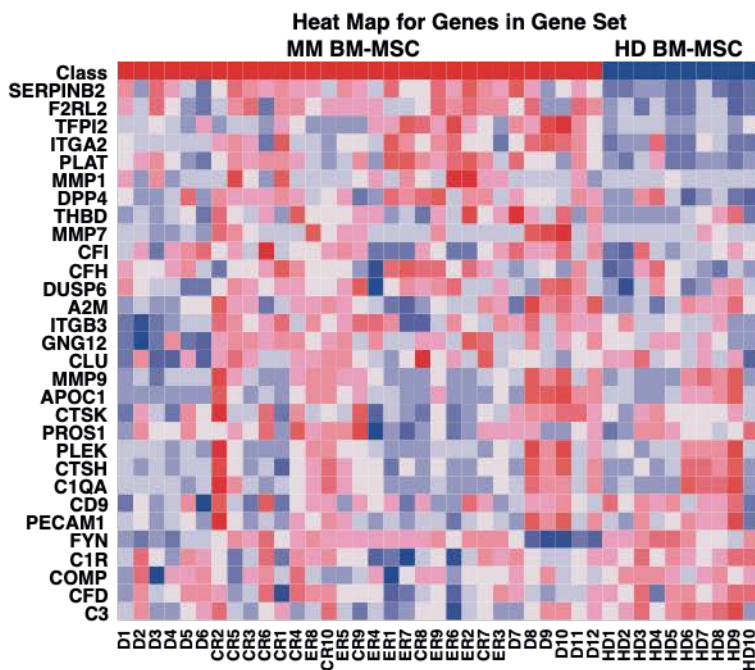
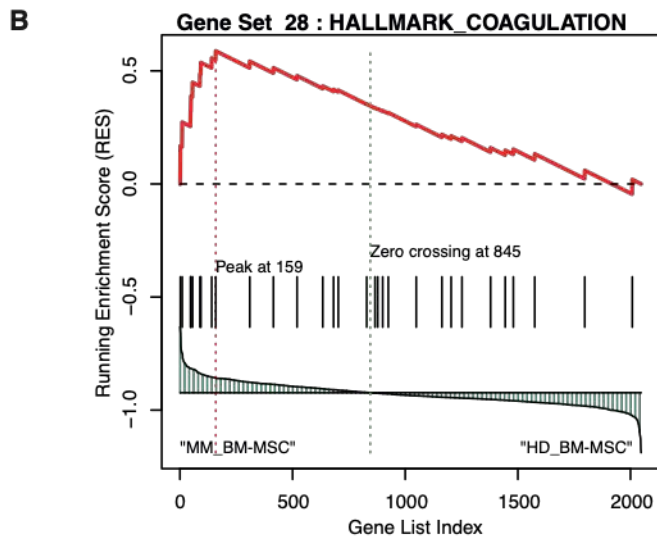
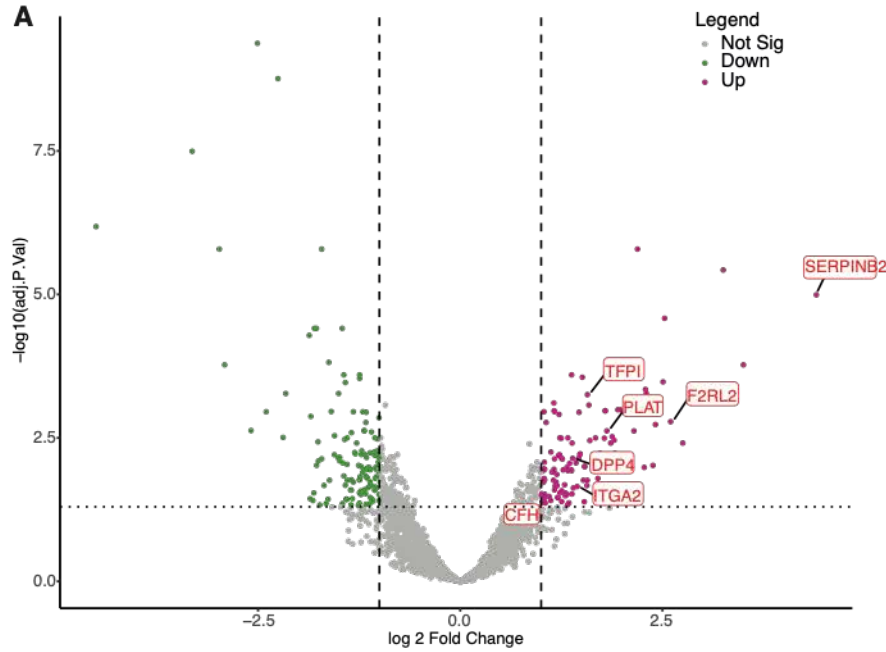


Figure S3

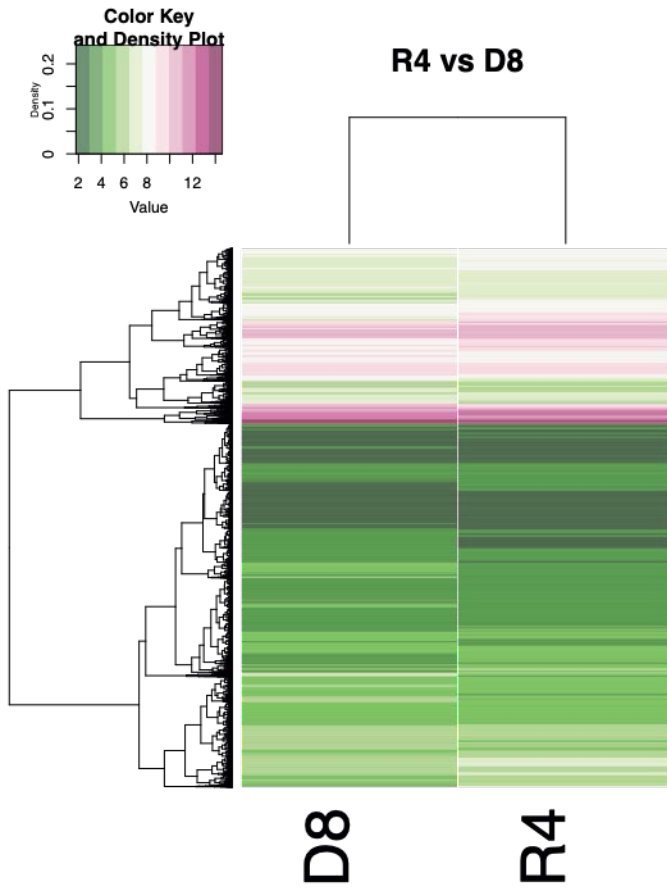
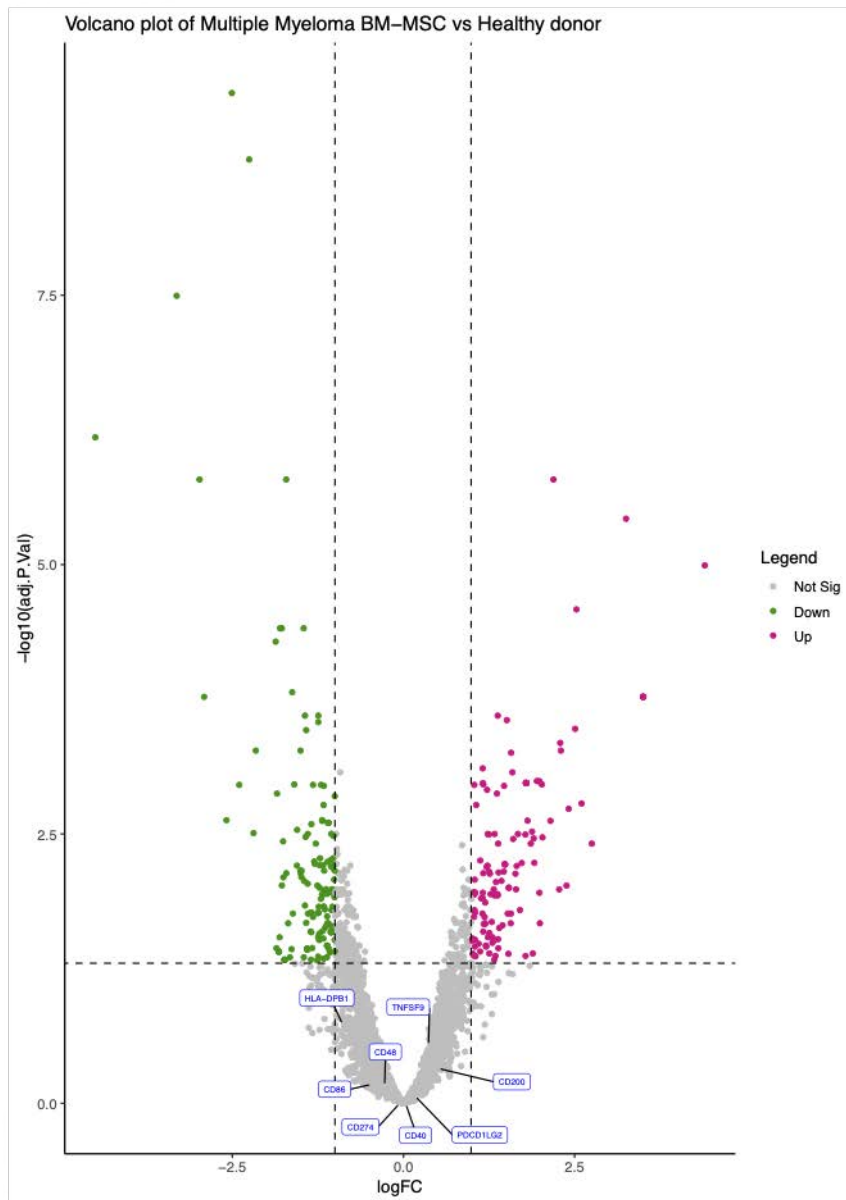


Figure S4



III. Deuxième partie : Article 2 – L’inhibition de TLR4 dans le microenvironnement médullaire altère la croissance des plasmocytes malins

Toll-Like Receptor-4 selective inhibition in medullar microenvironment alters multiple myeloma cell growth

Short title: TLR4 is a key target of MM microenvironment

Léa Lemaitre^{1*}, Malik Hamaidia^{2*}, Jean-Gérard Descamps^{3,4}, Camille Duchayne^{3,4}, Adrien Lupieri^{3,4}, Laura Do Souto Ferreira¹, Marie-Véronique Joubert¹, Mélanie Gadelorge^{3,4}, Hervé Avet-Loiseau¹, Luc Sensebe^{3,4}, Nicolas Reina^{5,6}, Frederic Deschaseaux^{3,4}, Ludovic Martinet¹, Philippe Bourin⁷, Jill Corre¹, Nicolas Espagnolle^{3,4}

¹*Unit for Genomics of Myeloma, Institut Universitaire du Cancer Oncopole, Toulouse, France. Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse INSERM U1037, Toulouse, France*

²*Molecular and Cellular Epigenetics (Groupe Interdisciplinaire de Génoprotéomique Appliquée [GIGA]), University of Liege (ULiège), 4000 Liège, Belgium*

³*STROMALab, Université de Toulouse, CNRS ERL5311, EFS, INP-ENVT, Inserm U1031, UPS, Toulouse, France*

⁴*EFS Occitanie, 31042 Toulouse, France*

⁵*Department of Orthopedic Surgery, Hôpital Pierre-Paul-Riquet, CHU de Toulouse, Place du Dr Baylac TSA 40 031 31059 Toulouse cedex 9*

⁶*AMIS Laboratory - Laboratoire Anthropologie Moléculaire et Imagerie de Synthèse, Université de Toulouse, UMR 5288 CNRS, UPS, 37 allée Jules Guesde 31000, Toulouse, France*

⁷*Cell-Easy, Centre Pierre Potier, 31106 Toulouse Cedex 1, France*

*Léa Lemaitre and Malik Hamaidia have contributed equally to this work.

Correspondence to:

Nicolas ESPAGNOLLE

STROMALab, EFS, UPS, ENVT, INSERM U1031, INCERE, 4 bis avenue Hubert Curien

31100 Toulouse, FRANCE

Tel.: +33 5 34 60 95 19

Fax: +33 5 34 60 95 05

E-mail: nicolas.espagnolle@efs.sante.fr

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

A. Résumé et conclusion

Une analyse transcriptomique réalisée précédemment dans l'équipe sur des HD et D BM-MSc a pu mettre en évidence la surexpression de TLR4 par les D BM-MSc, confirmée ensuite par l'analyse des niveaux protéiques de TLR4 sur les D BM-MSc. Nous avons voulu comprendre quel pouvait être le rôle de TLR4 exprimé par la MSc dans ce contexte notamment en termes de survie des PC malins. Pour cela, nous avons dans un premier temps stimulé le TLR4 des MSc avec différents ligands, LPS et Hsp70. Nous avons ensuite analysé l'impact de la stimulation de ce récepteur sur l'expression des molécules d'adhésion connue entre MSc et PC malins. La stimulation de TLR4 par le LPS induit dans les MM BM-MSc une expression 50 fois plus importante, d'un marqueur de surface, le CD54 (ICAM1). Ce dernier a déjà été décrit comme récepteur permettant l'adhésion des MSc aux PC malins pour promouvoir la croissance des PC malins. Nous avons ensuite évalué si les ligands de TLR4 pouvaient donc être sécrétés par les PC malins, pour cela nous avons analysé le sécrétome d'une lignée de MM (MOLP-6), qui sont en effet capables de sécréter de l'Hsp70, ligand de TLR4. En effet, la stimulation exogène par l'utilisation de Hsp70 sur les D BM-MSc induit bien une surexpression de CD54 à la surface seulement des D BM-MSc, de la même façon qu'avec le LPS. Enfin, nous avons voulu savoir par quel mécanisme cette surexpression est liée à la sécrétion de chimiokines par les D BM-MSc. L'utilisation des 2 ligands (LPS et Hsp70) induit une surexpression importante de la sécrétion d'IL6 par les D BM-MSc comparé aux HD BM-MSc, pouvant en effet promouvoir la croissance des PC malins. Pour confirmer ces résultats, un inhibiteur pharmacologique de TLR4 a été mis en place, le C34. Dans un premier temps *in vitro*, l'utilisation de cet inhibiteur sur des co-cultures de MSc et MOLP-6 montre une diminution significative de la prolifération des PC malins en co-culture avec les D BM-MSc seulement, il ne semble pas avoir d'effet en terme de prolifération des PC malins sur les HD BM-MSc. Cet effet est potentialisé lorsqu'il est combiné à une chimiothérapie classique de MM, aussi bien avec du lenalidomide qu'avec du melphalan.

Dans un deuxième temps, nous avons réalisé une analyse *in vivo* sur le modèle le plus relevant du MM, le Vk*MYC. Nous avons induit un MM murin *via* l'injection de PC malins murin (Vk12653) chez des souris immunocompétentes puis traités ces souris par C34, 3 fois par semaine, à partir de 10 jours post injection de tumeur. Les souris ont ensuite été sacrifiées et le sang et la moelle osseuse récupérés pour réaliser une analyse des populations présentes

dans le microenvironnement tumoral. On retrouve dans le sérum de ces souris un pic d'immunoglobuline caractéristique de la maladie, qui est retrouvé significativement moins important dans les souris traitées au C34. De plus, l'analyse des moelles de souris traitées au C34 montre un pourcentage de PC malins réduit par rapport à des souris contrôles. Le C34 semble donc ralentir le développement de la maladie dans ce modèle préclinique. De manière intéressante, le pourcentage de MSC dans la moelle des souris traitées et non traité est corrélé à la quantité de PC malins présents.

Pour finir, si on reprend les données des analyses transcriptomiques présentées dans la première publication, on s'aperçoit que les MM BM-MSc dans leur ensemble surexpriment TLR4 par rapport aux HD BM-MSc. Nous avons mis en évidence que les D et ER BM-MSc le sur-expriment par rapport aux HD BM-MSc alors que les CR BM-MSc sous-expriment TLR4 par rapport aux D BM-MSc. Ces données ont été confirmées par l'analyse de l'expression de TLR4 à la surface des MSC *in vitro* et montrent une surexpression de TLR4 dans les ER BM-MSc par rapport aux CR BM-MSc.

Ces données suggèrent donc un réel rôle de support de la croissance des PC malins par les MSC *via* TLR4 qui peut être inversé par l'utilisation d'un inhibiteur, le C34.

B. Article 2 : En cours de soumission dans blood (short report) en co-premier auteur

Toll-Like Receptor-4 selective inhibition in medullar microenvironment alters multiple myeloma cell growth

Short title: TLR4 is a key target of MM microenvironment

Léa Lemaitre^{1*}, Malik Hamaidia^{2*}, Jean-Gérard Descamps^{3,4}, Camille Duchayne^{3,4}, Adrien Lupieri^{3,4}, Laura Do Souto Ferreira¹, Marie-Véronique Joubert¹, Mélanie Gadelorge^{3,4}, Hervé Avet-Loiseau¹, Luc Sensebe^{3,4}, Nicolas Reina^{5,6}, Frederic Deschaseaux^{3,4}, Ludovic Martinet¹, Philippe Bourin⁷, Jill Corre¹, Nicolas Espagnol^{3,4}

¹*Unit for Genomics of Myeloma, Institut Universitaire du Cancer Oncopole, Toulouse, France. Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse INSERM U1037, Toulouse, France*

²*Molecular and Cellular Epigenetics (Groupe Interdisciplinaire de Génoprotéomique Appliquée [GIGA]), University of Liege (ULiège), 4000 Liège, Belgium*

³*STROMALab, Université de Toulouse, CNRS ERL5311, EFS, INP-ENVT, Inserm U1031, UPS, Toulouse, France*

⁴*EFS Occitanie, 31042 Toulouse, France*

⁵*Department of Orthopedic Surgery, Hôpital Pierre-Paul-Riquet, CHU de Toulouse, Place du Dr Baylac TSA 40 031 31059 Toulouse cedex 9*

⁶*AMIS Laboratory - Laboratoire Anthropologie Moléculaire et Imagerie de Synthèse, Université de Toulouse, UMR 5288 CNRS, UPS, 37 allées Jules Guesde 31000, Toulouse, France*

⁷*Cell-Easy, Centre Pierre Potier, 31106 Toulouse Cedex 1, France*

*Léa Lemaitre and Malik Hamaidia have contributed equally to this work.

Correspondence to:

Nicolas ESPAGNOLLE

STROMALab, EFS, UPS, ENVT, INSERM U1031, INCERE, 4 bis avenue Hubert Curien

31100 Toulouse, FRANCE

Tel.: +33 5 34 60 95 19

Fax: +33 5 34 60 95 05

E-mail: nicolas.espagnolle@efs.sante.fr

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Key points

- TLR4 overexpressed on MM MSCs plays a key role in crosstalk with MM cells and evolves in parallel with the different stages of disease.
- Targeting specifically pathological microenvironment with TLR4 weaken MM development in vivo and strengthen conventional anti MM therapy.

Abstract

Bone marrow (BM) mesenchymal stromal cells (MSCs) are abnormal in multiple myeloma (MM) and play a critical role by promoting growth, survival and drug resistance of MM cells. Previously, we observed higher Toll-like receptor 4 (TLR4) gene expression in MM MSCs than MSCs from healthy donors. At clinical level, we highlighted TLR4 expression in MSCs from MM patients evolves in parallel with the different stages of the disease. We reasoned that TLR4 axis is pivotal in MM by increasing pro-tumor activity of MSC. We showed that challenging primary MSCs with TLR4 agonists increased expression of CD54 and IL6, two factors directly implicated in MM MSC/MM cells cross-talk.

Then, we evaluated the therapeutic efficacy of TLR4 antagonist in combination or not with conventional treatment in vitro using MSCs/MM cells co-culture and in vivo using VK*MYC mouse model. We demonstrated that selective inhibition of TLR4 reduced specifically MM MSCs ability to support growth of MM cells and delayed the development of MM in VK*MYC mouse model by altering the early phase of disease in vivo. In summary, we demonstrate that targeting specifically pathological BM microenvironment via TLR4 signaling could be an innovative approach to improve efficacy of currently used anti MM treatments

Introduction

Despite a significant increase in patient survival with the introduction of novel therapies¹, the median overall survival from multiple myeloma (MM) diagnosis is 5.2 years^{2,3}. Bone marrow (BM) microenvironment is pivotal to the establishment and progression of MM⁴. Nevertheless, a better understanding of the mechanism by which it affects the disease is still required to define new therapeutic targets. Several studies demonstrated that BM-derived mesenchymal stromal cells (MSCs) directly contribute to the growth, survival and drug resistance of MM cells by expressing adhesion molecules, (CD54, CD49e)⁵ and various cytokines (IL-6, GDF15)^{6,7}. Among abnormalities reported in MSCs from MM patients (MM MSCs)⁸, TLR4 a pattern-recognition receptor⁹ was significantly upregulated in MM MSCs as compared with healthy donors (HD)⁸.

In this work, we demonstrated that TLR4 overexpressed by MM MSC whose expression evolves with stages of the disease, is a pivotal event of the deleterious crosstalk between MSCs and MM cells. We demonstrated that treatment with a TLR4 inhibitor alone, and to a greater extent when combined with currently anti MM drugs (Melphalan/Lenalidomide)¹⁰, reduced specifically MM MSCs ability to support growth of MM cells *in vitro*. In addition, we reported TLR4 impact *in vivo* on establishment of disease in VK*MYC model, confirming TLR4 as an attractive therapeutic target of pathological microenvironment in MM.

Study design

Cells

Fresh BM aspirates from patients with MM were collected at different stages in the Institut Universitaire du Cancer de Toulouse-OncoPole (France) through the intergroupe francophone du Myelome network. Human samples, cell lines and culture process are described in supplemental methods.

Mice

Mice were maintained in the specific-pathogen-free animal facility of the US006 CREFRE-Inserm/UPS which is accredited by the French Ministry of Agriculture (accreditation number A-31 55508). Animal experiments were conducted and approved by the Ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation (APAFIS#5614-2016060815487810 v4) and are in compliance with the French regulations on care and protection of laboratory animals. All mice used in this study were 6 weeks female with a C57BL/6 genetic background. Wild type (WT) mice were purchased from Janvier laboratories. Transplantable Vk*MYC MM cell line (Vk12653) were kindly provided by Bergsagel. L and expanded as previously described^{11,12}.

Patents

Patent of this work: **FR1663344**.

Data Sharing Statement

For original data, please contact nicolas.espagnolle@efs.sante.fr

Microarray data are available at GEO under accession number GSE146649.

Results and Discussion

TLR4 overexpressed in MSCs from MM patients plays a pivotal role in crosstalk with MM cells

Based on transcriptomic analysis, we observed that mRNA level of *TLR4* was consistently higher in MM MSCs than MSCs from HD and MGUS (monoclonal gammopathy of undetermined significance) patients (Figure 1A). This observation was confirmed at protein level (Figure 1B). Interestingly, we analyzed the transcriptomic profile of MSCs from HD and patients at different stages of MM, at diagnosis (D), in complete remission (CR) or at early relapse (ER) from first line intensive treatment. We observed *TLR4* expression in MSCs at CR stage tumbled compared to diagnosis whereas when they were obtained at relapse, *TLR4* was overexpressed compared to diagnosis (Figure 1C). In addition, after *ex vivo* culture, *TLR4* was increased in ER MSC compared to CR MSC, confirming that *TLR4* expression in MM MSCs evolves through disease course (Figure 1D).

To explore how the *TLR4* increase had a biological significance in MM, we challenged *TLR4* on MM and HD MSCs with exogenous and endogenous ligands. *TLR4* stimulation with LPS increased adhesion molecules CD49e and CD54 expression, known to be crucial for the MSCs–MM cell interaction, by both HD and MM MSCs^{13,14} (Figure 1E). After *TLR4* activation by LPS, IL-6 secretion which is a key factor for survival, growth and chemoresistance of MM cells¹⁵, increased in HD MSCs and to a greater extent in MM MSCs (Figure 1F). To further investigate the context of MM pathology, we evaluated Hsp70, an endogenous ligand for *TLR4* actively released in the MM microenvironment and secreted by the MM cell line¹⁶ (figure 1G). Hsp70 significantly upregulated CD54 expression and IL6 secretion only in MM MSCs (Figure 1H and 1I). In BM from MM patients, MSCs could be permanently primed by *TLR4* endogenous ligands such as Hsp70 released from injured cells in MM bone lesions or by MM cells themselves. In this same way, it has been shown that *TLR4* signaling drives MSC commitment to pro-tumoral microenvironment transformation in MM¹⁷.

Combined anti TLR4 and anti-MM drugs synergistically inhibit MM cell proliferation

Numerous studies used stroma-independent MM cell lines (MM1S, RPMI8226) to analyze the efficiency of chemotherapy drugs¹⁸. However, in BM, MM cells strongly adhere to MSCs stroma, which increases chemoresistance and survival signals¹³. To underline the role of the tumoral microenvironment in MM cells growth, we used the *TLR4* negative stroma-dependent myeloma cell line MOLP-6^{13,19}. The involvement of *TLR4* in ability of primary

MSCs stroma to support MOLP-6 proliferation was evaluated by using a potent selective inhibitor of TLR4 signaling C34 (1-Methylethyl 2-(acetylamino)-2-deoxy- α -D-glucopyranoside 3,4,6-triacetate)²⁰. We treated primary HD/MM MSC stroma with C34 before and during co-culture with MOLP-6 cells. C34 had no effect on the ability of HD stroma to support MOLP-6 growth but significantly reduced the ability of MM stroma to promote MOLP-6 growth compared with untreated stroma (Figure 2A). In parallel, TLR4 antagonist had no effect on co-culture of stroma-independent MM cells (MM1S) and MSCs (Figure 2B), which confirms the specific role of TLR4 in targeting MM stroma.

We studied the effect of selective inhibition of MSCs expressed TLR4 by C34 on MOLP-6 proliferation, in combination with conventional treatment Melphalan (Mel; chemotherapy drug) and Lenalidomide (Len; thalidomide analog). Combining C34 +/- Mel not induced a significant inhibition of MOLP-6 cell growth after co-culture with HD-derived MSCs. Inversely, a robust and significant inhibition was noted in presence of MM-derived MSCs stroma and to a greater extent with combination C34+Mel (Figure 2C). Len alone treatment inhibited MOLP-6 cell proliferation in both HD and MM MSCs co-cultures. However, Len in association with C34 dramatically altered MOLP-6 cell growth only when co-cultured with MSCs from MM patient (Figure 2D). Herein, we show that controlling stroma responsiveness reinforces the global effect of the therapy. Attacking the disease on both fronts seems a good way to avoid the impact of the pathological microenvironment on disease progression.

C34 weaken MM development in vivo

To explore the role of TLR4 in disease progression, we evaluated TLR4 inhibition in VK*MYC a well-characterized preclinical MM mouse model, presenting hallmarks of human pathology^{11,12}. As described in figure 2E, Vk12653 cell lines were injected in C57BL/6 mice and treated or not with C34 for 2 weeks. Interestingly, at early stage of the disease, we observed a significant decrease of serum Ig in C34 treated VK*MYC mice compared to untreated mice (Figure 2F). Therefore, C34 treatment induced a significant decrease of BM MM cells (identified as CD138+/CD155+ MM cells) (Figure 2G and 2H). In addition to effect on MM cells, C34 treatment induced a decrease of MSCs (CD155-/Lin-/CD45-/CD31-/F4/80-/Sca1+/CD51+) proportion in Vk12653 mouse BM (Figure 2G and 2I). Importantly, we noted a correlated increase in the percentage of MSC and MM cells in BM during MM development

in Vk12653 murine model (Figure 2J). Here, we demonstrate that TLR4 blockade alters the early phases of the disease in acting on BM microenvironment.

In our work, we demonstrate that targeting specifically pathological microenvironment via TLR4 signaling, reflecting the stage of disease, could be an innovative approach to improve the specificity and efficacy of currently used anti MM treatments.

Acknowledgments

We are grateful to our patients for their kind participation in this study.

The study was mainly financed by internal funds of EFS Occitanie.

The CRCT Team 13 is supported by la Fondation ARC pour la recherche contre le cancer. STROMALab team is financed by the “Intergroupe Francophone du Myélome” association (IFM 2019-2021).

Authorship Contributions

FD, LM, PB, JC and NE designed the research study. LL, MH, JGD, CD, AL, MVJ, MG and NE performed the research (experiments). LDSF, LS, PB, FD and NE analyzed the data. LL, JC and NE wrote the paper. HAL, NR and JC contributed clinical samples. LM revised the paper.

Conflict of Interest Disclosures

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Kumar SK, Rajkumar SV, Dispenzieri A, et al. Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood*. 2008;111(5):2516–2520.
2. Attal M, Lauwers-Cances V, Hulin C, et al. Lenalidomide, Bortezomib, and Dexamethasone with Transplantation for Myeloma. *N Engl J Med*. 2017;376(14):1311–1320.
3. Raje N, Berdeja J, Lin Y, et al. Anti-BCMA CAR T-Cell Therapy bb2121 in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2019;380(18):1726–1737.
4. Podar K, Richardson PG, Hideshima T, Chauhan D, Anderson KC. The malignant clone and the bone-marrow environment. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 2007;20(4):597–612.
5. Hideshima T, Mitsiades C, Tonon G, Richardson PG, Anderson KC. Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(8):585–598.
6. Corre J, Labat E, Espagnolle N, et al. Bioactivity and Prognostic Significance of Growth Differentiation Factor GDF15 Secreted by Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Multiple Myeloma. *Cancer Research*. 2012;72(6):1395–1406.
7. Uchiyama H, Barut BA, Mohrbacher AF, Chauhan D, Anderson KC. Adhesion of human myeloma-derived cell lines to bone marrow stromal cells stimulates interleukin-6 secretion. *Blood*. 1993;82(12):3712–3720.
8. Corre J, Mahtouk K, Attal M, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells are abnormal in multiple myeloma. *Leukemia*. 2007;21(5):1079–1088.
9. Takeda K. Evolution and integration of innate immune recognition systems: the Toll-like receptors. *Journal of Endotoxin Research*. 2005;11(1):51–55.
10. Kumar SK, Dispenzieri A, Lacy MQ, et al. Continued improvement in survival in multiple myeloma: changes in early mortality and outcomes in older patients. *Leukemia*. 2014;28(5):1122–1128.
11. Chesi M, Robbiani DF, Sebag M, et al. AID-Dependent Activation of a MYC Transgene Induces Multiple Myeloma in a Conditional Mouse Model of Post-Germinal Center Malignancies. *Cancer Cell*. 2008;13(2):167–180.
12. Chesi M, Matthews GM, Garbitt VM, et al. Drug response in a genetically engineered mouse model of multiple myeloma is predictive of clinical efficacy. *Blood*. 2012;120(2):376–385.
13. Neri P, J. Bahlis N. Targeting of Adhesion Molecules as a Therapeutic Strategy in Multiple Myeloma. *CCDT*. 2012;12(7):776–796.
14. Reagan MR, Ghobrial IM. Multiple Myeloma Mesenchymal Stem Cells: Characterization, Origin, and Tumor-Promoting Effects. *Clinical Cancer Research*. 2012;18(2):342–349.
15. Rosean TR, Tompkins VS, Tricot G, et al. Preclinical validation of interleukin 6 as a therapeutic target in multiple myeloma. *Immunol Res*. 2014;59(1–3):188–202.

16. Nimmanapalli R, Gerbino E, Dalton WS, Gandhi V, Alsina M. HSP70 inhibition reverses cell adhesion mediated and acquired drug resistance in multiple myeloma: HSP70 Inhibition Reverses Drug Resistance in Multiple Myeloma. *British Journal of Haematology*. 2008;142(4):551–561.
17. Giallongo C, Tibullo D, Camiolo G, et al. TLR4 signaling drives mesenchymal stromal cells commitment to promote tumor microenvironment transformation in multiple myeloma. *Cell Death Dis*. 2019;10(10):704.
18. Naji A, Menier C, Maki G, Carosella ED, Rouas-Freiss N. Neoplastic B-cell growth is impaired by HLA-G/ILT2 interaction. *Leukemia*. 2012;26(8):1889–1892.
19. Harashima A, Matsuo Y, Nishizaki C, et al. Human bone marrow stroma-dependent myeloma sister cell lines MOLP-6 and MOLP-7 derived from a patient with multiple myeloma. *Hum. Cell*. 2000;13(1):43–54.
20. Neal MD, Jia H, Eyer B, et al. Discovery and Validation of a New Class of Small Molecule Toll-Like Receptor 4 (TLR4) Inhibitors. *PLoS ONE*. 2013;8(6):e65779.
21. Lemaitre L, Do Souto Ferreira L, Joubert M-V, et al. Imprinting of Mesenchymal Stromal Cell Transcriptome Persists even after Treatment in Patients with Multiple Myeloma. *IJMS*. 2020;21(11):3854.
22. Menard C, Pacelli L, Bassi G, et al. Clinical-Grade Mesenchymal Stromal Cells Produced Under Various Good Manufacturing Practice Processes Differ in Their Immunomodulatory Properties: Standardization of Immune Quality Controls. *Stem Cells and Development*. 2013;22(12):1789–1801.
23. Sensebé L, Bourin P, Tarte K. Good Manufacturing Practices Production of Mesenchymal Stem/Stromal Cells. *Human Gene Therapy*. 2011;22(1):19–26.

Figure 1

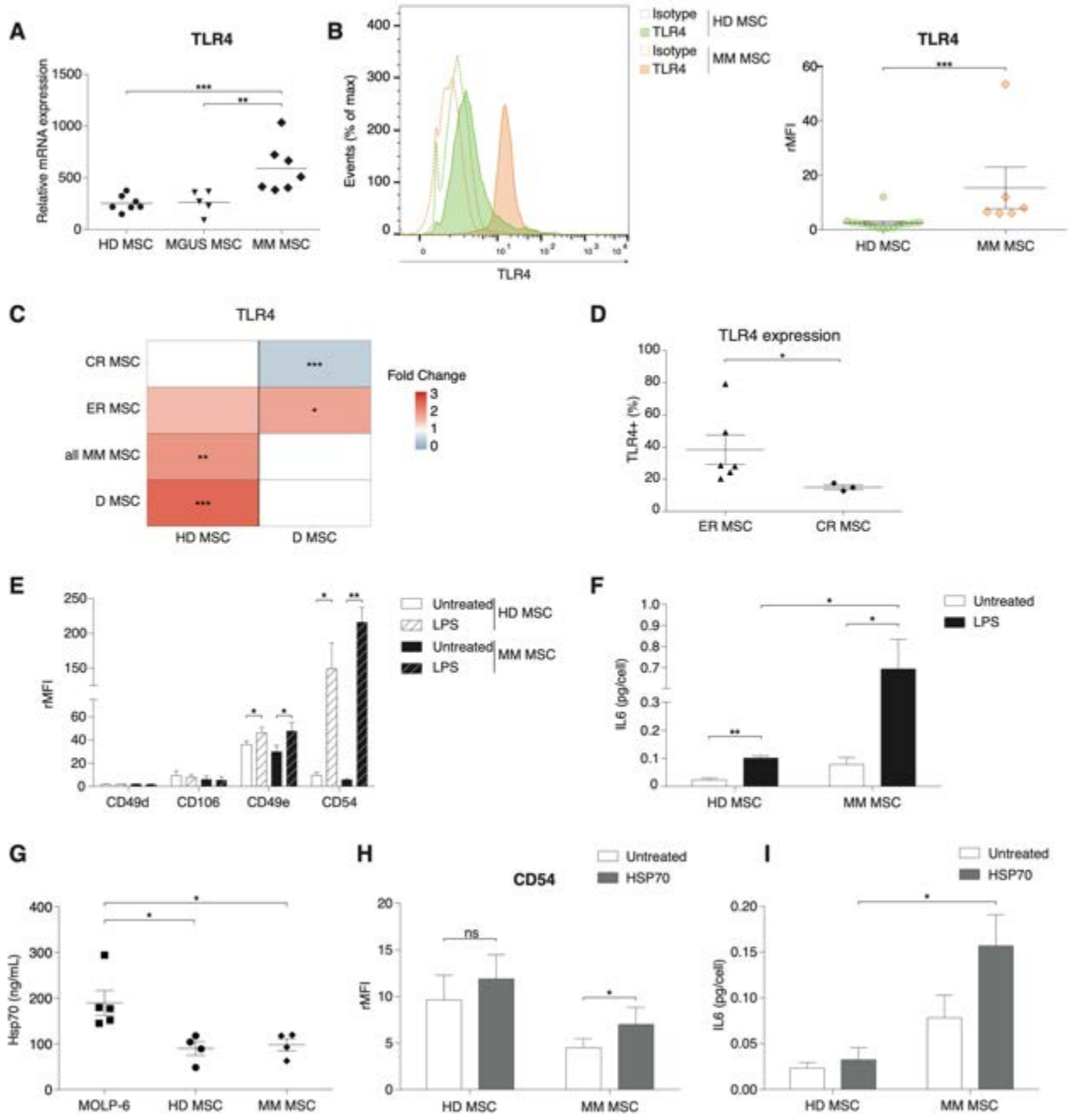
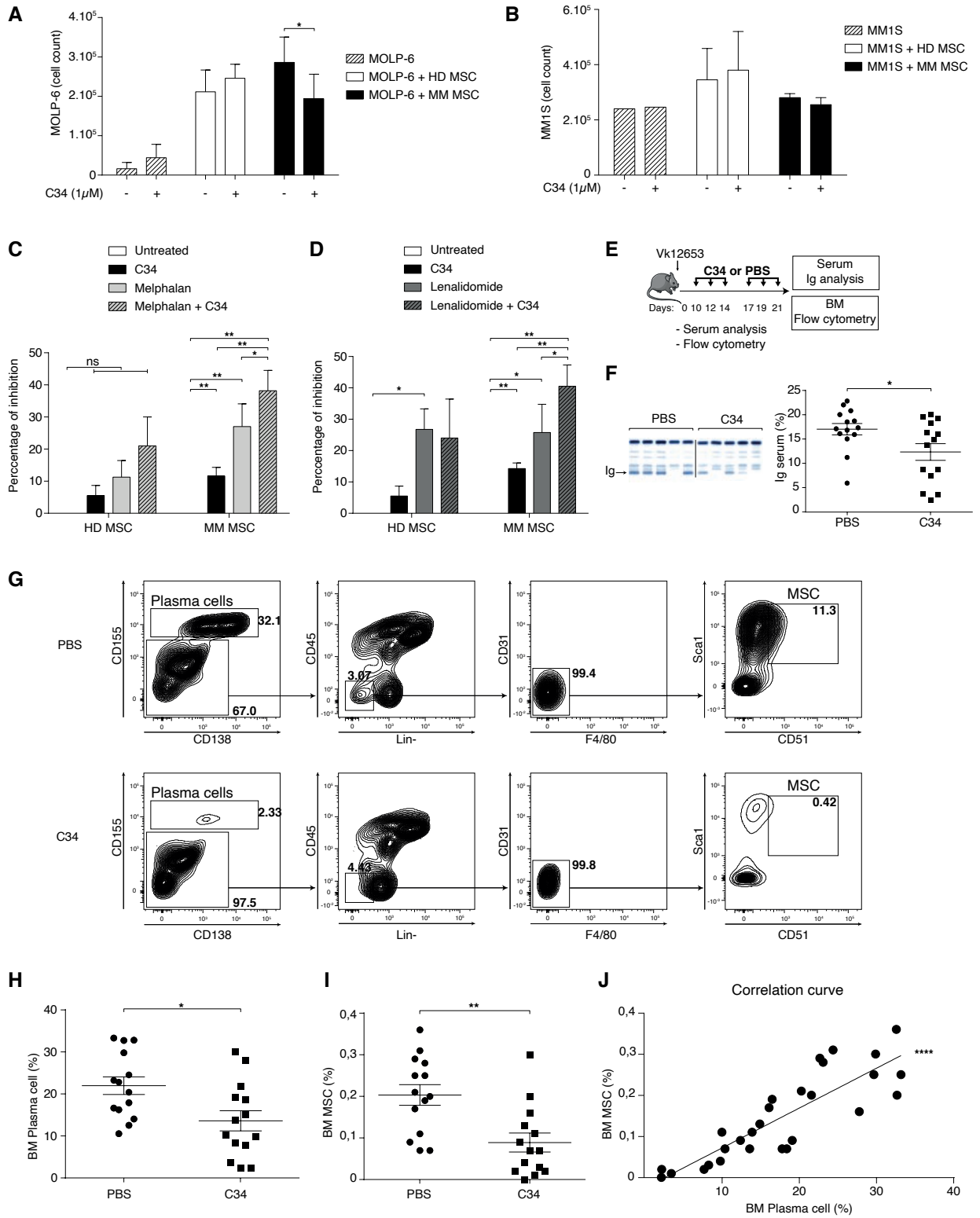


Figure 2



Figures Legends

Figure 1: Disease course dependent overexpression of TLR4 on MM MSCs modulated pro MM factors implicated in crosstalk with MM cells

Fresh BM aspirates from healthy donors (HD MSC) and patients with MM (MM MSC) were collected and analyzed at the stage of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS MSC), diagnosis (D MSC), complete remission (CR MSC) or early relapse (ER MSC) in the Institut Universitaire du Cancer de Toulouse-Oncopole (Toulouse). **(A)** Graph showing TLR4 mRNA expression in BM MSCs from HD (n=7), MGUS (n=5) and MM (n=7). Data are from U133+ 2.0 microarrays and previously described⁸. Each point represents 1 sample; horizontal bar is mean. **(B)** Representative FACS histogram and graph showing the expression of isotype (dotted line) or TLR4 (solid line) from HD (green) (n=16) and MM (orange) (n=6) MSCs primoculture (P1). Data are represented with mean±SEM presented as rMFI = ratio of mean fluorescence intensity (MFI) of staining / MFI isotype control. Each point represents 1 sample. **(C)** Heatmap representation of TLR4 fold change (FC), between HD, D, ER, CR MSCs or a combination of all MM (D, ER and CR), from red for upregulation to blue for downregulation. Group on the left were compared to the bottom ones. Data are from U133+ 2.0 microarrays and previously described²¹. **(D)** Graph showing percentage of cells which express TLR4 from ER (n=6) and CR (n=3) MSCs after primoculture (P1). Data are represented with mean±SEM. Each point represents 1 sample. **(E)** Graph showing CD49d, CD49e, CD54 and CD106 expression in HD and MM MSCs after 1h stimulation with 1µg/mL LPS or not (untreated), wash and two days culture at 37°C 5% CO₂. Data are represented with mean±SEM of rMFI from 5 independent experiments. **(F)** Graph showing IL-6 secretion of HD (n=3) and MM (n=3) MSCs after 1h stimulation with 1µg/mL LPS or not (untreated), wash and two days culture at 37°C 5% CO₂. Data performed by ELISA kit, analyzed with Varioskan scanning reader and represented with mean±SEM. **(G)** Graph showing Hsp-70 secretion by MM cell line (MOLP-6), HD and MM MSCs in normal culture condition. Data performed by ELISA and represented with mean±SEM from 5 independent experiments. **(H-I)** Graphs showing CD54 expression **(H)** and IL6 secretion **(I)** by HD and MM MSCs after 48h stimulation with human recombinant Hsp70 (1µg/mL) or not (untreated) at 37°C 5% CO₂. Data are represented with mean±SEM of CD54 rMFI or IL6 ELISA secretion from 6 independent experiments. Statistical differences between two groups were determined using Mann-Whitney test **(A, B, D)**, paired **(E, F, I)** or unpaired **(F, G, H)** T test. * P<0.05, ** P<0.01 *** P<0.001.

Figure 2: C34 treatment potentialized anti-MM drug effect in MOLP-6/MSCs coculture and declined Vk*MYC development

(A-B) Graph showing MOLP-6 **(A)** or MM1S **(B)** counting after 7 days in co-culture with HD, MM MSCs or without co-culture. MSCs were untreated or treated with 1 μ M of TLR4 antagonist (C34). The number of MOLP-6 cells was evaluated after staining with Trypan blue and evaluated on Malassez counting chamber on day 7. Data are represented with mean \pm SEM from 3 independent experiments. **(C-D)** Graph showing percentage of MOLP-6 inhibition after 7 days in co-culture with HD or MM MSCs or without co-culture. MSCs were untreated or treated with 1 μ M C34. Subsequently, MOLP-6 cells ($5 \cdot 10^4$) were added to each flask with 5 ml complete RPMI medium with or without 100 nM of melphalan (Mel) **(C)** or lenalidomide (Len) **(D)**. For both co-cultures, after 72h, 2 ml complete RPMI medium \pm 1 μ M C34 \pm 100nM Mel or Len was added. Data are represented with mean \pm SEM of % inhibition calculated as $1 - (\text{number co-cultured MOLP-6 } \pm \text{Mel or Len } \pm \text{ C34 at day 7} / \text{number untreated co-cultured MOLP-6 at day 7})$ from 5 independent experiments. **(E-J)** C57Bl/6 WT mice were injected with Vk12653 myeloma cell line (2×10^6 cells, i.v). 10 days later, they are treated with 1mg/kg of C34 (C34 group, n=14) or PBS (PBS group, n=14), twice a week during 2 weeks. Then, blood samples are collected and serum is harvest for protein electrophoresis. After treatment, femur is harvest and flush to extract BM. Erythrocytes are lysis and BM was stained with mouse antibodies as described in supplemental Table 1. **(E)** Schematic representation of the experimental design. **(F)** Representative electrophoresis and graph showing the presence of monoclonal Ig in blood of PBS and C34 group after 2 weeks treatment. According to the manufacture, serum proteins are separated into 6 major fractions (albumin, α -1, α -2, β -1, β -2, γ), detect and quantify monoclonal components for the diagnosis. Data are represented with mean \pm SEM. Each point represents 1 sample. **(G)** Representative FACS plots showing the gating strategy to isolate MSC. Viability cells are separated in 2 groups, plasma cells, gated with double positive CD155+/CD138+ cells and microenvironment cells CD155-. In this microenvironment, a Lin-, CD45.2-, CD31-, F4/80- permit to select MSCs with double positive CD51+/Sca+1 cells. **(H-I)** Graph showing the percentage of BM plasma cells **(H)** and BM MSCs **(I)** in C34 or PBS groups. Data are represented with mean \pm SEM and performed in several independent experiments with n=14 mice. **(J)** Graph showing the correlation curve between BM plasma cells and BM MSCs percentages. Each point represents one mouse. Pearson correlation coefficient, $r=0,7335$. Statistical differences between two groups were

determined using paired (A-D) T test and Mann-Whitney test (F-I). * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001, **** P<0,0001.

Supplemental data:

Cells

Human samples. MM MSCs prepared as previously described²¹. For HD MSCs, Femur head or iliac-crest aspirations were harvested from patients who provided prior written informed consent according to the ethics committees of Toulouse University Hospitals. Briefly, MSCs were obtained from unprocessed BM with erythrocyte lysis buffer or the density-gradient method and seeded at $5 \cdot 10^4$ cells/cm² in a 150-cm² flask with complete medium minimum essential medium- α (MEM α) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and 10 μ g/ml ciprofloxacin. For all MSCs cultures, the medium was renewed twice a week until cells were confluent (primoculture, P1). Cells were then detached with trypsin^{22,23}. $2 \cdot 10^5$ cells of P1 were then collected and frozen with 350 μ L RLT + 10% β metamercaptoethanol for transcriptomic analysis.

Cell lines. The MOLP-6 cell line was a generous gift from Dr. Harashima. Cryopreserved MOLP-6 cells were defrosted and grown on MSCs stroma in RPMI medium-1640 with 10% FCS and 10 μ g/mL ciprofloxacin¹⁹.

Flow cytometry

BM mouse and human cells were stained with anti-human and anti-mouse antibodies for 30min at 4°C in PBS supplemented with 2% FCS and 2mM EDTA. Antibodies are described in supplemental Table 1. Flow cytometry data was acquired in Fortessa X20 and CyAN ADP flow cytometer and analyzed using Flowjo and Kaluza softwares.

Transcriptomic analysis

The ray Affymetrix cell file were used for differential expression analysis. Protocol is described in Lemaitre et al²¹.

Statistics

Statistical comparisons involved Student's *t* test and GraphPad Prism v7.0 software. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Supplemental Table

KEY RESSOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	REFERENCE
Kits		
MACSprep Multiple Myeloma CD138 MicroBeads, human	Miltenyi Biotec	Cat#: 130-111-744
Human IL6 ELISA kit	RayBiotech	Cat#: ELH-IL6-1
Human Hsp70 ELISA kit	RayBiotech	Cat#: ELH-HSP70-1
Chemicals and Recombinant Proteins		
Erythrocyte Lysis Buffer	Qiagen	Cat#: 79217
Human Recombinant HSP70 Full Length Protein	StressMarq Biosciences	Cat#: SPR-117
RPMI Medium 1640	ThermoFisher	Cat#: 61870-010
MEM α Medium	ThermoFisher	Cat#: 22561021
Fetal Calf Serum	Sigma-Aldrich	Cat#: F7524
Acridine Orange / Propidium Iodide (AO/PI)	Logos Biosystems	Cat#: F23001
RLT lysis buffer	Qiagen	Cat#: 79216
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich	Cat#: D8537-500ML
Trypsin-EDTA solution	Sigma-Aldrich	Cat#: T3924-100ML
β metamercaptoethanol	Sigma-Aldrich	Cat#: M6250-100ML
Trypan blue	Sigma-Aldrich	Cat#: T8154-100ML
DMSO	Sigma-Aldrich	Cat#: D2650-100ML
Drugs		
Melphalan	Sigma	Cat#: 148-82-3
Lenalidomid	Sellekchem	N/A
C34	Tocris	Cat#: 5373

Ciprofloxacin	Bayer	N/A
Bacterial and Virus Strains		
LPS E.coli K12	Invivogen	Cat#: tlr-eklps
Antibodies anti-human		
Anti-human CD49d-FITC HP2/1	BeckmanCoulter	Cat#: IM1404U
Anti-human CD49e-FITC SAM1	BeckmanCoulter	Cat#: IM1854U RRID: AB_131037
Anti-human CD54-PE HA58	BD Biosciences	Cat#:560971 RRID: AB_2033962
Anti-human CD106-PE 51-10C9	BD Biosciences	Cat#: 561679 RRID: AB_10892801
Anti-human TLR4-PE TF901	BD Biosciences	Cat#: 564215 RRID: AB_2738674
Antibodies anti-mouse		
Anti-mouse F4/80-BUV395 Clone 6F12	BD Biosciences	Cat# 744341 RRID: AB_2742168
Anti-mouse CD138-BUV737 Clone 281-2	BD Biosciences	Cat# 564430 RRID:AB_2738805
Anti-mouse CD51-BV421 Clone RMV-7	BD Biosciences	Cat# 740062 RRID:AB_2739827
Anti-mouse CD45.2-BV605 Clone 104	BioLegend	Cat# 109841 RRID:AB_2563485
Anti-mouse CD31-FITC Clone MEC13.3	BD Biosciences	Cat# 553372 RRID:AB_394818
Anti-mouse B220-PerCpCy5.5 Clone RA3-6B2	BD Biosciences	Cat# 561101 RRID:AB_10565970
Anti-mouse CD3e-PerCpCy5.5 Clone 145-2C11	BD Biosciences	Cat# 561108 RRID:AB_10562558
Anti-mouse Ter119-PerCPVio700 Clone Ter119	Miltenyi Biotec	Cat# 130-103-807 RRID:AB_2660087
Anti-mouse Gr1-PerCpCy5.5 Clone RB6-8C5	BioLegend	Cat# 108428 RRID:AB_893558
Anti-mouse CD11b-PerCpVio700 Clone REA592	Miltenyi Biotec	Cat# 130-113-809 RRID:AB_2751174
Anti-mouse CD284-PE Clone MTS510	Miltenyi Biotec	Cat# 130-102-561 RRID:AB_2660388
Anti-mouse Sca1-PeVio770 Clone REA422	Miltenyi Biotec	Cat# 130-106-220 RRID:AB_2653403
Anti-mouse CD155-APC Clone TX56	BioLegend	Cat# 131510 RRID:AB_10645507
Anti-mouse Fixable Viability Dye eFluor 780	ThermoFisher	Cat# 65-0865-14
Transcriptomic analysis		
RNeasy Minikit	Qiagen	Cat# 74106
Agilent Small RNA Analysis kits	Agilent	Cat# 5067-1548/49/50

HG-U133 plus 2.0 GeneChip microarrays	Affymetrix	Cat# 900467
Deposited Data		
Microarray sequencing raw and analyzed data of human MSC	Medline	GEO: GSE146649
Experimental Models: Cell Lines/Organisms/Strains		
Mouse: Vkmyc12653	Gift from Dr Leif Bergsagel	
C57BL/J6 mice	Janvier Laboratory	Cat#: SC-C57J-F
Software and Algorithms		
Graphpad Prism 7.0 software	GraphPad Software, Inc.	http://www.graphpad.com/scientific-software/prism/
FlowJo V10	FlowJo LLC	www.flowjo.com
Kaluza v1.5	Beckman Coulter	N/A
Analysis materials		
Fortessa X20	BD Biosciences	N/A
ADPCyan flow cytometer	Beckman Coulter	N/A
Varioskan scanning reader	ThermoFisher	N/A
Hydrasis 2 scan	Sebia	N/A

Supplemental Table 1: materials references

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I. La modification du transcriptome des MSC persiste après le traitement intensif des patients atteints de Myélome

Depuis ces dernières années, le microenvironnement a été décrit comme jouant un rôle prépondérant dans le développement du MM. L'analyse des différentes populations cellulaires du microenvironnement a pu mettre en évidence l'implication de populations cellulaires particulières et notamment des MSC dans le développement de la maladie notamment *via* la sécrétion de facteurs protumoraux. Que ce soit dans les tumeurs solides ou hématologiques, nos résultats en accord avec la littérature¹⁷² montrent que la prolifération de cellules malignes se traduit par un changement de phénotype des MSC environnantes. Elles sont alors appelées CA-MSC ou dans notre cas MM BM-MSC.

Dans le cas du MM, les MSC pourraient être impliquées dans la croissance des PC malins *via* différentes voies : en sécrétant directement des facteurs de croissance²⁰⁴; en inhibant la mort par apoptose des PC malins *via* des facteurs sécrétés²⁰⁸ ; en sécrétant des exosomes²⁰⁹ et/ou en modifiant ses capacités immunosuppressives^{205,211}. Les nombreuses cytokines et facteurs de croissance qu'elles sécrètent sont également capables d'agir sur les autres cellules composant le reste du microenvironnement^{111,200,201,203,206,207} notamment sur les macrophages et les lymphocytes.

Dans les hémopathies malignes, plusieurs voies de traitement peuvent être envisagées pour améliorer d'une part la survie des patients mais également leur qualité de vie. Dans le cas du MM, les lyses osseuses liées à la pathologie grèvent significativement la qualité de vie des patients. Les causes de ce déficit osseux restent imparfaitement comprises et leur identification est un enjeu thérapeutique fort. Les MSC sont capables d'exprimer des protéines de la matrice extracellulaire impliquées dans l'inhibition de la différenciation ostéoblastique²¹⁰.

Plusieurs études se sont intéressées aux différences phénotypiques des MSC en présence de PC malins dans le but de démontrer leur implication dans le développement du MM. Toutefois, ces études ont été réalisées, soit sur des MSC prélevées chez des patients en état pré-myélomateux (MGUS), soit au moment du diagnostic de la maladie¹¹¹. A ce jour, aucune étude ne s'est intéressée à l'évolution phénotypique et fonctionnelle des MSC au

cours du traitement des patients, lors de sa mise en rémission ou lors de la rechute. Ainsi un de mes travaux de thèse a eu comme but de réaliser le suivi des MSC grâce à une analyse transcriptomique incluant des patients atteints de MM à différents stades de la maladie, au diagnostic, en rechute précoce et en rémission. L'objectif de cette étude étant d'analyser les changements dans le phénotype des MSC et son impact suite au traitement, dans la rechute du patient.

A. Choix de la cohorte

Le MM est une maladie extrêmement hétérogène. Il a donc fallu, pour cette étude, définir des critères d'inclusion des patients pour réaliser une cohorte la plus homogène possible en termes de type de traitement, d'âge et de date de survenue de la rechute. Dans un premier temps, nous nous sommes interrogés sur le choix des moelles osseuses saines. En effet, les études qui comparent des MSC de MM avec des MSC de prélèvements de moelles saines sont souvent réalisées à partir de prélèvements issus de prothèses totales de hanche (PTH) et donc de prélèvements de fémur^{111,198,203,207,213}. Or dans le MM, le prélèvement de moelle est réalisé au niveau du sternum ou des crêtes iliaques. De nombreuses études montrent que les MSC sont différentes selon leur origine¹⁶⁴⁻¹⁶⁶, c'est donc pour cela que nous avons utilisé des moelles saines provenant de prélèvements réalisés au niveau des crêtes iliaques. De plus, les donneurs sont normalement exempts de pathologies contrairement aux prélèvements de PTH qui sont souvent très inflammatoires. En revanche, l'âge moyen des prélèvements de patients se situe après 50 ans pour les MM et 27 ans chez les donneurs sains. Les patients au diagnostic de la maladie ont une moyenne d'âge homogène à la cohorte de rechute et de rémission alors que la moyenne d'âge des donneurs sains est plus faible. Cette observation pourrait induire un biais dans notre étude. Cependant, la comparaison des transcriptomes des MSC issues de nos donneurs sains avec ceux des MSC venant des patients atteints de MM met en évidence des voies de signalisation déjà retrouvées et publiées¹¹¹ dans les travaux antérieurs réalisés avec des donneurs sains plus âgés. De plus, Ganguly *et al* a comparé le phénotype de MSC issues de moelles de donneurs sains jeunes (19-40 ans) aux MSC de personnes âgées (61-89 ans). Ils ne retrouvent pas de modification phénotypique des cellules liées à l'âge : multipotence des MSC et expression de gènes impliqués dans l'adipogenèse, l'ostéogenèse ou le remodelage osseux²¹⁴. Une seconde étude réalisée sur des MSC de lapins récupérées sur des lapins jeunes (4-6 mois) et âgés (4-5 ans), nous montre que

la différenciation des MSC de moelle osseuse en ostéoblastes et en adipocytes ne diffère pas entre jeunes et âgés. Seule une baisse du potentiel chondrogénique et une augmentation de la sénescence sont retrouvées chez les MSC provenant de lapins âgés par rapport aux jeunes²¹⁵. Ces données suggèrent donc que l'âge des sujets n'influe pas sur les résultats que nous avons obtenus ici.

Toutes les études antérieures comparent à chaque fois un pool de donneurs sains avec un pool de patients sans lien génétique, aussi bien entre HD et MM que entre MGUS et diagnostique^{111,198,203,207,213}. Dans notre étude, nous avons initialement voulu comparer le transcriptome des MSC prélevées sur un même patient tout au long de son traitement (diagnostic, post-greffe et rechute) c'est-à-dire des prélèvements de patients dits appariés. Malheureusement cette analyse n'a pas pu être réalisée compte tenu du nombre important de prélèvements non exploitables issus de la banque (trop peu de cellules après remise en culture) et il a été difficile de trouver des patients homogènes en termes de traitements. Nous avons donc décidé de comparer des patients dit « non appariés » c'est-à-dire différents entre diagnostic et post greffe. Il serait intéressant de comparer, si cela était possible, l'évolution de la MSC du même patient pour conforter la robustesse de nos analyses.

De la même façon, cette analyse a été réalisée sur une dizaine de patients par groupe, compte tenu de la banque disponible au moment de l'analyse. Nous avons conscience d'avoir privilégié l'homogénéité de notre cohorte à sa taille, il serait intéressant pour augmenter la significativité de nos propos d'ajouter d'autres prélèvements de patients.

B. Analyses transcriptomiques et fonctionnelles des MSC de Myélome

Nous avons dans un premier temps, comparé le transcriptome de MSC issues de patients traités par autogreffe de CSH et prélevées soit au moment de la rechute soit pendant la période de rémission. L'analyse transcriptomique ne nous a pas permis de différencier les MSC issues de ces 2 types de patients. Depuis la fin des années 1990, une nouvelle approche a vu le jour, l'analyse protéomique²¹⁶. Aujourd'hui il est bien établi qu'un ARNm pourrait bien être transcrit mais des défauts de traduction existe et la protéine ne sera pas forcément présente ou la traduction peut donner naissance à une protéine non fonctionnelle. Il serait donc intéressant de réaliser une étude protéomique de nos populations de MSC, afin de mettre en évidence des différences d'expression en protéines^{217,218}.

Pour autant, nous pouvons affirmer que nos données : (i) confortent les anomalies du phénotype des MSC au diagnostic du MM ; (ii) démontrent que ces anomalies sont pérennes dans le temps puisqu'elles persistent après traitement et que les MSC ne retrouvent pas leur phénotype originel (donneurs sains), y compris chez des patients en réponse complète.

Chaque patient rechute à plus ou moins long terme du MM après la première ligne de traitements. Ne pouvant mettre en évidence un marqueur phénotypique des MSC capable de prédire la rechute des patients, et disposant d'un nombre significatif de prélèvements de patients ayant eu un MM, nous avons voulu identifier si une voie de signalisation était particulièrement activée dans les MSC de patients. Cette voie pourrait être une cible thérapeutique potentielle pour les patients si elle est retrouvée impliquée dans les capacités pro-tumorales des MSC. Nous avons pour cela comparé le profil transcriptomique des MM BM-MSC à des HD BM-MSC. De façon surprenante, lorsque l'on compare ces **HD BM-MSC** à des **MM BM-MSC**, on discerne 3 groupes distincts :

- Les **HD BM-MSC**, MSC de donneurs sains,
- Les **D BM-MSC**, MSC dites de diagnostic,
- Les **Post traitement BM-MSC**, MSC dites « post traitement ».

Compte tenu du fait que les différences entre des MSC de patients avant et après traitement pourraient provenir de l'effet du traitement et que cela n'était pas le but de cette étude, nous nous sommes focalisés sur les gènes qui demeurent différentiellement exprimés au **diagnostic** et **post traitement**, par rapport aux MSC de **donneurs sains**. Nous sommes

partis de l'hypothèse que ces gènes seraient impliqués dans le phénotype pro-tumoral pérenne des MSC. Cette analyse est représentée dans la **figure 7**.

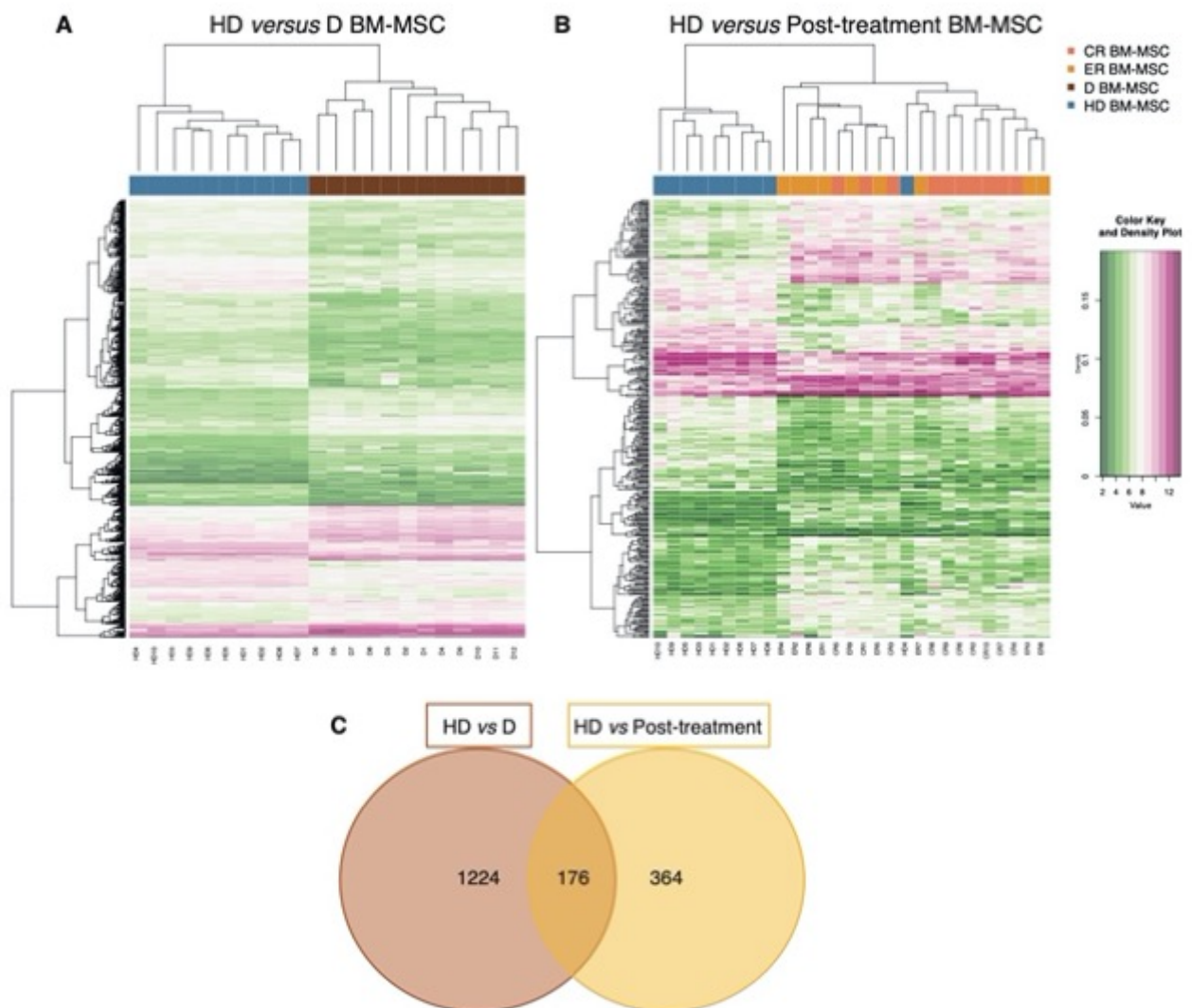


Figure 7 : Liste des gènes communs

Heatmaps représentatives des 1400 et 540 gènes différentiellement exprimés entre HD versus D BM-MSC (A) et HD versus Post-traitement BM-MSC (B) respectivement avec une p-valeur ajustée $< 0,05$ et $2 < FC < 0,5$. 176 gènes sont retrouvés communs entre ces 2 groupes (C).

On trouve une liste de 176 gènes communs avec 2 voies de signalisation principalement impliquées : la voie Wnt/ β catheine et la voie de la coagulation sanguine.

1. Dérégulation de la voie Wnt/ β cathénine et de l'ostéogénèse

Les voies de différenciation des MSC sont régulées par différents facteurs. De nombreuses études montrent l'impact de DKK1 et de la voie Wnt sur la différenciation des MSC en OB, chondrocytes et adipocytes^{124,219,220}. Nous avons mis en évidence dans notre étude, la présence d'une surexpression de DKK1 par les **MM** BM-MSc par rapport aux **HD** BM-MSc.

DKK1 est une protéine antagoniste de la voie Wnt/ β cathénine impliquée dans de nombreux métabolismes dont fait partie la différenciation des MSC. Cette voie a été rapportée comme corrélée au métabolisme osseux et adipocytaire dans la différenciation des MSC. En effet, quelques études montrent que DKK1 pourrait bloquer la différenciation ostéoblastique^{220,221}. De plus, on le retrouve impliqué dans le MM à travers quelques études qui montrent une corrélation entre une élévation du taux important de DKK1 et la présence de lésions osseuses chez les patients atteints de MM. Les PC malins sécrètent une forte quantité de DKK1 qui entraînerait une diminution de la différenciation des MSC en OB^{124,219}. Pinzone *et al* montrent que DKK1 sécrété par les PC malins inhibe la différenciation des MSC en OB et favorise l'activation des OC²²¹. De plus, DKK1 pourrait jouer un rôle dans la différenciation adipocytaire. DKK1 sécrété par les préadipocytes pourrait favoriser l'adipogénèse et être corrélé à une diminution de la voie de signalisation Wnt²²². Si on ajoute à ces données de la littérature une surexpression de DKK1 par les MSC, visible ici dans le transcriptome, on comprend pourquoi les lésions osseuses persistent même après l'autogreffe des patients atteints de MM.

De plus, on retrouve dans notre analyse, une sous expression de Runx2 par les **MM** BM-MSc. Ce phénomène est concordant avec ce qui est connu dans la littérature : l'inhibition de la voie de signalisation Wnt/ β cathénine sur les MSC entraîne une diminution de l'expression de Runx2 qui bloque l'ostéogénèse²²³. Ces résultats sont synthétisés par la figure suivante adaptée de la revue de Pinzone *et al*.

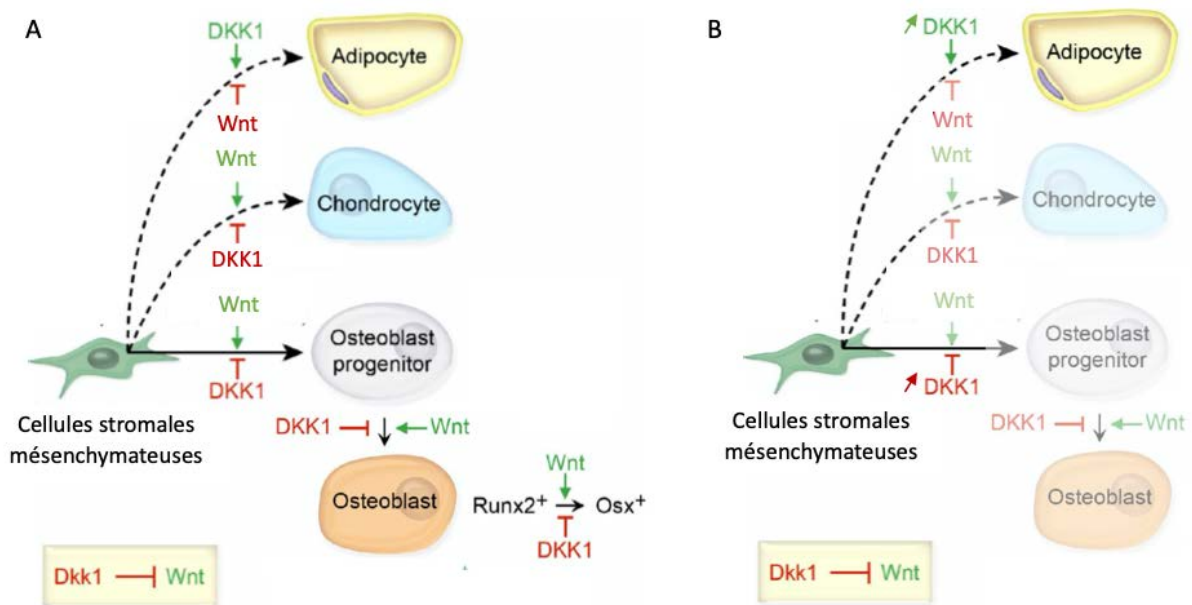


Figure 8: Impact de DKK1 et Wnt sur la différenciation des MSC

La figure A présente ce qui se passe chez un individu sain sur la différenciation des MSC. La figure B représente les conséquences de ce que l'on observe dans le cadre du MM. Adapté de Pinzone *et al*.

Dans l'analyse transcriptomique, les gènes de différenciation adipocytaire ne sont pas retrouvés différemment exprimés entre des **MM** BM-MSC et les **HD** BM-MSC. Or, la revue de Pinzone *et al* semble indiquer qu'une surexpression de DKK1 associée à une perte de la voie Wnt pourrait favoriser la différenciation des MSC vers un phénotype plutôt adipocytaire. Cette différence n'est pas visible au niveau transcriptomique mais a été validée par les analyses fonctionnelles réalisées *in vitro* et présentées par la suite. Il serait intéressant de voir si leur capacité de différenciation en chondrocytes se retrouve également perturbée.

Par ailleurs, notre analyse transcriptomique montre une surexpression d'OPG (par le gène *TNFRSF11B*), avec un FC à 2,3 et une p-valeur ajustée à 0,02, par les **MM** BM-MSC par rapport au **HD** BM-MSC. Ce résultat est en accord avec Giuliani *et al* qui montrent bien l'expression d'OPG par western blot dans des MSC de patients¹⁰⁰. Ce résultat remet en question plusieurs études dont les résultats suggèrent une sous expression d'OPG par les MM BM-MSC. En effet dans ces études, l'expression d'OPG a été analysé dans des pré-OB et non dans des MSC, en présence de lignées de MM¹⁰⁰, ou encore sur une lignée myoblastique murine, C2C12²²⁴. Ce stade de pré-OB correspond à une MSC qui a déjà commencé l'engagement vers un phénotype ostéoblastique, or dans notre cas nous cherchons à comprendre le rôle des MSC avant leur différenciation. Une surexpression d'OPG par les MSC

de MM pourrait non pas servir à bloquer la liaison de RANKL et empêcher l'ostéoclastogenèse mais pourrait plutôt être impliquée dans la liaison de OPG à syndecan 1 (CD138) exprimé par les PC malins et servir au support de leur croissance²²⁵.

Finalement cette dérégulation de différenciation en OB suggère que les OB pourraient aussi avoir un rôle dans la prolifération des PC malins. Une étude réalisée par Yaccoby *et al* montrent des résultats ambigus car la plupart des PC malins ont une croissance diminuée face aux OB alors que chez d'autres patients, la co-culture avec les OB entraîne une augmentation de croissance des PC malins²²⁶. Toutefois ces résultats restent peu concluants puisque cet effet est extrêmement hétérogène en fonction du patient choisi. Il serait intéressant de mieux caractériser la nature de l'impact des OB sur la prolifération des PC malins, avant par exemple d'utiliser une thérapie ciblée visant à restaurer la fonction ostéoblastique des patients, pour éviter de soutenir la croissance des PC malins si tel est le cas avec les OB.

De nombreuses études ont été réalisées sur les facteurs que peuvent sécréter les PC malins et le microenvironnement pour promouvoir la différenciation des OC ainsi que la dégradation osseuse^{92,94,96-98,104,111}. Le rôle des MSC dans ce phénomène reste encore obscur, plusieurs hypothèses sont possibles : les MSC pourraient induire cet effet en activant d'autres cellules du microenvironnement ou encore par contact direct avec les OC.

2. Dérégulation de la voie de coagulation et angiogénèse

Notre analyse transcriptomique met en évidence une surexpression de gènes impliqués dans la coagulation sanguine. Parmi ces gènes, un candidat semble être intéressant, la *SERPINB2*, qui est retrouvée 31 fois plus exprimée dans les **post traitement** BM-MSC par rapport aux **HD** BM-MSC et 15 fois plus exprimée dans les **D** BM-MSC. La *SERPINB2* aussi appelée « plasminogen activator inhibitor-2 » (PAI2), est un facteur de coagulation qui inactive l'urokinase et est un activateur tissulaire du plasminogène (tPA). PAI2 régule la formation des thrombus en inhibant la fibrinolyse et la thrombolyse. Dans des souris déficientes pour PAI2, on retrouve une résolution des thromboses veineuses²²⁷. Les 2 types, *SERPINE1* (PAI1) et *SERPINB2* (PAI2), ont été décrites dans les cancers. PAI1 est plutôt décrite comme favorisant la progression tumorale alors qu'une augmentation de PAI2 est associée à une diminution de la croissance tumorale et des métastases²²⁸. Dans notre cas, PAI1 et PAI2 sont retrouvés surexprimés par les **MM** BM-MSC par rapport aux **HD** BM-MSC. La surexpression de PAI2, dans notre cas, pourrait être corrélée aux signes cliniques des patients.

En effet, le MM augmente le risque thrombo-embolique, qui est par ailleurs accentué par la chimiothérapie²²⁹. Il semble que les MSC soient associées physiologiquement à des effets thrombogéniques avec une activité procoagulante. Coppin *et al* parle des effets procoagulants des MSC aussi bien *in vitro* que *in vivo*. De même, chez des patients transplantés, l'injection de MSC induit des thromboses²³⁰. Il serait intéressant de comprendre le potentiel rôle de cette action prothrombotique sur les PC malins. L'utilisation de bivalirubin (inhibiteur de thrombine) montre des effets intéressants en bloquant la migration des MSC par inhibition de l'axe SDF-1/CXCR4²³¹.

Il y aurait un intérêt thérapeutique à poursuivre les analyses concernant le rôle des MSC dans la coagulation et de voir si elles peuvent avoir un lien avec la vascularisation. En effet, l'angiogenèse tumorale a été très largement décrite comme ayant un rôle pro-tumoral dans de nombreux cancers *via* les cellules endothéliales²³². Dans le cadre du MM, Rajkumar *et al* ont analysé la moelle de 400 patients atteints de MM vs 42 donneurs sains par immunohistochimie, et retrouvent une augmentation des cellules endothéliales CD34+ au cours de la pathologie, du stade MGUS jusqu'à la rechute²³³. Dans le sérum des patients atteints de MM, les cellules endothéliales circulantes sont retrouvées augmentées et corrélatent à la progression de la pathologie²³⁴. On retrouve aussi une augmentation des facteurs pro-angiogéniques (FGF β et VEGF) dans la moelle osseuse des patients atteints de MM²³⁵. Il semble que dans le MM, les cellules progénitrices endothéliales améliorent la prolifération et favorisent la progression dans le cycle cellulaire des clones de PC malins²³⁶. Il est également connu que les MSC ont la capacité de se différencier en cellules endothéliales²³⁷. Elles pourraient donc, *via* leur différenciation en cellules endothéliales, favoriser la croissance des PC malins. Il serait intéressant de confirmer cette hypothèse, puisque les MSC de MM semblent avoir elles-mêmes des capacités angiogéniques²³⁸.

3. Dérégulation de la différenciation adipocytaire

Les analyses phénotypiques réalisées *in vitro* montrent une perte de capacité de différenciation des MM MSC en ostéoblastes vers un phénotype plutôt adipocytaire. Lors de la différenciation des MSC en adipocytes, l'analyse de l'expression des gènes adipocytaires révèle une diminution de l'expression de leptine par les **post traitement** BM-MSc par rapport aux **HD** BM-MSc, présentés dans la **figure 9**.

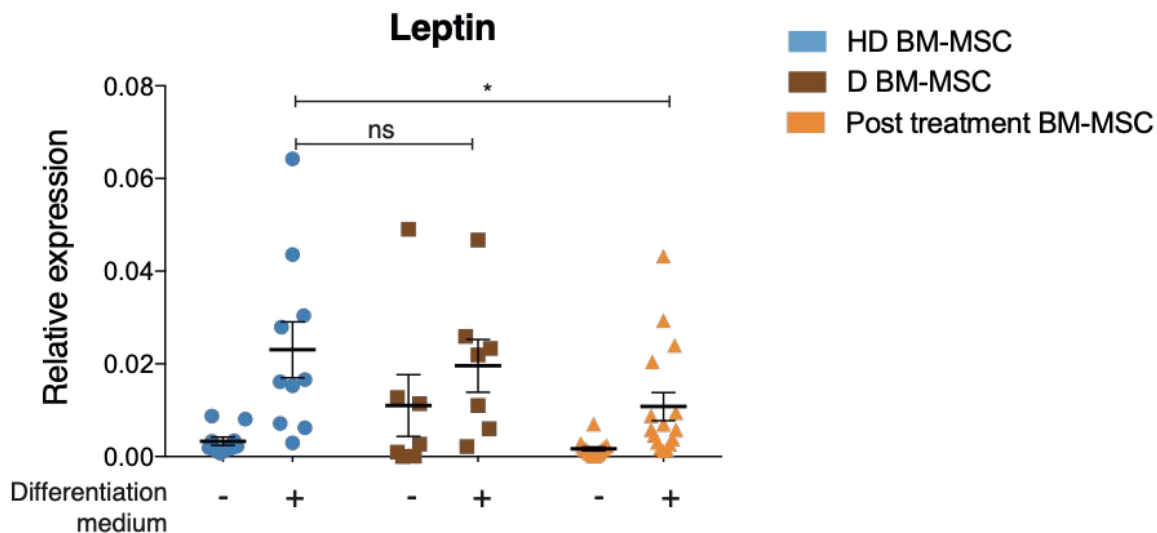


Figure 9: Expression de Leptine sur HD et MM BM-MSc

Expression relative de la leptine sur $n=10$ HD BM-MSc (bleu), $n=8$ D BM-MSc (marron) et $n=16$ post traitement BM-MSc (orange), par qRT-PCR des MSC, suite à la culture avec ou sans milieu de différenciation adipocytaire. Suite à la différenciation des MSC en adipocytes, on retrouve une diminution significative de l'expression de leptine par les post traitement BM-MSc, comparé aux HD BM-MSc.

Hamrick *et al* ont mis en place un modèle de souris obèse déficiente en leptine et montrent que cette dérégulation de la leptine induit dans les membres postérieurs, une diminution de la masse de l'os associée à une augmentation de l'adipogenèse dans la moelle osseuse²³⁹. De plus, chez ces souris déficientes traitées avec de la leptine, on retrouve dans la moelle osseuse, une diminution des adipocytes associée à une augmentation de la surface du tibia reflétant la formation osseuse. L'ajout de leptine chez des souris non déficientes en leptine ne semble pas avoir d'effet sur la formation osseuse²⁴⁰. Il serait donc intéressant de tester l'effet de l'ajout de leptine dans un modèle murin porteur du MM.

Par ailleurs, en ce qui concerne la différenciation adipocytaire, quelques études se sont intéressées aux adipocytes de la moelle osseuse. Dans ces études, on retrouve sur un modèle

murin, une augmentation des adipocytes de la moelle osseuse lorsque la souris est porteuse du MM¹⁵⁴ mais rien n'a été analysé chez l'Homme. Les adipokines retrouvées dans la moelle osseuse des patients atteints de MM semblent jouer un rôle important dans la croissance de la tumeur¹⁵⁵, avec une augmentation de la leptine^{155,156} et une diminution d'adiponectine^{157,158} au niveau médullaire et sérique. Une étude récente compare des adipocytes de moelle osseuse à des adipocytes de tissus adipeux de même donneur sain. Il note que dans un contexte sain, les adipocytes de moelle osseuse semblent sécréter un niveau important de cytokines pro-inflammatoires²⁴¹. Or, dans le cadre du MM, les PC malins créent un environnement plutôt anti-inflammatoire⁶⁹. Il serait donc intéressant d'isoler des adipocytes de moelle osseuse de patients et d'analyser leur état, par rapport à des adipocytes de moelle osseuse saine. Nous avons conscience que l'isolement des adipocytes dans la moelle osseuse est très complexe, aussi la plupart des études se tournent, comme nous, vers l'analyse de MSC différenciées *in vitro* en adipocytes que l'on pourrait qualifier plutôt de pré-adipocytes. Il serait intéressant de comprendre les effets potentiels de ces cellules sur la croissance des PC malins mais aussi sur les autres cellules du microenvironnement comme les cellules du système immunitaires, les ostéoclastes et les MSC. Ces adipocytes pourraient par les adipokines qu'elles sécrètent empêcher la différenciation des MSC en OB.

4. Capacité immunomodulatrice des MSC de Myélome

Nous avons montré dans notre étude fonctionnelle des MSC de patients atteints de MM une différence concernant leur capacité immunomodulatrice. En effet, il semble que les **ER** BM-MSC ont des capacités immunosuppressives plus importantes que les **CR** BM-MSC. Ces résultats indiquent que suite au traitement les MSC ne suppriment plus l'immunité, permettant un contrôle partiel de la maladie, alors que lorsque le patient rechute ces cellules retrouvent cette capacité immunosuppressive. Dans la littérature, Martinet *et al* indiquent que cette capacité immunosuppressive est induite par l'expression de COX2 (Cyclooxygénase2) par les MSC qui produisent alors de la prostaglandine E2 (PGE2) et inhibent les LT²⁴². Les différences d'expression de *PTGS2* qui code pour COX2, dans les différentes comparaisons de MSC sont représentées dans la **figure 10**.

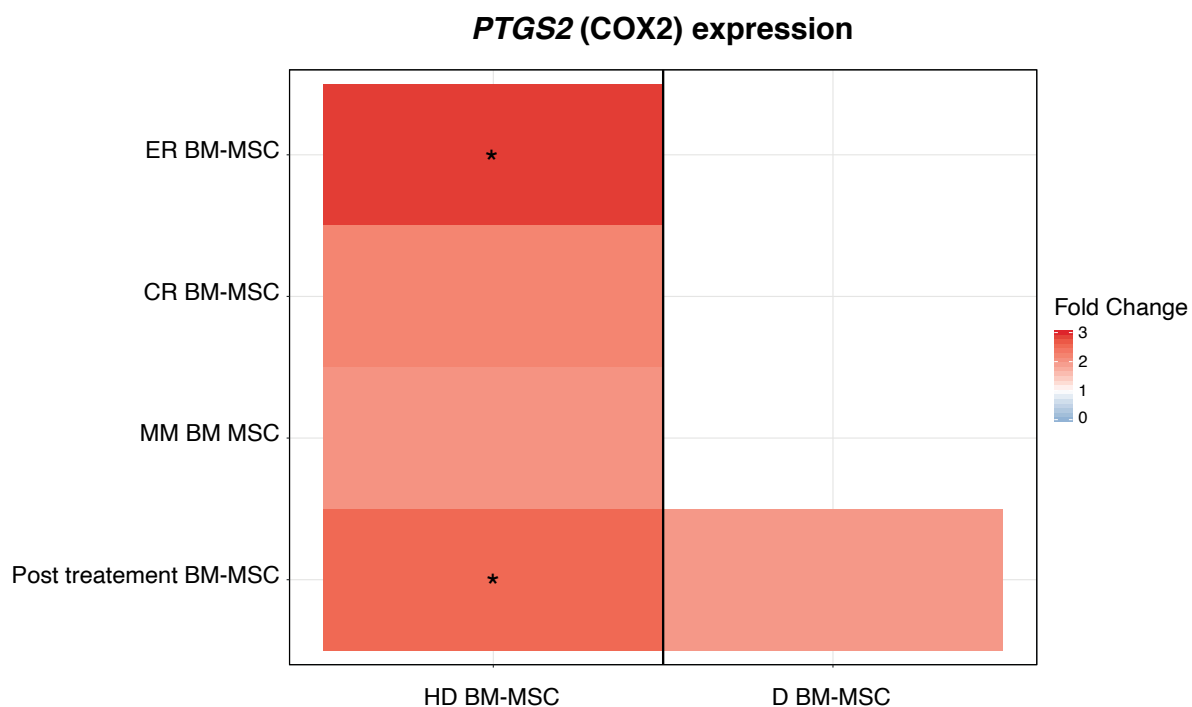


Figure 10: Heatmap d'expression de COX2 par les MSC

Heatmap représentant la différence d'expression entre les MSC de gauche (en ligne) par rapport aux MSC du bas (en colonne). Les rémissions (CR) et tous les myélomes (D+CR+ER) MM BM-MSC surexpriment COX2 par rapport aux donneurs sains (HD) BM-MSC de façon non significative. Les post traitement et rechutes (ER) BM-MSC surexpriment COX2 par rapport aux HD BM-MSC de façon significative (* = p-valeur ajustée < 0,05). Les post traitement BM-MSC surexpriment COX2 par rapport aux D BM-MSC de façon non significative. On n'observe pas de différence d'expression de COX2 entre HD et D BM-MSC.

Lorsque l'on regarde les différences d'expression entre **HD** BM-MSC et la totalité des **MM** BM-MSC, on retrouve une surexpression de COX2 par les **MM** BM-MSC, mais avec une p-valeur ajustée non significative. Cette non significativité est causée par les **D** BM-MSC puisque dans les **MM** BM-MSC on retrouve les **D** BM-MSC et les **post traitement** BM-MSC. En effet, on note une surexpression significative par les **MM** BM-MSC par rapport aux **HD** BM-MSC, alors qu'aucune différence n'est retrouvée entre **D** BM-MSC et **HD** BM-MSC. Ces analyses indiquent un changement des MSC suite au traitement, avec une surexpression de COX2 par les **MM** BM-MSC, pouvant favoriser l'immunosuppression des LT. Il serait donc intéressant de regarder plus en détail l'expression de COX2 et la libération de PGE2 par les **MM** BM-MSC en co-culture avec des LT, pour en effet bloquer l'expression de COX2 par les MSC et permettre de restaurer l'immunité dans le cadre du MM.

C. Lésions osseuses dans le Myélome

Suite au traitement, les MSC sont donc bien différentes des MSC de diagnostic mais ne retrouvent pour autant pas leur phénotype de MSC saines, ce qui pourrait appuyer le fait que le patient rechute toujours, même après l'autogreffe. En ce qui concerne les SRE (skeletal-related events), qui rapportent des lésions osseuses typiques que l'on retrouve chez les patients atteints de MM, elles sont fréquemment retrouvées au diagnostic de la maladie mais aussi dans la première année qui suit le traitement du MM²⁴³. En effet, il semblerait que les lésions déjà présentes ne guérissent pas malgré la rémission, mais qu'aucune nouvelle lésion ne se forme. A la rechute, de nouvelles lésions apparaissent. Notre analyse transcriptomique montre que même après un traitement intensif, les MSC ne retrouvent pas leur capacité de différenciation en OB, et qu'associé à cela les patients ne guérissent finalement pas de leur atteinte osseuse. Nos résultats sont finalement en adéquation avec les analyses cliniques. L'utilisation des biphosphonates, comme l'acide zolédronique et le dénozumab, a amélioré le traitement des patients en allongeant leur durée de vie, mais ne conduit pas à l'éradication totale de la tumeur^{59,60,244}. En effet, ces traitements permettent de diminuer la lyse osseuse mais n'agissent pas directement sur les OB. Il serait intéressant de cibler directement la MSC en favorisant sa différenciation vers un phénotype ostéoblastique, à condition d'être certain que les OB n'induisent pas la prolifération des PC malins.

II. L'inhibition de TLR4 dans le microenvironnement médullaire altère la croissance des plasmocytes malins

De nombreuses études se sont focalisées sur l'étude du dialogue entre MSC et cellules tumorales aussi bien dans les cancers solides¹⁹³ que dans les hémopathies¹⁹⁸⁻²⁰⁰. Dans le MM, cet effet est expliqué notamment *via* des facteurs sécrétés^{201,203,206}, en favorisant l'apoptose²⁰⁸, grâce à des exosomes²⁰⁹, par l'expression de protéines de la matrice extracellulaire²¹⁰ ou encore par une modulation de l'immunité²¹¹. Dans notre étude, nous nous sommes intéressés au dialogue entre PC malins et MSC et surtout aux changements induits sur la MSC par les PC malins, pour favoriser leur expansion. Nous avons pu démontrer que le contact avec les PC malins induit un changement de phénotype des MSC. Des travaux antérieurs du laboratoire¹¹¹ ainsi que notre étude transcriptomique ont notamment mis en lumière la surexpression du récepteur TLR4 par les **D** BM-MSc par rapport aux **HD** BM-MSc.

A. Investigation de la réponse au TLR4 endogène et exogène

Nous avons montré dans cette deuxième étude l'intérêt pour le PC malin que la MSC surexprime TLR4. En effet, la stimulation exogène de TLR4 *via* son ligand principal le LPS mais aussi *via* Hsp70 entraîne une surexpression de CD54 par la MSC ainsi qu'une production d'IL6.

Hsp70 et les protéines de choc thermique (Hsp pour heat shock protein) ont été décrites comme jouant un rôle dans de nombreux cancers et notamment dans le MM²⁴⁵. Hsp70 est sécrétée par les lignées plasmocytaires et son inhibition a été décrite comme responsable d'une diminution de la viabilité et de la mort par apoptose des PC malins^{246,247}. TLR4 est un récepteur classiquement activé par le LPS mais peut aussi se lier à Hsp70²⁴⁸, ou encore à l'héparane sulfate²⁴⁹. Il serait donc possible que dans le cadre du MM, les PC malins sécrètent Hsp70 qui se fixera alors à TLR4 présent sur les MSC.

Nous avons montré que la stimulation de TLR4 par ses ligands LPS et l'ajout d'Hsp70 exogène entraîne des modifications du phénotype des MM BM-MSc, notamment par une surexpression de CD54 à la surface des MM BM-MSc associée à une sécrétion d'IL6. L'expression de CD54 (ICAM1 (Intercellular adhesion molecule 1)) par les MSC n'a pas été clairement décrite dans le MM, il a été suggéré dans une revue que le contact entre la MSC et le PC malin *via* ICAM1 et LFA1 (Lymphocyte function-associated antigen 1) respectivement, induit une activation de la voie NFκB dans la MSC qui entraîne la sécrétion entre autre d'IL6²⁵⁰.

Dans le cadre du MM, ICAM1 a surtout été décrite comme exprimée par les PC malins et une étude montre son expression dans des lignées de cellules stromales mises en co-culture avec des lignées de MM²⁵¹. Par ailleurs, André *et al* montrent que ICAM1 est sous exprimée par les MM BM-MSC dans un contexte pro-inflammatoire²⁵². Notre étude vient donc appuyer cette hypothèse que les MM BM-MSC surexpriment ICAM1 pour permettre leur adhésion aux PC malins. Lorsque l'on regarde l'analyse transcriptomique, ICAM1 n'est pas retrouvé significativement différenciellement exprimé entre **MM** et **HD** BM-MSC. Il faut donc qu'il y ait une stimulation préalable de TLR4 pour qu'il soit surexprimé par les MM BM-MSC. Il serait intéressant de regarder plus en détail le rôle de CD54 dans les MM BM-MSC en présence de PC malins.

La stimulation des MM BM-MSC par Hsp70 exogène entraîne de plus une augmentation de la sécrétion d'IL6. Cette cytokine a été décrite au départ comme essentielle à la maturation terminale des LB²⁵³. En effet, le rôle de l'IL6 dans la croissance, la prolifération et la survie des PC malins a été largement décrit^{254,255}. Dans le cadre du MM, elle est produite par les PC malins eux-mêmes et par le microenvironnement dont les MSC et empêche la mort par apoptose des PC malins²⁵⁶. Nous montrons ici que cette surexpression d'IL6 est principalement causée par la stimulation de TLR4 sur les MM BM-MSC.

B. Support de la croissance des plasmocytes malins

Par la suite, nous avons voulu comprendre l'impact de cette modification du TLR4 sur les PC malins. Pour cela nous avons réalisé notre étude sur 2 lignées plasmocytaires, une dépendante du stroma (MOLP6) et une autre indépendante du stroma (MM1S). Nous avons montré *in vitro* que l'utilisation d'un inhibiteur de TLR4, le C34, sur des co-cultures de MSC et de lignées de PC malins entraîne une diminution de la prolifération des PC malins seulement en co-culture avec des MM BM-MSC. De plus, cet effet est seulement présent sur la lignée stroma dépendante. Il a été décrit que les PC malins sont dépendants du microenvironnement et notamment du stroma pour proliférer^{251,252}. Nos résultats viennent conforter cette hypothèse de la nécessité du stroma pour pouvoir pousser. De plus, nous avons montré que l'inhibition du stroma *via* le TLR4, impacte de manière significative la croissance des PC malins stroma.

Nous avons montré également que l'inhibition de la croissance des MOLP6 par le traitement conventionnel à base de melphalan ou de légalidomide est améliorée par l'utilisation du C34. Nous savons que le melphalan est un agent alkylant dérivé des moutardes azotés qui peut alkylé de façon covalente les bases de l'ADN des PC malins²⁹. Le légalidomide est un immunomodulateur qui agit sur le céréblon et entraîne par le protéasome, la dégradation des protéines ikaros et aiolos surexprimées dans le MM⁴⁵. Ces 2 types de traitements agissent principalement sur la cellule tumorale alors que le C34 se focalise lui sur le microenvironnement. L'inhibition du TLR4 sur les MSC potentialise donc l'effet des thérapies utilisées à l'heure actuelle.

Nous avons voulu confirmer nos données *in vivo* sur un modèle murin du MM. Pour cela, nous avons choisi le modèle Vk*MYC^{257,258}. En effet, il s'agit du modèle le plus relevant du MM utilisé à l'heure actuelle. En effet, dans les modèles murins de MM on retrouve des modèles d'injection sous cutanée, des modèles de xénogreffes ainsi que des modèles transgéniques. Les modèles d'injection sous cutanée ont le désavantage de former des tumeurs solides, on n'y retrouve pas de dialogue entre PC malins et microenvironnement. Dans certains modèles de dissémination du PC, on ne retrouve pas l'impact du PC malin dans la moelle osseuse. Les modèles de souris humanisée avec des PC humains ainsi qu'un microenvironnement humain sont toujours en cours d'élaboration. Différents modèles transgéniques sont étudiés comme le modèle IL6 transgénique, le modèle v-ABL, le modèle XBP1, le modèle c-MAF et le modèle Vk*MYC²⁵⁹. Dans notre étude, le Vk*MYC représente la meilleure des alternatives puisque nous cherchons à comprendre l'impact que pourrait avoir le microenvironnement sur la croissance des PC malins, dans ce cas sur un modèle totalement murin. De plus, il a été montré que TLR4 est aussi exprimé sur des MSC murines²⁶⁰. Finalement, nous avons montré que l'utilisation du traitement par C34 réduit la croissance tumorale au début de la maladie. Par ailleurs, l'utilisation de C34 a un réel effet sur les MSC, puisque l'utilisation de ce traitement entraîne une diminution de la quantité de MSC dans la moelle osseuse des souris. De plus, une étude très récente réalisée sur un modèle de zebrafish appuie notre hypothèse puisqu'ils montrent que l'inhibition de TLR4 sur des MSC avant co-injection avec une lignée plasmocytaire dans ce modèle de zebrafish empêche le développement du MM²⁶¹.

Par ailleurs, nous avons voulu analyser l'impact que pourrait avoir le TLR4 sur le reste du microenvironnement. En effet, TLR4 est un récepteur qui est exprimé par d'autres types cellulaires du microenvironnement comme par exemple les macrophages, les lymphocytes²⁶², ou encore les PC malins¹⁷⁶. Nous avons donc analysé le pourcentage des différentes cellules du système immunitaire dans la moelle osseuse des souris, représenté dans la **Figure 11**.

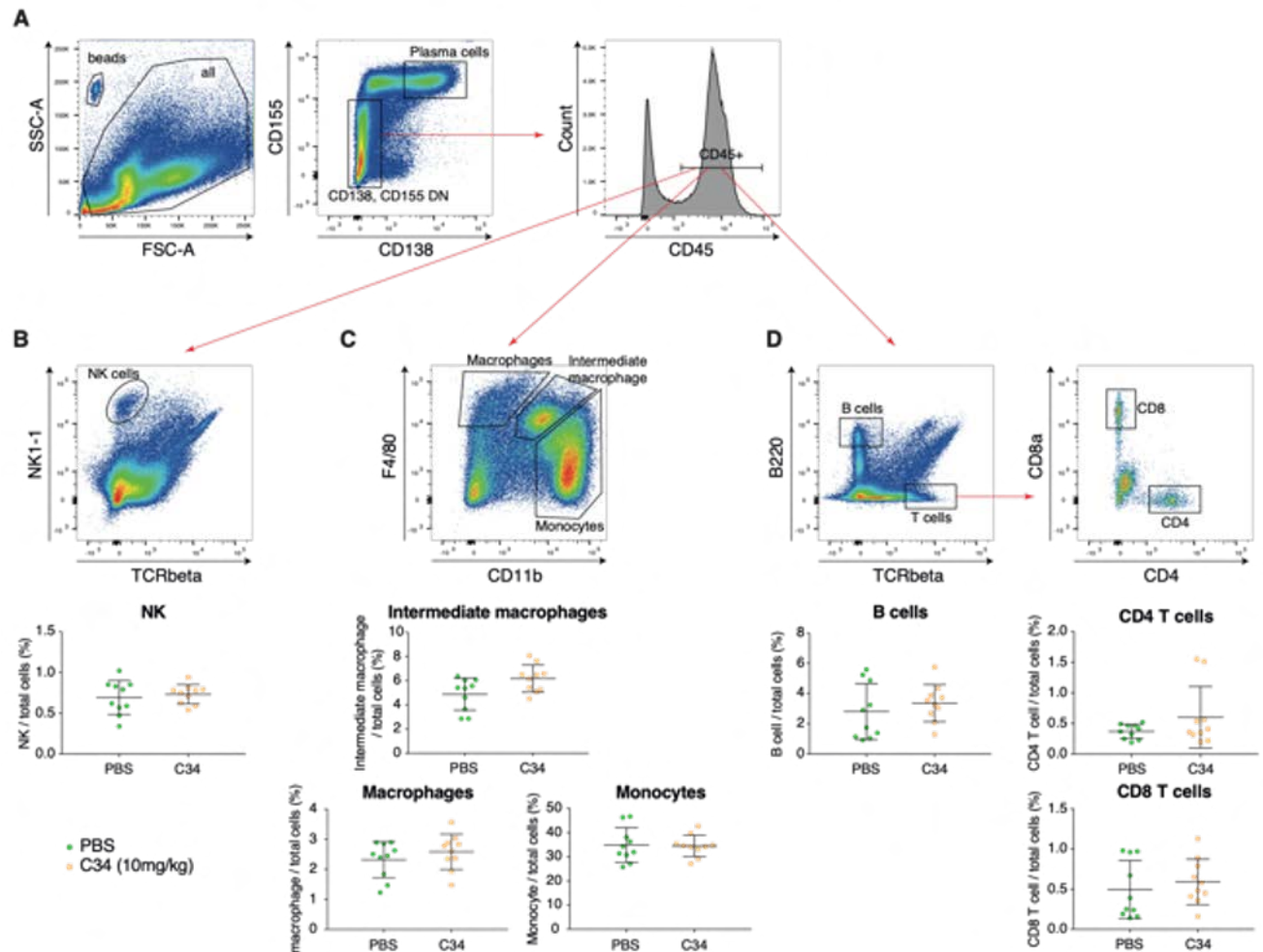


Figure 11: Pourcentage des cellules du microenvironnement dans la moelle des souris atteintes de Myélome

(A) Les cellules du microenvironnement sont prises à partir des cellules non tumorales (CD138, CD155 double négative (DN)) et CD45+. On ne retrouve pas de différences significatives en pourcentage de NK (B), macrophages, macrophages intermédiaires, monocytes (C), en lymphocytes B (B cells), lymphocytes T CD4 (CD4 T cells) et CD8 (CD8 T cells) (D), entre souris traitées ou non avec l'inhibiteur C34.

Nous ne retrouvons pas de différences significatives en terme de pourcentages de cellules du microenvironnement, semblant indiquer que le C34 n'agit que peu sur les autres cellules du microenvironnement.

C. TLR4 comme reflet de la progression de la maladie

Toutes les analyses *in vitro* ont été réalisées sur des MSC provenant de patients au diagnostic de la maladie. L'analyse de l'expression de TLR4 à la surface des MSC provenant de patients en rechute et en rémission du MM nous montre que les MSC de rechute surexpriment TLR4 par rapport aux rémissions. De plus, l'analyse transcriptomique nous montre que par rapport aux **D** BM-MS, les **CR** BM-MS sous expriment TLR4 alors que les **CR** BM-MS le surexpriment. L'expression de TLR4 semble corrélée à l'évolution de la maladie et notamment à la présence des PC malins dans la moelle. L'expression de TLR4 sur les MSC de la moelle pourrait donc être le reflet de l'état de progression de la maladie.

D. Analyse des MSC natives de la moelle osseuse

Nous avons mis en évidence dans notre modèle murin de MM, un lien entre MSC et PC malins ; en effet une corrélation existe entre la quantité de MSC et celle de PC malins dans la moelle de souris porteuses de MM.

Une étude réalisée sur des MSC provenant de donneurs sains ou de patients atteints de MM s'est intéressée à l'impact de la co-culture cellulaire des MSC avec des PC malins. La co-culture de lignées de MM avec des MSC, qu'elles proviennent de donneurs sains ou de patients, influence l'expression de certains gènes. En effet, leur étude montre la présence d'une liste de gènes retrouvés dérégulés causée par l'absence de PC malins dans la culture ainsi qu'une liste de gènes dérégulés exclusivement expliquées par le MM²⁰². Dans cette liste de gènes, on retrouve les voies de signalisation mise en avant dans la première partie de notre étude.

Par ailleurs, nous savons que les MSC présentes dans la moelle osseuse ne possèdent pas les mêmes marqueurs de surfaces que les MSC mises en culture *ex vivo*, elles sont appelées MSC natives^{263,264}. Il serait intéressant au niveau clinique de corréler la présence de ces MSC natives avec la charge tumorale et confirmer les résultats que l'on obtient chez la souris. Malgré tout, la faible quantité de MSC natives dans la moelle osseuse²⁶³ et le peu de connaissances à l'heure actuelle sur le phénotype de ces cellules peuvent être un frein pour réaliser une analyse transcriptomique. Seule une analyse par *single cell* pourrait nous donner un aperçu des MSC natives dans la moelle des patients atteints de MM. De plus, ces données risquent d'être biaisées puisque nous ne pouvons pas évaluer la charge tumorale chez les

patients atteints de MM. En effet, une étude parle d'hétérogénéité spatiale au niveau du site de prélèvement de moelle de patients atteints de MM. Le prélèvement de moelle osseuse ne reflète pas forcément la quantité de PC malins présents dans la totalité de la moelle²⁶⁵. Il serait donc intéressant de corrélérer ces analyses sur un modèle murin, en réalisant une analyse transcriptomique sur des MSC de souris atteintes de MM comparées à des MSC de souris contrôle, prises cette fois-ci sur l'intégralité de la moelle osseuse.

III. Conclusion

Finalement, nos études ont mis en lumière une modification du phénotype des MSC de patients atteints de MM qui, même après le traitement ne retrouvent pas leur phénotype sain, favorisant probablement la réémergence du MM à long terme. L'analyse fonctionnelle a mis en évidence une perturbation de la capacité de différenciation de ces cellules vers un phénotype adipocytaire plutôt qu'ostéoblastique ainsi qu'une perturbation de leur capacité à moduler l'immunité. Notre étude a mis en avant le rôle de TLR4 dans les MSC de patients atteints de MM. La surexpression de TLR4 par les MSC favorise leur dialogue avec les PC malins et supporte la croissance des PC malins. Nous avons montré que le ciblage du microenvironnement *via* le TLR4 a un effet négatif sur la croissance des PC malins, aussi bien *in vitro* que *in vivo*. Nous proposons donc une nouvelle alternative de traitement afin de potentialiser les thérapies actuelles, en ciblant le stroma pro-tumoral du MM.

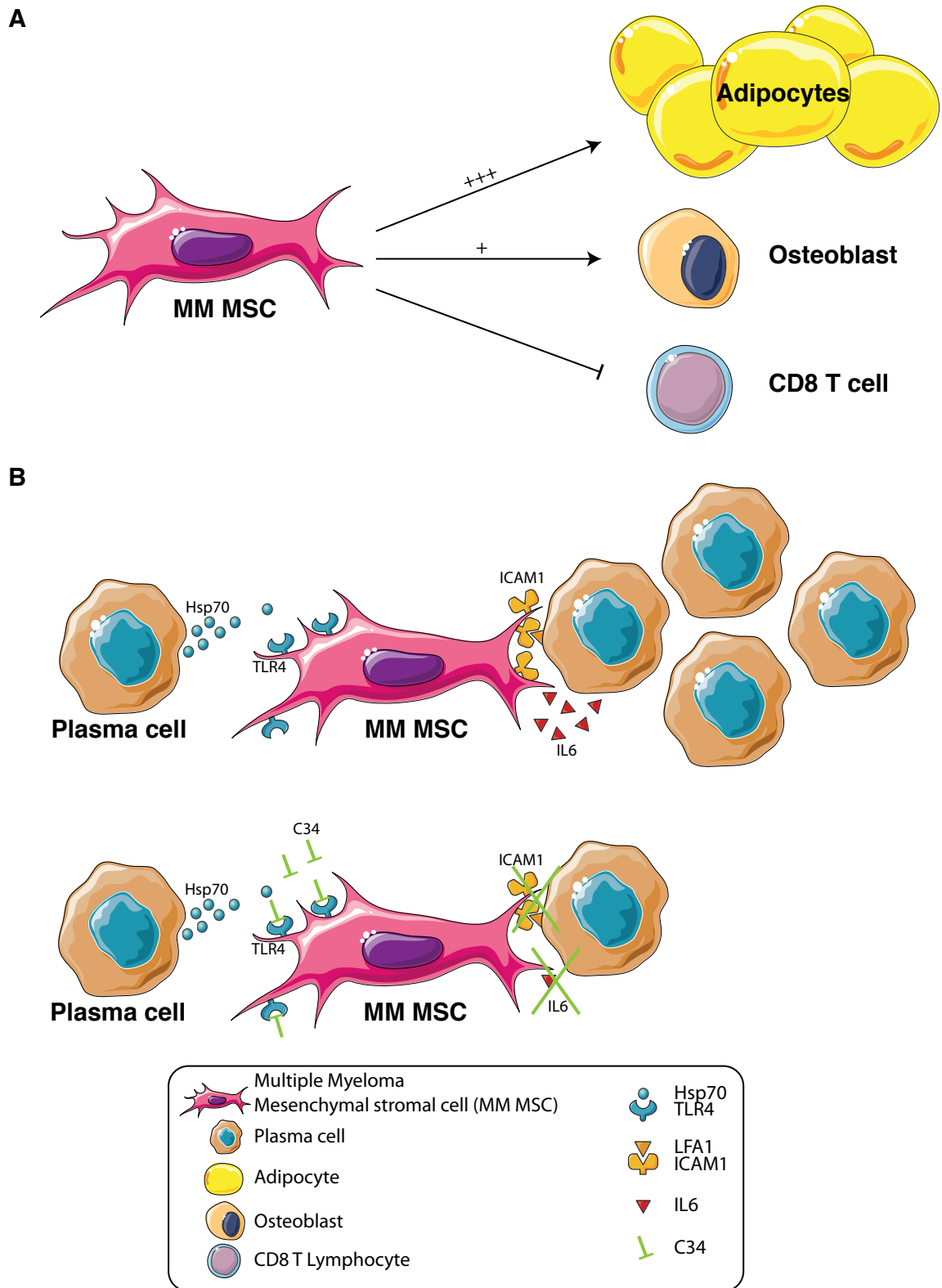


Figure 12: Schéma de conclusion

Conclusion de la première partie : La modification du transcriptome des MSC persiste après le traitement intensif des patients atteints de Myélome (A). Conclusion de la deuxième partie : L'inhibition de TLR4 dans le microenvironnement médullaire altère la croissance des PC malins (B).

ANNEXES

I. Article 3 : Article en cours de révision (Immunity) en co-auteur

Weulersse M., Asrir A., Pichler A C., Lemaitre L., Braun M., Carrié N., Joubert M V., Le Moine M., Do Souto L., Gaud G., Das I., Brauns E., Scarlata C M., Morandi E., Sundarrajan A., Cuisinier M., Buisson L., Maheo S., Kassem S., Agesta A., Pérès M., Verhoeyen E., Martinez A., Mazière J., Dupré L., Gossye T., Pancaldi V., Guillerey C., Ayyoub M., Dejean A., Saoudi A., Goriely S., Avet-Loiseau H., Bald T., Smyth M J. and Martinet.

Eomes-dependent CD226 loss alters TCR responsiveness and restrains CD8+ T lymphocyte anti-tumor functions

Eomes-dependent CD226 loss alters TCR responsiveness and restrains CD8⁺ T lymphocyte anti-tumor functions

Marianne Weulersse^{1,10}, Assia Asrir^{1,10}, Andrea C. Pichler^{1,10}, Lea Lemaitre¹, Matthias Braun², Nadège Carrié¹, Marie-Véronique Joubert^{1,3}, Marie Le Moine⁴, Laura Do Souto^{1,3}, Guillaume Gaud⁵, Indrajit Das², Elisa Brauns⁴, Clara M. Scarlata^{1,3}, Elena Morandi⁵, Ashmitha Sundarrajan², Marine Cuisinier^{1,3}, Laure Buisson^{1,3}, Sabrina Maheo^{1,3}, Sahar Kassem¹, Arantxa Agesta⁵, Michaël Pérès^{1,3}, Els Verhoeyen^{6,7}, Alejandra Martinez^{1,3}, Julien Mazière^{1,3}, Loïc Dupré^{5,8}, Thomas Gossye¹, Vera Pancaldi^{1,9}, Camille Guillerey², Maha Ayyoub^{1,3}, Anne Dejean⁵, Abdelhadi Saoudi⁵, Stanislas Goriely⁴, Hervé Avet-Loiseau^{1,3}, Tobias Bald², Mark J. Smyth² and Ludovic Martinet^{1,3*}.

¹Cancer Research Center of Toulouse (CRCT), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) UMR 1037, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université Paul Sabatier (UPS), Toulouse, France.

²QIMR Berghofer Medical Research Institute, Herston, Queensland, Australia.

³Institut Universitaire du Cancer, CHU Toulouse, Toulouse France.

⁴Université Libre de Bruxelles, Institute for Medical Immunology (IMI), Gosselies, 6041 Belgium and UCR-I (ULB Centre for Research in Immunology).

⁵Centre de physiopathologie de Toulouse Purpan (CPTP), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) UMR 1043, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR 5282, Université Paul Sabatier (UPS), Toulouse, France.

⁶Université Côte d'Azur, INSERM, C3M, Nice, France.

⁷CIRI, Université de Lyon, INSERM U1111, ENS de Lyon, CNRS UMR 5308, Lyon, France.

⁸Ludwig Boltzmann Institute for Rare and Undiagnosed Diseases (LBI-RUD), Vienna, Austria.

⁹Barcelona Supercomputing Center, Barcelona, Spain.

¹⁰These authors contributed equally and were listed randomly.

*Lead contact

Full correspondence

Lead contact: Dr Ludovic Martinet, INSERM UMR 1037, Cancer Research Center of Toulouse, 2 av Hubert Curien, 31037 Toulouse, France. E-mail address: ludovic.martinet@inserm.fr; Phone: +33-5-8274-1757

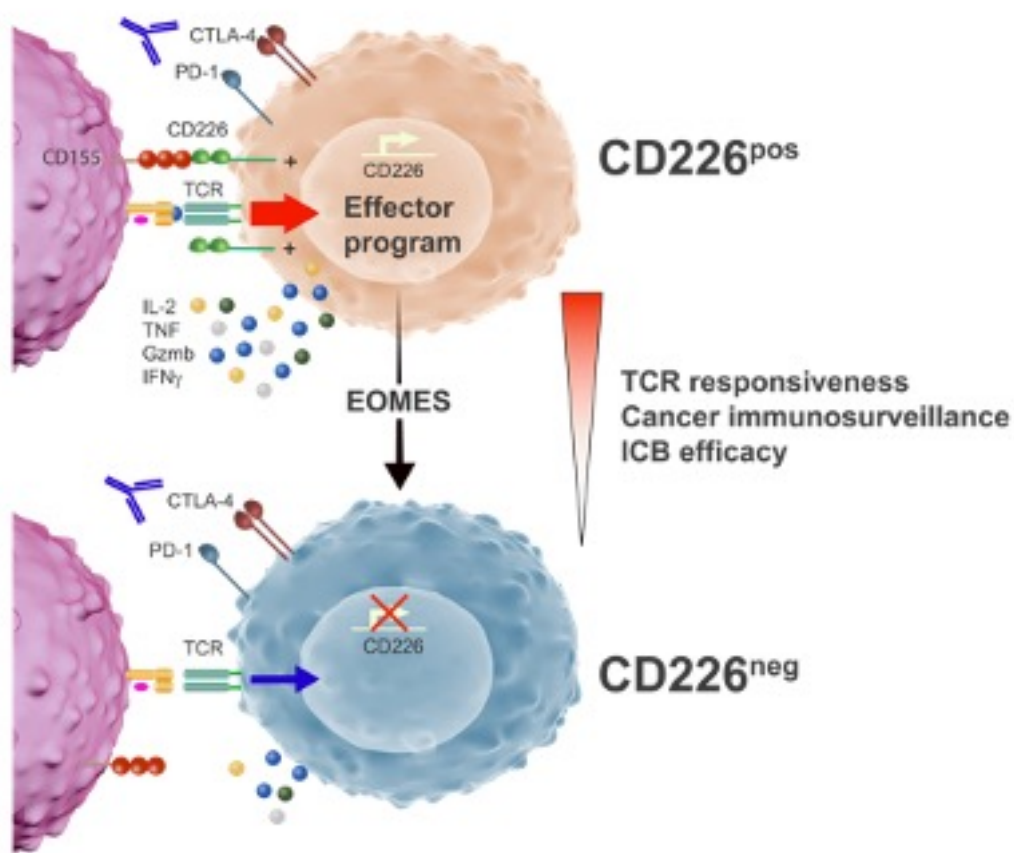
8 Figures, 8 Supplementary Figures, 98 References.

Key words: CD8⁺ T lymphocytes, TCR signaling, Co-stimulation, CD226 (DNAM-1), tumor immune escape, T cell exhaustion, Immunotherapy, immune checkpoint blockade.

IN BRIEF

Through complementary approaches, involving cancer patients' samples and relevant mouse tumor models, this study reveals that the Eomes-dependent loss of the activating receptor CD226 (DNAM-1) represents a critical determinant of tumor infiltrating CD8⁺ T cell dysfunction potentially affecting immune checkpoint blockade efficacy.

GRAPHICAL ABSTRACT



HIGHLIGHTS

- The absence of CD226 impedes TCR signaling and effector program of CD8⁺ T cells.
- Dysfunctional CD226-negative CD8⁺ T cells accumulate in tumors.
- Tumor-induced CD226-loss depends on Eomes transcription factor.
- CD226 loss limits CD8⁺ T cell response to immune checkpoint blockade or anti-CD137 agonists.

ABSTRACT

Although anti-PD-1 and anti-CTLA-4 based immune checkpoint blockade (ICB) has represented a turning point in cancer care, clinical responses are observed only in a fraction of cancer patients. Most research focuses on the identification of additional inhibitory receptors restraining the anti-tumor functions of CD8⁺ T cells. By contrast, herein, we reveal that loss of the activating receptor CD226 (DNAM-1) is a critical mechanism altering LFA-1 functions and CD8⁺ T cell responsiveness to TCR stimulation. Combined analysis of cancer patients' samples and preclinical mouse models showed that dysfunctional CD226-negative CD8⁺ T cells progressively accumulate in the tumor microenvironment through a mechanism involving the T-box transcription factor Eomesodermin (EOMES). More importantly, the absence of CD226 affected tumor infiltrating lymphocytes response to ICB or anti-CD137 (4-1BB) agonists. Altogether, our results identify CD226 loss as a critical immune escape mechanism restraining CD8⁺ T cell function and potentially affecting the therapeutic efficacy of cancer immunotherapy.

INTRODUCTION

CD8⁺ T lymphocytes play a critical role in limiting tumor progression and represent the most promising therapeutic host immune target against cancer (Schumacher and Schreiber, 2015). CD8⁺ T cell activation is mainly triggered by TCR recognition of MHC-I-peptide complexes but additional signals provided through a wide array of stimulatory and inhibitory molecules critically influence CD8⁺ T cell functions (Chen and Flies, 2013). In the past decade, an extensive number of studies demonstrated the key role played by inhibitory receptors such as PD-1 (CD279) and CTLA-4 (CD152) in driving a state of CD8⁺ T cell hypo-responsiveness called T cell exhaustion, frequently observed in chronic viral infections and cancer (Wherry and Kurachi, 2015). Some previous striking clinical results achieved with monoclonal antibodies (mAbs) blocking these receptors in metastatic melanoma illustrated the therapeutic promise of targeting inhibitory receptors to restore cytotoxic lymphocyte anti-tumor reactivity (Robert et al., 2011; Topalian et al., 2012). Still, clinical responses are observed only in a fraction of cancer patients treated with Immune checkpoint blockers (ICB). While most of the experimental strategies actually focus on the identification of additional inhibitory receptors restraining anti-tumor reactivity of CD8⁺ T cells, the importance of activating receptors with regards to anti-tumor CD8⁺ T cell functions and ICB efficacy remains to be better understood.

CD226 (DNAM-1, PTA-1, TLIISA1) is an adhesion molecule initially described for its ability to stimulate NK cell- and CD8⁺ T cell-mediated cytotoxicity (Martinet and Smyth, 2015; Shibuya et al., 1996). Its ligands, the nectin and nectin-like receptors CD112 and CD155, are often expressed on cancer cells as a consequence of cellular stress (Chan et al., 2014b) and CD226 deficiency was shown to reduce tumor immunosurveillance in a wide number of solid and lymphoid tumor mouse models (Chan et al., 2014a; Gilfillan et al., 2008; Guillerey et al., 2015; Iguchi-Manaka et al., 2008; Tahara-Hanaoka et al., 2006). TIGIT (T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains) and CD96, two inhibitory receptors that compete with CD226 for the same ligands, were recently identified as promising immunotherapeutic targets to restore immune reactivity against tumors (Blake et al., 2016a; Blake et al., 2016b; Chan et al., 2014a; Guillerey et al., 2018; Kurtulus et al., 2015) highlighting the importance of the CD226 axis in the regulation of anti-tumor immune responses. The CD226 pathway may also represent an important determinant of ICB efficacy as evidenced by a recent study demonstrating that the

PD-1/PD-L1 pathway is a negative regulator of CD226 signaling and that PD-1 and GITR (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-related protein) dual blockade fail to promote mouse tumor regression in the absence of CD226 (Wang et al., 2018).

Despite the critical role of CD226 in the T cell-dependent control of malignancies, the underlying mechanisms remain to be further addressed. Indeed, besides the ability of CD226 to regulate target cell adhesion and killing, this molecule may influence additional aspects of T cell biology such as terminal maturation of CD8⁺ thymocytes (Danisch et al., 2013; Qiu et al., 2010), T helper cell differentiation (Gaud et al., 2018; Lozano et al., 2012; Lozano et al., 2013; Shibuya et al., 2003) and Treg suppressive functions (Koyama et al., 2013). In addition, although recent evidence suggests that CD226 contains an intracellular signaling domain that closely resembles CD28 (Zhang et al., 2015), the importance of this molecule in TCR activation remains poorly understood to date. In this study, we combined complementary sets of experiments involving human samples and mouse tumor models to demonstrate that the tumor microenvironment promotes the accumulation of a subset of CD8⁺ T cells that lose CD226 through an Eomes-dependent mechanism, which results in severely impaired effector functions. More importantly, we found that CD226-negative tumor infiltrating lymphocytes have altered TCR signaling, reduced anti-tumor functions and fail to respond to anti-PD-1 immunotherapy. Altogether, our results reveal a yet unappreciated mechanism, whereby the loss of the activating receptor CD226 restrains CD8⁺ T cell functions and ICB efficacy.

RESULTS

The absence of CD226 expression identifies hypo-reactive human CD8⁺ T cells.

Despite the importance of the CD226 pathway in cancer immunosurveillance and its emerging role in autoimmune disorders and infections (Martinet et al., 2015; Martinet and Smyth, 2015), little information was available regarding the expression of this receptor on human CD8⁺ T cells. Interestingly, we observed in the peripheral blood of healthy donors (HD) the presence of two distinct CD8⁺ T cell populations based on CD226 expression (**Figure 1A**). CD226⁻ and CD226⁺ CD8⁺ T cell populations expressed comparable levels of most classical CD8⁺ T cell markers (**Figure S1A**) and had similar TCR V beta repertoires (**Figure 1B**). These subsets were also similarly present across the different CD8⁺ T cell maturation stages including naïve (Tn, CD62L⁺CD45RA⁺); central memory (Tcm, CD62L⁺CD45RA⁻); effector memory (Tem, CD62L⁻CD45RA⁻); terminal effector memory (Temra, CD62L⁻CD45RA⁺) (**Figure 1C**) and their frequency was independent of the age and gender of the different donors analyzed (**Figure S1B**).

The contrasting expression of CD226 on CD8⁺ T cells with identical phenotype and maturation questioned about the potential functions of these two subsets. To exclude any analytic bias inherent to mixed CD8⁺ T maturation stages, we first separated CD226⁻ and CD226⁺ CD8⁺ Tn, Tcm and Tem subsets by fluorescence-activated cell sorting. Analysis of TCR-induced proliferation using anti-CD2/CD3/CD28 microbeads revealed that CD226⁻ CD8⁺ T cells had strikingly lower proliferation capacities than CD226⁺ CD8⁺ T cells regardless of the differentiation stage (**Figure 1D**). Lower CD226⁻ CD8⁺ T cell proliferation was confirmed in unsorted CD8⁺ T cell cultures stimulated with more physiological stimuli such as allogeneic monocyte-derived dendritic cells, CMVpp65 peptide pools or TCR-MHCI crosslinking reagent CytoStim (**Figure 1E and Figure S1C**). CD226⁻ CD8⁺ Tems also produced a considerably lower amount of IL-2, IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, CCL5 and MIP-1 α than CD226⁺ CD8⁺ Tems upon TCR stimulation (**Figure 1F and Figure S1D**). Similar results were obtained when we assessed the intracellular production of IFN- γ , TNF- α , or the surface exposure of the CD107a degranulation marker by CD226⁻ and CD226⁺ CD8⁺ T cells upon stimulation with diverse TCR stimuli including CytoStim, anti-CD2/CD3/CD28 microbeads or Fc γ R⁺ P815 cell line coated with increasing concentrations of anti-CD3 mAbs (**Figure 1G and Figure S1E-F**). By contrast, CD226⁻ and CD226⁺ CD8⁺ T cells had comparable cytokine production upon stimulation with

PMA/ionomycin (**Figure S1G-H**) suggesting that both CD226⁻ and CD226⁺ CD8⁺ T cells have similar intrinsic functional capacities. Altogether, these results demonstrate that CD8⁺ CD226⁻ T cells display the hallmarks of functional hypo-responsiveness, including defective proliferation, cytokine secretion and degranulation in response to TCR stimulation.

These data suggested that CD8⁺ T cells lacking CD226 may have an altered TCR signaling. To test this hypothesis, we first monitored the influx of intracellular Ca²⁺ in CD226⁻ and CD226⁺ CD8⁺ T cells, a key event associated with the TCR signaling cascade. We observed that Ca²⁺ influx triggered by anti-CD3 mAb stimulation was reduced in CD226⁻ CD8⁺ T cells as compared to CD226⁺ CD8⁺ T cells (**Figure 1H**). In concert, we found that proteins implicated in proximal TCR signaling such as SLP76, ZAP70 and LAT were less phosphorylated in purified CD226⁻ CD8⁺ T cells as compared to CD226⁺ CD8⁺ T cells upon anti-CD3 mAb stimulation (**Figure 1I-J and Figure S1I-J**). Lower phosphorylation of key TCR downstream signaling proteins, such as mitogen-activated protein kinases ERK1/2 and the PI3K target Akt, was also observed after anti-CD3 mAb stimulation in sorted CD226⁻ CD8⁺ T cells as compared to CD226⁺ CD8⁺ T cells (**Figure 1K**). Altogether, these results reveal that the lack of CD226 expression at the surface of CD8⁺ T cells from healthy individuals identifies a subset of hypo-responsive CD8⁺ T cells with reduced TCR signaling.

The absence of CD226 alters the TCR-induced CD8⁺ T cell transcriptional program.

To better understand the molecular differences between CD226⁻ and CD226⁺ CD8⁺ T cells, we performed a global transcriptional analysis of purified CD226⁺ and CD226⁻ CD8⁺ T cells before and after TCR activation by RNA-seq. To our surprise, resting CD226⁻ and CD226⁺ CD8⁺ T cells displayed relatively similar gene expression profiles with only 76 genes differentially expressed (*fold change* >2; *Adj p* <0.01) (**Figure 2A-D**). Of note, *CD226* was the most differentially expressed gene between CD226⁻ and CD226⁺ CD8⁺ T cells (*fold change* = 55 *Adj p* = 4.5x10⁻⁵⁰) (**Figure 2C**). Similar results were obtained comparing transcriptomic profiles of resting Tn, Tcm and Temra CD226⁻ and CD226⁺ CD8⁺ T cell subsets (**Figure S2A-B**) thus indicating that CD226 absence on CD8⁺ T cells was not only due to ligand-induced protein internalization as shown by *Braun et al.* (Braun et al.), but rather resulted from transcriptional regulation of this gene. Although functional analysis suggested that CD226⁻ CD8⁺ T cells were

hypo-responsive to TCR stimulation, our global transcriptional analysis revealed that both CD226⁻ and CD226⁺ CD8⁺ T cells displayed signs of activation upon anti-CD2/CD3/CD28 stimulation with respectively 5850 and 6577 genes differentially expressed between the resting and activation states (*fold change* > 2 ; *Adj p* <0.01) (**Figure 2A-B**). Still, non-hierarchical clustering and principal component analysis (PCA) also revealed critical differences between anti-CD2/CD3/CD28 activated CD226⁺ and CD226⁻ CD8⁺ T cells with 1209 up-regulated and 880 down-regulated genes (*fold change* > 2 ; *Adj p* <0.01) between both subsets (**Figure 2 A-D and Figure S2C**). In line with our previous findings (**Figure 1**), GSEA and Go term analysis confirmed that activated CD226⁺ CD8⁺ T cell specific genes were enriched in gene signatures related to cell cycle, protein synthesis, TCR activation, T_{H1} differentiation and IL-2/IL-15 signaling (**Figure 2E-F and Figure S2D**). Conversely, activated CD226⁻ CD8⁺ T cell specific genes were enriched in gene signatures related to resting T cells, regulatory T cells and TGF- β signaling (**Figure 2E-F and Figure S2D**) thus validating at the transcriptional level the functional advantage of CD226⁺ over CD226⁻ CD8⁺ T cells upon TCR stimulation.

Mechanisms underlying CD226⁻ CD8⁺ T cell hypo-responsiveness.

Although CD226 expression discriminates two subsets of CD8⁺ T cells with strongly diverging TCR responsiveness, it is not certain that CD226 expression alone drives such divergence. To address this question, we transduced purified CD226⁻ and CD226⁺ CD8⁺ T cells with GFP lentiviral vectors encoding CD226 or not and analyzed their effector functions in response to TCR stimulation (**Figure 3A-B and Figure S3A-B**). Consistent with our previous results, we found that untransduced CD226⁻ CD8⁺ T cells (GFP⁻ cells), or CD226⁻ CD8⁺ T cells transduced with a GFP control vector, had a reduced ability to proliferate, to produce pro-inflammatory cytokines such as IFN- γ , TNF- α and poorly expressed surface CD107a upon TCR stimulation as compared to CD226⁺ CD8⁺ T cells (**Figure 3A-B and Figure S3A-B**). By contrast, CD226⁻ CD8⁺ T cells that ectopically expressed CD226 (GFP⁺ cells) underwent several cell divisions and expressed significantly higher levels of IFN- γ , TNF- α and surface CD107a than untransduced cells or cells transduced with the GFP control vector (**Figure 3A-B and Figure S3A-B**). These results demonstrate that CD226 re-expression is sufficient to restore TCR-driven activation in the CD226⁻ CD8⁺ T cell subset therefore indicating the pivotal and intrinsic role of CD226 in controlling T cell responsiveness.

We next wanted to gain insight into the molecular mechanisms underlying CD226⁻ CD8⁺ T cell functional defects. Given the importance of LFA-1 in T cell adhesion and TCR signaling (Bachmann et al., 1997; Dustin and Springer, 1989) and the tight link between this integrin and CD226 signaling (Shibuya et al., 1999; Shibuya et al., 2003), we hypothesized that CD226 absence might directly impact LFA-1 functions. On resting T cells, LFA-1 is maintained in an inactive bent conformation, while upon T cell activation its affinity and binding to ICAM-1 are increased via an extension and opening of the head motif (Comrie et al., 2015). We compared LFA-1 activation on CD226⁻ and CD226⁺ CD8⁺ T cells using conformation specific Abs. CD226⁺ and CD226⁻ CD8⁺ T cells expressed comparable levels of total LFA-1 regardless of their activation state (**Figure S3C-D**). By contrast, CD226⁺ CD8⁺ T cells expressed significantly higher levels of “extended open” high affinity LFA-1 than their CD226⁻ counterparts both in steady state conditions and upon TCR stimulation (**Figure 3C and Figure S3C-D**). These results were further confirmed by confocal microscopy imaging that also revealed important co-localization between CD226 and high affinity LFA-1 at the cellular interface between anti-CD3 mAb activated CD8⁺ T cells (**Figure 3D-E**). Altogether these results strongly suggested that the lack of CD226 might limit LFA-1 activation into its high affinity “open extended” conformation. To confirm this hypothesis, we analyzed the TCR induced activation of LFA-1 by CD226⁻ CD8⁺ T cells transduced with enforced CD226 expression (**Figure 3F**). CD226⁻ CD8⁺ T cells transduced with the CD226-encoding lentiviral vector had a significantly higher expression of open conformation LFA-1 as compared to CD226⁻ CD8⁺ T cells transduced with the GFP-encoding control vector (**Figure 3F**). Then, to assess the importance of LFA-1 in mediating the CD226-dependent T cell activation, we analyzed CD226⁺ and CD226⁻ CD8⁺ T cell functions in the presence of blocking antibodies or pharmacological inhibitors of LFA-1 (**Figure 3G and Figure S3F**). Consistent with the well documented role of LFA-1-ICAM-1 interactions, occurring within homotypic T cell clusters, in T cell activation (Bianchi et al., 2000; Perez et al., 2003; Sabatos et al., 2008; Zumwalde et al., 2013), we found that inhibiting LFA-1 significantly decreased the proliferation and the production of IFN- γ and TNF- α by CD226⁺ CD8⁺ T cells, thus recapitulating the state of hypo-responsiveness of CD226⁻ CD8⁺ T cells (**Figure 3G and Figure S3E-F**). Collectively this set of data implies that CD226 expression sets the threshold for the

conformational activation of LFA-1 and suggests that the hypo-responsiveness of CD226⁻ CD8⁺ T cells might be consecutive to a weakened LFA-1 activation.

By contrast, CD226 negative regulators CD96, TIGIT or PVRIG (CD112R) (Chan et al., 2014a; Johnston et al., 2014; Zhu et al., 2016) may not directly account for CD226⁻ CD8⁺ T cell hypo-responsiveness. First, CD96 or TIGIT blockade did not restore TCR-induced proliferation nor IFN- γ secretion by CD226⁻ CD8⁺ T cells (**Figure S3G-H**) and PVRIG transcripts were almost undetectable on purified CD226⁺ and CD226⁻ CD8⁺ T cells (**Figure S3I**). Second, CD226⁺ CD8⁺ T cells had significantly higher proliferation than their CD226⁻ counterparts upon anti-CD2/CD3/CD28 microbead stimulation regardless of TIGIT expression (**Figure S3J**). Finally, their common ligands CD112 and CD155 were hardly detectable at the mRNA level in our assays only containing purified CD8⁺ T cells (**Figure S3I**) and CD112 and CD155 *in vitro* blockade did not reduce CD226⁺ CD8⁺ T cell functions induced by TCR stimulation (**Figure S3G-H**). This also implies that CD226 may act independently of its ligands as suggested by pioneer studies from Shibuya et al. showing that CD226 was phosphorylated upon TCR or LFA-1 engagement (Shibuya et al., 1999; Shibuya et al., 2003).

CD226 absence identifies dysfunctional human CD8⁺ tumor infiltrating lymphocytes.

We next reasoned that the balance between CD226⁻ and CD226⁺ CD8⁺ T cell subsets might be altered in the context of tumors usually associated with reduced CD8⁺ T cell responses. We first compared CD226 expression on bone marrow (BM) CD8⁺ isolated from HD and patients newly diagnosed with multiple myeloma (MM; IFM 2009 (Attal et al., 2017)), a frequent yet incurable hematological malignancy (**Figure S4A**). We found that the percentage of BM CD8⁺ T cells lacking CD226 expression was significantly increased in MM patients as compared to HD (**Figure 4A and Figure S4B-C**). In MM patients, CD226⁻ percentages were also significantly higher among BM CD8⁺ tumor infiltrating lymphocytes (TILs) as compared to PBMCs (**Figure 4B**). Of note, we did not observe any correlation between the age, the gender and the percentages of BM infiltrating CD226⁻ CD8⁺ T cells among MM patients and HD (**Figure S4D**). By contrast, the percentage of CD226 expressing CD8⁺ T cells significantly correlated with myeloma CD8⁺ T cell infiltration (**Figure S4E**) and *CD226* gene expression was strongly associated with the expression of cytotoxic lymphocyte functional genes including *CD2*, *CD3E*,

CD3D, *TBX21*, *CD8B*, *PRF1*, *GZMA*, and *GZMB* in MM patient's samples (**Figure S4F**). Most importantly and confirming our above data, functional analysis of myeloma infiltrating CD8⁺ T cells upon *in vitro* re-stimulation with anti-CD2/CD3/CD28 microbeads confirmed that CD226⁻ CD8⁺ T cells had significantly lower TCR-induced proliferation, IFN- γ and TNF- α production and degranulation than CD226⁺ CD8⁺ T cells (**Figure 4C-D and Figure S4G-H**). Of note, CD226⁺ TILs produced significantly higher cytokine levels than their CD226⁻ counterparts both in the TIGIT⁻ and TIGIT⁺ fractions, again excluding the role for this negative regulator of CD226 in the hypo-responsiveness of CD226⁻ TILs (**Figure S4I**). Interestingly, for patients with a detectable population of NY-ESO-1 specific TILs, the frequency of CD226⁻ cells was significantly higher among NY-ESO-1 specific TILs than among polyclonal TILs (**Figure 4E and Figure S4J**). The absence of CD226 expression was again associated with reduced cytokine production by CD8⁺ T cells upon stimulation with NY-ESO-1 peptide (**Figure 4F**). These data suggested a relationship between CD226 loss and tumor antigen-specific CD8⁺ T cell dysfunction in the tumor microenvironment. Remarkably, accumulation of CD226⁻ CD8⁺ T cells with reduced effector functions was not only observed in MM, but also represented a significant fraction of TILs isolated from other cancer types including Lung adenocarcinoma (LUAD), breast adenocarcinoma (BRCA) and ovarian carcinoma (OC), thus broadening the biological relevance of our findings (**Figure 4G and Figure S4K**). In these tumors, CD226⁻ percentages were also significantly higher among TILs than CD8⁺ T cells isolated from healthy distant tissues or PBMCs (**Figure 4G**). In BRCA cohorts from the TCGA data base, CD226 expression was also associated with significantly decreased Progression-free interval (PFI) and overall survival (OS) (**Figure 4I and Figure S4L**). A high CD226 expression was associated with significantly improved OS for a number of other common solid cancer, still not all, including Cervical Squamous Cell Carcinoma and Endocervical Adenocarcinoma (CESC), Head-Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSC), Liver Hepatocellular Carcinoma (LIHC), LUAD and Uterine Corpus Endometrial Carcinoma (UCEC) (**Figure S4M**). Altogether, these results demonstrate that the absence of CD226 expression, (1) identifies TILs with severely impaired functions across diverse malignancies, (2) could impact patient clinical outcome.

Tumor microenvironment drives the differentiation of dysfunctional CD226⁻ CD8⁺ T cells.

To understand the link between tumor progression, CD226 loss and CD8⁺ T cell dysfunction,

we explored CD226 expression in well characterized preclinical mouse cancer models. As described previously (Seth et al., 2011), we found that most CD8⁺ T cells isolated from the spleen of C57BL/6 WT mice expressed homogeneous levels of CD226. By contrast, we observed the progressive emergence of a CD226 negative population among CD8⁺ T cells infiltrating B16F10 melanoma and VK12653 myeloma tumors (**Figure 5A-E and Figure S5A**). In both models, the percentage of CD226⁻ CD8⁺ TILs significantly correlated with tumor size (**Figure 5D-E and Figure S5B-C**) confirming the link between CD226 loss and tumor development. As in humans, CD226⁻ CD8⁺ T cells accumulating in mouse tumor microenvironment were characterized by significantly decreased proliferation as evidenced by reduced Ki67 staining (**Figure 5F**). Upon *in vitro* re-stimulation with anti-CD3/anti-CD28 mAbs, they also produced significantly less IFN- γ and TNF- α than their CD226⁺ counterparts (**Figure 5G**). These results confirm that the absence of CD226 in CD8⁺ T cells marks a dysfunctional population associated with tumor progression.

To assess the antigen specificity of CD226⁻ TIL, ova-specific OT-1 CD8⁺ T cells were transferred into WT mice that were subsequently injected with B16F10 parental or B16F10-ova (**Figure 5H**). We detected an accumulation of TCR α 2⁺/V β 5⁺ OT-1 CD8⁺ T cells with a low CD226 expression within B16F10-ova tumors (**Figure 5I**). OT-1 CD8⁺ T cells were also present in B16F10 tumors, although at lower frequencies (**Figure S5D-E**). Yet, in the absence of their cognate antigen, most of the B16F10 intratumor OT-1 CD8⁺ T cells retained a high CD226 expression (**Figure 5I**). Of note, CD226⁻ OT-1 CD8⁺ T cells were also almost undetectable in the spleen of B16F10 and B16F10-ova bearing mice (**Figure 5I**). More importantly, we found that the percentage of CD226⁻ cells was significantly higher among TCR α 2⁺/V β 5⁺ OT-1 TILs than among TCR α 2⁻/V β 5⁻ polyclonal TILs in the B16F10-ova model confirming that CD226 loss preferentially occurs in tumor antigen-specific TILs, rather than in potential bystander TILs (**Figure 5J and Figure S5E**). Similar results were obtained when we transferred highly purified naïve CD226⁺ CD8⁺ T cells isolated from the spleen of OT-1 mice into immunodeficient *Rag2*^{-/-} *g μ* ^{-/-} bearing B16F10 or B16F10-ova tumors (**Figure S5F-H**). Taken together these results demonstrate that tumor microenvironment drives the differentiation of CD226⁺ CD8⁺ T cells into CD226⁻ CD8⁺ T cells in a tumor antigen-dependent manner.

Immune checkpoint blockade efficacy relies on CD226.

Although the defects associated with CD226 loss were evocative of exhausted T cell (Tex) dysfunction (Thommen and Schumacher, 2018; Wherry, 2011), both CD226⁻ and CD226⁺ CD8⁺ TILs isolated from B16F10 bearing mice had a phenotype consistent with Tex cells characterized by a high expression of PD-1, TIGIT, LAG-3 and CTLA-4 (**Figure 6A and Figure S6A, B**). CD226⁻ and CD226⁺ OT-1 cells infiltrating B16F10-ova tumors upon adoptive transfer into WT mice also expressed similar levels of PD-1 and Tim-3 (**Figure 6B**). These immune-checkpoints were also equally present on CD226⁻ and CD226⁺ TILs isolated from breast and ovarian cancer patients (**Figure 6C and Figure S6C**). Therefore, we thought that CD226 expression might impact CD8⁺ T cell response to immune checkpoint (IC) blockade.

To address this hypothesis, we analyzed CD226⁻ and CD226⁺ CD8⁺ Tem cell responsiveness to anti-PD-1 blockade using a B16K1 melanoma variant overexpressing MHC-I (Bertrand et al., 2017). Of note, CD226⁻ CD8⁺ TILs that progressively accumulated in this model correlated with tumor size and displayed similar IC expression to their CD226⁺ CD8⁺ counterparts (**Figure S6D-E**). As expected (Bertrand et al., 2017), anti-PD-1 mAb injection led to a significant decrease in tumor growth as compared to control Ig treatment that was abrogated upon mAb-based depletion of CD8⁺ T cells (**Figure 6D-E**). A concomitant increase in the percentage of tumor infiltrating CD8⁺ T cells and proliferating Ki67⁺ CD8⁺ TILs was also observed (**Figure S6F**). Still, while anti-PD-1 increased the *in vivo* proliferation of CD226⁺ TILs, the proliferation of CD226⁻ CD8⁺ TILs was not significantly affected by this treatment (**Figure 6F**). In addition, unlike their CD226⁺ counterparts, anti-PD-1 treatment failed to increase *ex vivo* IFN- γ production by CD226⁻ CD8⁺ TILs (**Figure 6G**). Altogether, these results indicate that anti-PD-1 mAb treatment may not reverse CD226⁻ CD8⁺ T cell dysfunction suggesting that CD226 expression may be critical for anti-PD-1 efficacy.

To confirm this hypothesis, WT or *Cd226*^{-/-} mice bearing B16K1 tumors were treated with anti-PD-1 or control Ig mAbs. PD-1 blockade resulted in significant reduction in tumor growth in WT mice while it only had minor effects in *CD226*^{-/-} mice (**Figure 6H and Figure S6G**). Tumor-bearing WT mice injected with anti-CD226 blocking mAbs also failed to respond to anti-PD-1 mAb treatment (**Figure 6I and Figure S6H**). Of note, CD226 blockade had a comparable negative impact on anti-PD1 mAb treatment as CD8⁺ T cell depletion (**Figure 6I and Figure**

S6H), underlining the critical role of CD226 expressed by CD8⁺ T cell for anti-PD1 mAb efficacy. Similar results were obtained using MC38 model upon treatment with anti-PD-1 mAb alone or in combination with anti-CTLA-4 mAb, thus confirming the importance of CD226 in the efficacy of ICB (**Figure S6I-J**). Altogether, these results highlight that the accumulation of defective CD226⁻ CD8⁺ TILs may represent an important parameter limiting the efficacy of ICB.

Tumor-induced CD226⁻ CD8⁺ T cells accumulation depends on Eomes expression.

Although RNAseq analysis revealed that human resting CD226⁺ and CD226⁻ CD8⁺ T cells have a mostly overlapping transcriptional program, several genes differed between these two subpopulations (**Figure S2C**). In particular, we found that Eomesodermin (Eomes) transcription factor (TF) mRNA was expressed significantly higher in the CD226⁻ fraction of both resting and activated human CD8⁺ T cells (**Figure 7A**). Similar observations were made at the protein level in CD8⁺ T cells isolated from samples stemming from HD or cancer patients (**Figure 7B**). Together with previous evidence showing that high Eomes expression limits TILs responsiveness to ICB (Blackburn et al., 2008; Paley et al., 2012), these results questioned the role of this TF in the accumulation of dysfunctional CD226⁻ CD8⁺ Tems in tumors. To address this point, we analyzed the tumor-induced differentiation of CD226⁻ CD8⁺ T cells in *CD4^{cre}xEomes^{fl/fl}* mice (*Eomes^{KO}*) that have T cell specific deletion of *Eomes*. First, we confirmed that CD226⁻ TILs expressed significantly higher levels of Eomes in both B16F10 (**Figure 7C-D and Figure S7A-C**) and Vk12653 (**Figure S7D-G**) bearing *CD4^{WT}xEomes^{fl/fl}* control mice (*Eomes^{WT}*). More importantly, in both tumor models, the percentage of CD226⁻ CD8⁺ TILs was strongly reduced in *Eomes^{KO}* mice as compared to *Eomes^{WT}* mice (**Figure 7C, E and Figure S7G**). Of note, the absence of Eomes did not significantly affect tumor size, nor tumor CD8⁺ Tem percentage ruling out a potential impact of these parameters in the observed differences between *Eomes^{KO}* and *Eomes^{WT}* mice (**Figure S7A-F**).

To confirm the role of Eomes in CD226⁻ CD8⁺ T cell development, we next analyzed CD226 expression by CD8⁺ T cell in mice overexpressing Eomes under the hCD2 regulatory regions (Istaces et al., 2019). As expected, we found that splenic CD8⁺ T cells from *Eomes^{Tg}* mice contained significantly higher percentages of CD226⁻ CD8⁺ T cells than the CD8⁺ T cells from control mice (**Figure 7F-G**). These CD226⁻ CD8⁺ T cells were also characterized by higher Eomes

expression than their CD226⁺ counterparts confirming the link between Eomes overexpression and CD226 loss (**Figure 7F-G**). In order to determine the mechanisms underlying Eomes regulation of CD226 expression we analyzed ATAC-Seq, Eomes ChIP-Seq and H3K27 histone acetylation profile of *Cd226* locus in CD8⁺ T cells (**Figure S7H**). ChIP-Seq data from ectopic or endogenous Eomes in CD8 T cells (GSE122895; (Li et al., 2018a) and GSE124914; (Istaces et al., 2019)) both revealed a clear Eomes binding site in an accessible intronic region of *Cd226*, indicating that Eomes is able to directly interact with regulatory elements of the *Cd226* gene (**Figure S7H**).

CD226 loss restrains CD8⁺ T cells antitumor functions during CD137 immunotherapy.

Agonist antibodies against CD137 (TNFRSF9, 4-1BB) represent promising immunotherapeutic agents previously shown to induce Eomes up-regulation in T cells (Curran et al., 2013) and thus they could affect CD226 expression by CD8⁺ T cells. Indeed, we found that anti-CD137 mAb treatment resulted in the expansion of CD8⁺ T cells with an effector memory phenotype that expressed high levels of Eomes in the different lymphoid organs tested (**Figure 8A-B and Figure S8A**). Remarkably, anti-CD137 mAb-induced Eomes over-expression was accompanied by the progressive emergence of CD8⁺ T cells lacking CD226 expression in a dose-dependent manner (**Figure 8A-B and Figure S8B-C**). By contrast, agonist mAbs targeting other immunostimulatory members of the TNF receptor family such as GITR or OX40 did not increase Eomes expression, nor the frequency of CD226⁻ CD8⁺ T cells (**Figure S8D-E**). Once again, CD226⁻ CD8⁺ T cells were characterized by higher Eomes levels (**Figure 8C**) and Eomes deficiency significantly abrogated CD226 loss induced by anti-CD137 mAb treatment (**Figure S8F**) thus confirming the importance of this transcription factor in the program leading to CD226 loss. Interestingly, CD226 loss induced by anti-CD137 mAb treatment was also abrogated in *CD4^{cre}xEomes^{fl/wt} (Eomes^{het})* mice (**Figure 8D**) that were characterized by lower Eomes levels as compared to *Eomes^{WT}* but induced similar effector CD8⁺ T cell expansion upon CD137 treatment (**Figure S8G**). By contrast, anti-CD137 mAb-induced CD226⁻ CD8⁺ T cell accumulation was not affected by CD155 deficiency, ruling out any critical role of CD226/CD155 interactions in the emergence of CD8⁺ T cells lacking CD226 expression upon anti-CD137 mAb stimulation (**Figure 8E**).

To confirm whether anti-CD137 agonists promoted the differentiation of CD226⁺ T cells into CD226⁻ T cells as shown in the tumor context, we transferred purified CD226⁺ naïve CD8⁺ T cells into *Rag2^{-/-}gc^{-/-}* mice (**Figure S8H**). A few days after cell transfer, most CD8⁺ T cells had undergone several rounds of division as a result of homeostatic expansion. They had also acquired a CD44^{hi} memory T cell phenotype but remained CD226⁺ T cells, ruling out that the emergence of CD226⁻ cells only resulted from CD8⁺ T cell division or memory T cell differentiation (**Figure S8I**). By contrast, the subsequent injection of anti-CD137 mAbs promoted the accumulation of CD226⁻ CD8⁺ T cells confirming that the increase of CD226⁻ CD8⁺ T cells upon CD137 activation resulted from the CD226⁺ CD8⁺ T cell differentiation (**Figure S8J**). The emergence of OT-1 cells lacking CD226 expression was also observed following adoptive transfer of CD226⁺ OT-1 cells into WT mice upon treatment with anti-CD137 mAbs (**Figure S8K**). Altogether, these results demonstrate that Eomes over-expression induced by CD137 immunotherapy drives the differentiation of CD226⁺ into CD226⁻ CD8⁺ T cells.

Given the overall clinical interest around CD137 agonists as immunotherapeutic agents in cancer, we next analyzed the functions of CD226⁻ and CD226⁺ CD8⁺ T cells induced upon anti-CD137 mAb treatment. We found that purified CD226⁻ CD8⁺ T cells from anti-CD137 mAb-treated mice divided less and produced lower levels of IFN- γ and TNF- α than their CD226⁺ counterparts in response to anti-CD3/anti-CD28 stimulation (**Figure 8F-G**). Using OT-1 mice treated with anti-CD137 mAb, we confirmed that anti-CD137 mAb-induced CD226⁻ CD8⁺ OT-1 cells have lower effector functions than their CD226⁺ counterparts in response to their cognate antigen (**Figure 8H**). It is worth mentioning that CD226⁻ CD8⁺ T cells isolated from anti-CD137 mAb-treated mice had strongly reduced *CD226* mRNA levels as compared to CD226⁺ CD8⁺ T cells confirming, as in humans, that the loss of CD226 occurs at the transcriptional level (**Figure S8L**).

Finally, to gain clear insight whether CD226 loss may affect the *in vivo* anti-tumor functions of CD8⁺ T cells that expand upon anti-CD137 mAb immunotherapy, *Pmel-1* transgenic mice, that all harbor CD8⁺ T cells specific for the melanoma antigen gp100, were treated with anti-CD137 mAbs. Sorted CD226⁻ or CD226⁺ *Pmel-1* CD8⁺ T cells were transferred into B16F10 melanoma bearing mice according to our previously described adoptive cell transfer (ACT) protocol (Landsberg et al., 2012)(**Figure 8I**). Consistent with their reduced effector capabilities *in vitro*,

CD226⁻ CD8⁺ T cells only mildly reduced tumor development while the transfer of CD226⁺ CD8⁺ Pmel-1 T cells resulted in a drastic reduction in tumor growth and significantly prolonged survival of mice (**Figure 8J-K**). These results confirm that Eomes dependent CD226 loss induced by anti-CD137 mAb treatment could indeed limit the anti-tumor efficacy of this treatment *in vivo*.

DISCUSSION

The mechanisms underlying the lack of responsiveness of anti-tumor CD8⁺ T cells are still poorly understood and finding additional signals that regulate their functions has become a major priority. In the present study, we found that the activating receptor CD226 is a critical component of T cell biology and its absence impairs CD8⁺ T cell responsiveness to TCR stimulation. In addition, using mouse and human samples we identified loss of CD226 as a tumor immune evasion strategy driven at least partly by the TF Eomes. More importantly, our results demonstrated that CD8⁺ T cells fail to respond to ICB in the absence of CD226 and that CD226 loss affects anti-CD137 agonist efficacy. Taken together our study demonstrates the critical role of CD226 for T cell biology, cancer immunology and cancer immunotherapy.

The profound cancer-immunosurveillance defects depicted by our group and others in diverse tumor mouse models in the absence of CD226 (Gilfillan et al., 2008; Guillerey et al., 2015; Iguchi-Manaka et al., 2008) suggested that this receptor might exert central functions in T lymphocyte biology. The implication of this receptor in CD4⁺ T helper cell differentiation (Gaud et al., 2018; Lozano et al., 2012; Lozano et al., 2013) and the association between *CD226* gene single nucleotide polymorphism (SNP) with increased development of autoimmune pathologies (Maiti et al., 2010; Song et al., 2012; Todd et al., 2007) supported this hypothesis. Yet, initial studies using CD226-deficient mice indicated that CD226 is not formally required for antigen-specific CD8⁺ T cell activation and no striking immune defects were found in the absence of CD226 (Gilfillan et al., 2008). Based on this evidence, this receptor was so far mainly considered as a co-stimulatory receptor increasing cytotoxic T lymphocyte- and NK cell-mediated cytotoxicity against CD112- and CD155-expressing targets (Martinet and Smyth, 2015). Herein, using diverse TCR triggering agents, in the presence or absence of CD28 co-stimulation, we presented compelling evidence that CD8⁺ T cells that do not express CD226 are hypo-responsive to TCR stimulation and have limited effector functions. These results imply that CD226 plays a more central role than originally thought in CD8⁺ T cell activation program induced by TCR engagement.

The flow cytometry based phenotypes of CD226⁻ and CD226⁺ CD8⁺ T cells were highly overlapping. This similitude applied to the different healthy donors and cancer patients analyzed in our study. These results were confirmed by RNAseq analysis of freshly purified peripheral blood CD226⁻ and CD226⁺ CD8⁺ T cells with only 76 genes differentially expressed between both subsets. It is unlikely that these subtle differences at the resting state may be responsible for the divergent functional outcomes observed between CD226⁻ and CD226⁺ CD8⁺ T cells upon TCR stimulation since we found that CD226 forced expression through lentiviral vectors restored CD226⁻ CD8⁺ T cells functions in response to TCR stimulation. These results together with the reduced phosphorylation of several key TCR downstream signaling molecules observed upon anti-CD3 Ab stimulation in the absence of CD226 strongly argue for a key role of CD226 in CD8⁺ T cell TCR signaling. Although CD226⁻ and CD226⁺ CD8⁺ T cells both underwent important transcriptional modifications upon anti-CD2/CD3/CD28 stimulation, archetypal effector T cell-associated genes were only detected in stimulated CD226⁺ T cells. Such results suggest that the presence of CD226 directly impacts TCR induced CD8⁺ T cell effector program. Understanding how CD226 modulates TCR signaling in CD8⁺ T cells may provide new approaches to restore T cell functions especially in the context of tumors.

Several pieces of evidence indicate that CD226 is implicated in LFA-1 functions (Shibuya et al., 1999; Shirakawa et al., 2005; Shirakawa et al., 2006). LFA-1 binding to ICAM-1 on contacting cells represents a critical early event driving actin-cytoskeleton reorganization, immune synapse formation, and co-stimulation ultimately lowering TCR activation threshold (Bachmann et al., 1997; Bianchi et al., 2000; Perez et al., 2003). We brought significant evidence that LFA-1 functions are affected by the absence of CD226. Indeed, we found that TCR induced LFA-1 activation into its high-affinity conformation (Dustin and Springer, 1989), was greatly reduced in the absence of CD226 in CD8⁺ T cells and that CD226 forced expression restored these defects. In addition, we observed that LFA-1 inhibition reduced CD8⁺ T cell activation similar to CD226 loss. Thus, our results suggest that LFA-1 defects owing to CD226 loss may represent an important mechanism of TCR hypo-responsiveness and CD8⁺ T cell dysfunction in tumors. The observations from *Braun et al.* showing actin cytoskeleton reorganization and LFA-1 polarization defects in *Cd226*^{-/-} CD8⁺ T cells support this hypothesis (Braun et al.). Future work will be needed to better understand how CD226 intrinsic signaling

connects with TCR signaling and LFA-1 in CD8⁺ T cells. CD226 contains at least two phosphorylation sites on tyrosine residue 322 and on serine residue 329 in its intracellular domain (Martinet and Smyth, 2015; Shibuya et al., 1996). A recent study stressed the importance of the conserved Y³²²XN³²⁴X immunoglobulin tyrosine tail (ITT) motif in the NK cell cytolytic functions of CD226 (Zhang et al., 2015). This typical consensus binding sequence was indeed shown to connect CD226 with Grb2 SH2 domain, subsequently leading to the activation of Vav-1, phospholipase C- γ 1 and ERK1,2 (Zhang et al., 2015). CD226 ITT motif could therefore represent a critical relay to amplify TCR downstream signaling. The decreased phosphorylation of ZAP-70, SLP76, LAT and ERK1,2 observed in CD8⁺ T cells lacking CD226 and the recent evidence that Vav-1 associates with CD226 in CD4⁺ T cells may support this hypothesis (Gaud et al., 2018). Surprisingly, no immune synapse, nor functional defects were observed by *Braun et al.* in CD8⁺ T cells isolated from *Cd226^Y* mice harboring a point of mutation on the Y319 of CD226 (mouse equivalent Y³²²) suggesting that this signaling is dispensable for CD226 synergy with LFA-1 and TCR co-stimulation (Braun et al.). Although the importance of Ser 329 phosphorylation in the propagation of CD226 downstream signaling remains a matter of debate (Zhang et al., 2015), this residue could represent a critical link between TCR signaling, CD226 and LFA-1. Indeed, Ser 329 of CD226 was found to be phosphorylated upon CD3/CD28 stimulation and was required for CD226 physical association with LFA-1 in lipid raft (Shibuya et al., 1999; Shirakawa et al., 2005; Shirakawa et al., 2006). Besides, CD226 may also play a critical role in cytoskeleton remodeling, a central process for TCR signaling and LFA-1 conformational activation. This hypothesis is supported by a study from Ralston and colleagues showing that CD226 could bind tightly to the actin cytoskeleton through its interaction with the MAGUK homologue human discs large (hDlg) and the actin-binding protein 4.1G (Ralston et al., 2004).

It is now well established that many human tumors express specific antigens that can elicit CD8⁺ T cell activation and the accumulation of CD8⁺ effector T cells in the tumor microenvironment (Schumacher and Schreiber, 2015). Unfortunately, successful eradication of tumor cells by these TILs is often limited by diverse immunosuppressive mechanisms (Thommen and Schumacher, 2018). Among them, the up-regulation of multiple inhibitory receptors such as PD-1, Tim-3, TIGIT, and LAG-3 at the cell surface of TILs has emerged as

major mechanisms of T cell dysfunction protecting tumors from immune attack (Thommen and Schumacher, 2018). Our study addressed an additional mechanism of cancer immune escape other than the classical immune checkpoints through the loss of a critical activation receptor, CD226. We presented considerable new evidence that tumor development favors the accumulation of dysfunctional CD8⁺ T cells lacking CD226 expression. While almost all mouse CD8⁺ T cells expressed CD226 in steady-state conditions, we found the progressive accumulation of TILs lacking CD226 with a CD62L⁻CD44^{hi} effector memory phenotype in the different tumor mouse models tested. Of note, CD226 loss mainly affected tumor antigen-specific CD8⁺ T cells since we observed that ova-specific purified CD226⁺ OT-1 cells only converted into CD226⁻ effector cells when transferred into ova-tumor bearing mice. Still, the differentiation of CD8⁺ T cells into hypo-reactive CD226⁻ CD8⁺ T cells may occur in other contexts as dysfunctional CD226⁻ CD8⁺ T cells were detectable in most healthy donors. Whether this reflects a previous immune history of each individual or whether this represents a mechanism ensuring immune homeostasis by preventing over CD8⁺ T cell activation remains to be more deeply investigated in the future.

Sustained expression of inhibitory receptors was so far considered as a key parameter allowing the identification of exhausted T cells in chronic infectious disease and cancer (Ahmadzadeh et al., 2009; Blackburn et al., 2009; Thommen et al., 2018). The successful reinvigoration of Tex functions by anti-PD-1 mAbs in chronic viral infections (Barber et al., 2006) and the impressive clinical results obtained by ICB in cancer patients (Robert et al., 2015; Robert et al., 2011; Topalian et al., 2012) support the importance of inhibitory receptors in T cell dysfunctions. Still, recent studies suggest that intratumor PD-1⁺ exhausted T cells comprise a large spectrum of dysfunctional states (Bensch et al., 2018; Thommen et al., 2018). More importantly, it becomes evident that the potential of reinvigoration by ICB differs between CD8⁺ Tex subpopulations, meaning that additional alterations restrain exhausted T cell functions (Pauken et al., 2016; Philip et al., 2017; Scott et al., 2019). Interestingly, both CD226⁻ and CD226⁺ cells were found among tumor infiltrating Tex cells with similar IC expression. Still, CD226⁻ TILs consistently had lower effector functions and proliferation than their CD226⁺ counterparts. In addition, anti-PD-1 immunotherapy failed to restore effector functions of TILs lacking CD226 expression. Thus, the absence of CD226 activation receptor might represent a

yet underappreciated molecular mechanism limiting intratumor T cell responsiveness and correlating with their exhausted state independently of inhibitory receptors.

Although several predictive factors such as CD8⁺ T cell infiltration (Tumeh et al., 2014), PD-L1 expression (Larkin et al., 2015) as well as tumor neo-antigen load (Rizvi et al., 2015) were identified in the past, it remains still unclear why some patients respond to ICB therapy while others do not. Thus, understanding the molecular mechanisms underlying effective responses to ICB therapy remains an intense field of investigation. Recently, it was demonstrated that PD-1/PD-L1 signaling suppresses T cell function via inactivation of CD28 signaling rather than TCR signaling (Hui et al., 2017) and that CD28/B7 pathway plays a crucial role in the efficacy of anti-PD-1 treatment (Kamphorst et al., 2017). However, the efficacy of anti-PD-1 may also rely on additional co-stimulatory signals as demonstrated by a recent study showing that PD-1/PD-L1 pathway is a negative regulator of CD226 signaling and that the anti-tumor effect of PD-1 and GITR antibody combination was abrogated in the absence of CD226 (Wang et al., 2018). The importance of CD226 for cancer immunotherapy was also evidenced during our review process by *Jin et al.* in the context of anti-TIGIT mAb treatment (Jin et al., 2020). Our study demonstrating that anti-PD-1 immunotherapy fails to restore effector functions of TILs lacking CD226 expression not only confirms the importance of signals provided by CD226 in anti-PD-1 efficacy but also highlights a novel mechanism of tumor resistance to ICB through the loss of CD226 expression. Thus, the extent of CD226⁻ CD8⁺ T cells accumulating in the tumor microenvironment may represent an attractive parameter to consider for predicting ICB efficacy in cancer patients especially given the high CD226 variability observed among cancer patients in our study. In line with this idea, Braun et al. indeed showed in their accompanying manuscript, that the response to ICB in pre-treatment biopsies of melanoma patients significantly correlated with the presence of CD226⁺CD8⁺ T cells (Braun et al.).

A better understanding of the tumor signals involved in CD226 loss is required as they may represent interesting targets to restore CD8⁺ T cell anti-tumor functions and immune

checkpoint efficacy. CD226 engagement by its ligands, especially CD155, was previously shown to decrease CD226 surface expression on tumor infiltrating NK and T cells (Li et al., 2018b). Braun et al. in their accompanying manuscript unraveled the underlying mechanism of CD155-induced loss of CD226. Upon engagement with CD155, they found that CD226 phosphorylation at Y319 enabled its binding to the ubiquitin-ligase Cbl-b leading to its internalization and proteasomal degradation (Braun et al.). Although, CD155-induced posttranslational regulation is important in regulating CD226 expression in the tumor context, our results suggest the existence of additional mechanisms occurring at the transcriptional level. Interestingly, we found that tumor induced CD226 loss was blunted in the absence of Eomes. Conversely, Eomes overexpression promoted the accumulation of dysfunctional CD226⁻CD8⁺ T cells and once again this phenomenon was blunted in the absence of Eomes. While these results demonstrate the implication of Eomes in CD226 loss, the mechanisms underlying CD226 transcriptional repression remains to be further addressed. Still, recruitment of Eomes to a regulatory region of the Cd226 gene suggests that Eomes may directly regulate CD226 expression. Several studies suggested that the level of Eomes expression may distinguish two different T cell exhaustion stages induced by chronic antigen exposure (Blackburn et al., 2008; Buggert et al., 2014; Paley et al., 2012). In chronic viral infections, Eomes^{hi} Tex cells expressed higher levels of inhibitory receptors, had reduced effector functions, and did not respond to anti-PDL1-mediated reinvigoration as compared to Eomes^{lo} Tex cells (Blackburn et al., 2008; Paley et al., 2012). Dissecting the exact role of Eomes in T cell dysfunction was complicated by the function of this TF in effector CD8⁺ T cell program and memory maintenance (Intlekofer et al., 2005; Kaech and Cui, 2012). Recent evidence suggests that low Eomes expression is required for anti-tumor effector T cell expansion and tumor control, while its overexpression favors T cell exhaustion and tumor outgrowth (Li et al., 2018a). Although Eomes was implicated in the up regulation of several immune checkpoints such as PD-1 and Tim-3, our results suggest that CD226 loss may also participate to the terminal exhaustion program associated with Eomes overexpression.

CD137 agonists were shown to stimulate CD8⁺ T cell-dependent anti-tumor immune responses and promote tumor regression in a variety of mouse tumors (Guillerey et al., 2015; Melero et al., 1997). Still, thus far early clinical trials have revealed limited anti-CD137 mAb

efficacy in cancer patients (Chester et al., 2018) and anti-CD137 agonists were shown to suppress clinical symptoms in several mouse models of autoimmunity (Choi et al., 2006; Kim et al., 2011; Seo et al., 2004; Sun et al., 2002). Some of the beneficial effects of anti-CD137 agonists in autoimmune models were ascribed to the expansion of a regulatory population of CD8⁺ T cells that express CD11c producing high levels of IFN- γ (Choi et al., 2006; Kim et al., 2011). Our results suggest that CD226 loss induced by Eomes overexpression may also account for the immune regulatory function of CD137 and that preserving CD226 expression may increase the efficacy of this treatment in human cancer patients.

Although immunotherapy has represented a major breakthrough in cancer treatment, clinical responses are observed only in a fraction of treated patients and cancer types. Therefore, one of the major current research challenges now resides in the identification of novel mechanisms restraining anti-tumor immune functions. We and *Braun et al.* have demonstrated that CD226 expression represents a critical rheostat for anti-tumor functions of CD8⁺ T cells and that Eomes-dependent and/or CD155-induced CD226 loss represents a major tumor immune escape mechanism.

AUTHOR CONTRIBUTION

Study conception and design: A.C.P., M.W., A.A., S.G., T.B., M.J.S and L.M. Acquisition of data: A.C.P., M.W., A.A., L.L., M.B., N.C, M-V.J., M.L.M, G.G., I.D., E.B, C.M.S., E.M., L.B, S.M., A.S., A.A, M.P., S.K., M.C., C.G., M.J.S and LM. Analysis and interpretation of data: A.C.P., M.W., A.A., M.B., T.B., L.D.S., S.G., M.J.S and L.M. Drafting of manuscript: L.M. Critical revision and editing: A.C.P., M.W., A.A., L.D., L.L., A.D., A.S., T.B., M.J.S and L.M. Provision of key materials: B.C., E.V., A.M., A.D., M.A., J.M., M.P., and H.A.L.

ACKNOWLEDGEMENT

We are grateful to our healthcare professionals for their boundless investment during the COVID-19 crisis. We thank Marie Tosolini, Laetitia Ligat, Liam Town and Brodie Quine and the members from the core facilities at the Cancer Research Center of Toulouse and QIMR Berghofer. We acknowledge the contribution of Gisèle Froment, Didier Nègre and Caroline

Costa from lentivectors production facility of SFR Biosciences (UMS3444/CNRS, US8/Inserm, ENS de Lyon, UCBL). We thank Nathalie Rufer for providing PE-labeled NY-ESO-1 multimers and Céline Colacios for breast cancer sample data. We thank Pierre Cordelier and Bettina Couderc for their help on lentiviral vector. The “Genomic and Immunology of myeloma” laboratory at CRCT is supported by the “Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer” Program Grants (ARC PGA1-20160203788 and PGA1-20190208630). This work was supported by grants from the Institut National du Cancer (PLBIO R16100BB), Cancer Research Institute/Bristol-Myers Squibb CLIP Grant and the “Fondation Toulouse cancer santé” IUCT-O translational research program. M.W and A.C.P were supported by la Ligue contre le cancer PhD fellowships. M.B. is supported by a scholarship of the “Dr. Mildred Scheel Stiftung fuer Krebsforschung” of the “Deutsche Krebshilfe”. T.B. was supported by an EMBO long-term Fellowship (ALT945-2015) and a National Health and Medical Research Council of Australia (NH&MRC) Early Career Fellowship (1124690). M. J. S. was supported by a NH&MRC Senior Principal Research Fellowship (1078671), Investigator Fellowship (1173958) and Program Grant (1132519) and Cancer Council of Queensland Project Grant (1157048). S.G, M.L and E.B were supported by Fonds National de la Recherche Scientifique (FRS-FNRS, Belgium) and the European Regional Development Fund (ERDF) of the Walloon Region (Wallonia-Biomed portfolio, 411132-957270). The results shown here are in part based upon data generated by the TCGA Research Network: <https://www.cancer.gov/tcga>.

CONFLICT DISCLOSURE

M.J. Smyth has research agreements with Bristol Myers Squibb and Tizona Therapeutics and is on the scientific advisory boards of Tizona Therapeutics and Compass Therapeutics. L.M has research agreements with Bristol Myers Squibb, Sanofi-Aventis and Roche.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: The absence of CD226 identifies hypo-responsive human CD8⁺ T cells.

(A) Representative FACS histogram and graph showing the expression of CD226 by healthy donor (HD) peripheral blood CD8⁺ T cells. n=77 HD. (B) Graph showing the relative frequency of the indicated TCRv β among CD226⁻ (blue) and CD226⁺(red) CD8⁺ T cells. Representative from n=20 HD. (C) Representative FACS histograms and graph showing the percentages of CD226⁻ in the indicated CD8⁺ T cell subsets. n = 77 HD. (D) Representative FACS histograms and graph recapitulating the proliferation of purified CD226⁻ and CD226⁺ CD8⁺ Tn, Tcm and Tems activated by α -CD2/CD3/CD28 microbeads for 6 days. n=7-14 HD. (E) Representative FACS plots showing the proliferation of purified CD8⁺ T cells activated by allogeneic DCs or CMVpp65 peptides for 6 days. n = 3 HD. (F) Graph showing the concentrations of the indicated cytokines in the culture supernatants of purified CD226⁻ and CD226⁺ CD8⁺ Tems stimulated with α -CD2/CD3/CD28 microbeads for 48 hrs. From n=5 HD. (G) Representative FACS plots showing the expression of CD107a degranulation marker and the intracellular production of IFN- γ and TNF- α by CD226⁻ and CD226⁺ CD8⁺ T cells activated by Fc γ R⁺ P815 cell line coated with α -CD3 mAbs (OKT3, 1 μ g/ml). n=5 HD. (H) Representative graph showing calcium influx by CD226⁻ and CD226⁺ CD8⁺ T cells activated with α -CD3 (OKT3, 10 μ g/ml). Representative from n=4 HD. (I) Graph showing the expression of phosphorylated (p) SLP76 by CD226⁻ or CD226⁺ CD8⁺ Tems stimulated with α -CD3 (OKT3, 10 μ g/ml) for 0, 1 or 5 minutes. n=5 HD. (J-K) Purified CD226⁻ or CD226⁺ CD8⁺ Tems were stimulated with α -CD3 (OKT3, 10 μ g/ml) for 0, 1 or 5 minutes. Western blots using antibodies directed against the indicated total and phosphorylated (p) proteins are shown. Representative experiment from n=3 HD. Data are presented as mean \pm SEM with each symbol representing an individual HD. Statistical differences between multiple groups were determined by one-way ANOVA with Tukey's correction (C). Statistical differences between two groups were determined using Mann-Whitney test (D), unpaired (F) or paired T test (I). * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

Figure 2: The absence of CD226 alters TCR-induced effector program of CD8⁺ T cells.

(A-F) A global transcriptomic analysis of HD resting CD226⁻ and CD226⁺ CD8⁺ T cells (n=6/group) or activated (ACT; n=4/group) by α -CD2/CD3/CD28 for 24 hrs was performed by RNA sequencing. **(A)** PCA analysis showing different expression gene profiles between CD226⁻ and CD226⁺ CD8⁺ T cell samples activated or not. **(B)** Venn diagram showing the number of genes differentially expressed between the indicated groups of CD8⁺ T cells ($p < 0.01$, FC > 2). **(C)** Volcano plots showing differentially expressed genes between CD226⁻ and CD226⁺ CD8⁺ T cell samples, activated (ACT) or not. Selected relevant immune related genes were highlighted. **(D)** Log-normalized gene-expression heatmap showing the hierarchical clustering of CD226⁻ and CD226⁺ CD8⁺ T cell samples according to differentially expressed genes between ACT CD226⁻ and ACT CD226⁺ CD8⁺ T cells. **(E)** Graph showing gene set enrichment of ACT CD226⁺ vs ACT CD226⁻ CD8⁺ T cell specific genes analyzed in C7 immune data sets. **(F)** Table showing GO term analysis performed on ACT CD226⁺ vs ACT CD226⁻ CD8⁺ T cell differentially expressed genes. The associated NES and Adjusted p value was indicated. NES and FDR were plotted for each comparison.

Figure 3: Mechanisms underlying CD226⁻ CD8⁺ T cell dysfunction.

(A-B) CD226⁻ and CD226⁺ CD8⁺ T cells were stimulated with IL-7 (2ng/ml) for 24hrs and transduced with GFP control or CD226-GFP lentiviral vectors (LVs) for 48hrs. **(A)** FACS histograms and graphs showing the expression of CD226, CD107a, IFN- γ and TNF- α in transduced cells (GFP⁺) and untransduced cells (GFP⁻) after stimulation with α -CD2/CD3/CD28 microbeads. From n=4. **(B)** Representative FACS histograms and graphs showing the expression of CD226 and the proliferation of transduced (GFP⁺) and untransduced (GFP⁻) CD226⁺ and CD226⁻ cells upon stimulation with α -CD2/CD3/CD28 microbeads. From n=4. **(C)** Representative FACS plots and graph recapitulating the percentages of CD226⁻ and CD226⁺ CD8⁺ T cells stained with m24 mAbs against LFA-1 “extended open” high affinity conformation after 2hrs in presence of α -CD2/CD3/CD28 microbeads or not (NS). From n=5 HD. **(D)** Representative confocal microscopy images showing the expression of CD226 and open LFA-1 (m24) by CD226⁻ and CD226⁺ CD8⁺ T cells after 2 hrs on α -CD3 (OKT3, 10 μ g/ml)-coated wells. **(E)** Graphs showing the mean fluorescence intensity of the indicated markers by CD226⁻ and CD226⁺ CD8⁺ T cells quantified on 15 representative field from 3 different experiments as in **(D)**. **(F)** CD226⁻ and CD226⁺ CD8⁺ T cells were transduced with GFP control or CD226-GFP LVs

for 48 hrs as in **(A)**. Representative FACS plot and graphs recapitulating the percentages of transduced CD226⁻ and CD226⁺ CD8⁺ T cells (GFP⁺) expressing CD226 and m24 LFA-1 high affinity open conformation upon stimulation with α -CD2/CD3/CD28 microbeads for 2 hrs. From n = 5-7 HD. **(G)** Graph recapitulating the intracellular production of IFN- γ and TNF- α by CD226⁻ and CD226⁺ CD8⁺ T cells activated by α -CD3 (OKT3, 10 μ g/ml) for 6hrs in the presence of control Ig (cIg) or blocking anti-LFA-1 mAbs (α -LFA-1). n=8 HD. Statistical differences between multiple groups were determined by one-way ANOVA with Tukey's post-test analysis. Statistical differences between two groups were determined using Mann Whitney test. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

Figure 4: CD226 absence identifies dysfunctional CD8⁺ tumor infiltrating lymphocytes.

(A) Representative FACS histogram and graph showing the percentage of CD226⁻ CD8⁺ T cells isolated from the bone marrow (BM) of newly diagnosed multiple myeloma patients (MM; n=177) and healthy donors (HD; n = 20). **(B)** Representative FACS histogram and graph showing the percentage of CD226⁻ CD8⁺ T cells by paired BM (TIL) or blood (PBMC) CD8⁺ T cells isolated from MM patients (n = 10). **(C)** MM patient CD138⁻ BM cells were stained with CTV and stimulated with α -CD2/CD3/CD28 microbeads for 5 days. Representative histogram and graph recapitulating the proliferation of CD226⁻ and CD226⁺ CD8⁺ TILs. n=20 MM patients. **(D)** Representative FACS plots and graphs recapitulating the expression of CD107a degranulation marker and the intracellular production of IFN- γ and TNF- α by MM patients' CD226⁻ and CD226⁺ CD8⁺ TILs stimulated with α -CD2/CD3/CD28 microbeads for 6 hours. n = 36 MM patients. **(E)** Representative FACS plot and graph showing CD226⁻ frequency by polyclonal and NY-ESO-1 specific CD8⁺ TILs among HLA-A*02⁺ MM patients with detectable HLA-A*02-NY-ESO-1-PE multimers staining. **(F)** MM patient CD138⁻ BM cells were stimulated with HLA-A*02-NY-ESO-1 specific peptide (1 μ g/ml) for 6 hrs. Representative FACS plots as well as pooled data from n=5 HLA-A2⁺ MM patients with positive NY-ESO response are shown. **(G)** Representative histograms and graphs comparing the percentage of CD8⁺ T cells lacking CD226 expression in the blood, healthy distant tissue and tumor biopsies of patients newly diagnosed with lung cancer (LUAD, n=3), breast cancer (BRCA, n = 10) or ovarian cancer (OC, n=7). **(I)** CD226 expression correlates with breast cancer prognosis. Graph showing Kaplan–Meier disease-free (left) and overall (right) survival estimates for CD226^{high} (>median value, n=503) and

CD226^{low} (<median value, n=503) Breast Cancer patients. RNA sequencing data involving 1006 invasive breast Cancer (BRCA) patients from the TCGA database. Data are presented as mean \pm SEM with each symbol representing an individual cancer patient. Statistical analyses between two groups were performed using a Mann Whitney U test (**A, C, D**) or paired T test (**B, E, F**). Statistical differences between multiple groups were determined by one-way ANOVA with Tukey's post-test analysis. Differences in survival and Hazard ratio (HR) were evaluated with the Mantel-Cox test corrected using the Benjamini-Hochberg method. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Figure 5: Tumor development promotes dysfunctional CD226⁻ CD8⁺ T cell accumulation.

(A-G) C57BL/6 WT mice were left untreated or injected with B16F10 melanoma (s.c 5 x 10⁵ cells) or VK12653 myeloma cell line (2 x 10⁶ cells, i.v). **(A)** Representative FACS histograms showing CD226 expression by CD8⁺ Tem (CD44^{hi}CD62L⁻), Tcm (CD44^{hi}CD62L⁺) and Tn (CD44^{low}CD62L⁺) cells isolated from the spleen of non-tumor bearing mice or the indicated tumor lesions. Pooled data from at least 4 independent experiments. **(B)** Graph showing the percentages of CD226⁻ cells among Tn, Tcm and Tem CD8⁺ TILs isolated from B16F10 tumors 19 days post injection. Pooled data from at least 4 independent experiments. **(C)** Graph showing the percentage of CD226⁻ CD8⁺ Tems isolated from the spleen of WT C57BL/6 mice (Naïve spl) or from tumor, draining lymph nodes (DLN), non-DLN (NDLN) and spleen of B16F10 tumor-bearing mice at day 19 post-tumor inoculation. **(D)** Graphs showing the percentage of CD226⁻ CD8⁺ TILs 13 and 19 days after B16F10 injection and tumor volumes in mice with a low or high percentage of CD226⁻ CD8⁺ TILs. n = 16-30 mice/group. **(E)** Graphs showing the percentage of CD226⁻ CD8⁺ Tems in the BM of mice 0, 14, 21 and 35 days after VK12653 MM cell injection and MM cell percentage in mice with a low or high percentage of CD226⁻ CD8⁺ TILs. n = 18-33 mice per group. **(F)** Graph recapitulating the percentages of tumor infiltrating CD226⁻ and CD226⁺ CD8⁺ Tems expressing Ki67 proliferation marker 19 days after B16F10 injection. **(G)** Graphs showing the intracellular production of IFN- γ and TNF- α by CD226⁺ and CD226⁻ CD8⁺ TILs isolated from B16F10 bearing mice upon re-stimulation with α -CD3/CD28 for 6hrs. Pooled data from 3 independent experiments n=12. **(H-J)** 10⁷ ova-specific OT-1 splenocytes were injected i.v into WT mice that were subsequently injected s.c with B16F10

or B16F10-ova tumors. **(H)** Schematic representation of the experimental design. **(I)** Representative histograms and graph showing CD226 expression by OT-1 CD8⁺ T cells isolated from the spleen or tumors. **(J)** Representative FACS plots and graph showing CD226 expression by V α 2⁺V β 5⁺ OT-1⁺ or V α 2⁻V β 5⁻ endogenous polyclonal TILs isolated from B16F10-ova tumors. Pooled data with from 2 experiments. Data are presented as mean \pm SEM with each symbol representing an individual mouse. Statistical differences between multiple groups were determined by one-way ANOVA with Tukey's post-test analysis and differences between two groups were assessed using a Mann Whitney U test (**D, E**) or paired T test (**F, G, J**). *p<0.05; **p<0.01, ***p<0.001.

Figure 6: Tumor-induced CD226 loss limits immune checkpoint blockade efficacy.

(A) Representative density plots and graphs showing the expression of PD-1, TIGIT, CTLA-4, LAG3 by CD226⁻ (blue) and CD226⁺ (red) CD8⁺ TILs isolated from B16F10 bearing mice after 19 days. **(B)** Representative histograms and graphs showing PD-1 and Tim-3 expression by CD226⁻ and CD226⁺ OT-1 CD8⁺ T cells isolated from the spleen or B16F10-ova tumors as in **Figure 5 H**. **(C)** Graphs comparing the expression of the indicated immune checkpoints on CD226⁻ and CD226⁺ CD8⁺ TILs isolated from ovarian cancer samples (n = 8 patients). **(D-I)** Groups of C57BL/6 wild type (WT) and *Cd226*^{-/-} mice were injected s.c. with B16K1 melanoma cells. Mice were treated on days 6, 9, 12 with clg (200 μ g i.p.) or anti-PD-1 (200 μ g i.p., RMP1-14). Some Groups of WT mice received clg (panel E, 100 μ g i.p.; panel I, 250 μ g i.p.), anti-CD8 β (100 μ g i.p.) anti-ASGM1 (50 μ g i.p.) and/or anti-CD226 (250 μ g i.p) on days 5, 6, 13 and 20. Tumor diameter was measured every 2-4 days. **(D)** Schematic representation of the experimental design. **(E)** Graph comparing the tumor growth of mice treated or not with anti-PD1 depleted or not of CD8 or NK cells. Data representative of 2 independent experiments with n=5-6/group. **(F)** Representative FACS plots and graphs showing the percentages of Ki67⁺ proliferating CD226⁻ and CD226⁺ CD8⁺ TILs isolated from Ig control (clg)- or anti-PD-1-treated B16K1 bearing mice. Pooled data from 3 independent experiments with n=10-12. **(G)** FACS plots and graph showing the intracellular production of IFN- γ by CD226⁻ and CD226⁺ CD8⁺ TILs isolated from clg or anti-PD-1 treated B16K1 bearing mice upon in vitro re-stimulation with α -CD3/CD28 mAbs for 6hrs. Pooled data from 3 independent experiments with n=10-12. **(H)** Graph comparing the tumor growth of WT or *Cd226*^{-/-} mice treated or not with anti-PD1. n=7-

10 mice/group. **(I)** Graph comparing the tumor growth of clg- or anti-PD-1-treated WT mice injected with clg, CD226 blocking and/or CD8 depleting antibodies. n=5 mice/group. Data are presented as mean \pm SEM with each symbol representing an individual mouse. Statistical differences between two groups were assessed using paired T test and differences between multiple groups were determined by one-way ANOVA with Tukey's post-test analysis. Differences in survival were evaluated with the Mantel-Cox test. *p<0.05; **p<0.01, ***p<0.001.

Figure 7: CD226 loss depends on Eomes expression.

(A) Graph showing normalized Eomes mRNA transcripts of CD226⁻ and CD226⁺ CD8⁺ Tem activated with α -CD2/CD3/CD28 microbeads or not (NS) detected by RNA sequencing depicted in **Figure 2**. **(B)** Representative FACS plots and graphs showing Eomes expression by CD226⁻ and CD226⁺ CD8⁺ T cells from the blood of HD (n = 15) and from the BM of newly diagnosed MM patients (n = 22). **(C-E)** CD4^{cre}x Eomes^{fl/fl} (Eomes^{KO}) and CD4^{WT}x Eomes^{fl/fl} (Eomes^{WT}) mice were injected with B16F10 tumor cells. Representative FACS plots **(C)** and graphs **(D)** recapitulating the expression of Eomes among CD226⁺ and CD226⁻ tumor infiltrating CD8⁺ Tems. **(E)** Graph showing the percentages of CD226⁻ cells among CD8⁺ TILs isolated from Eomes^{KO} and Eomes^{WT} mice. Data are from 2 pooled experiments with n = 8-10 mice/group. **(F-G)** Representative density plots **(F)** and graphs **(G)** showing CD226 and Eomes expression by CD8⁺ T cells isolated from the spleen of C57BL/6 wild type (WT) and *CD2-Eomes^{Tg}* mice. From 2 independent experiments with n=3 mice/group. Data are presented as mean \pm SEM with each symbol representing an individual mouse. Statistical differences between multiple group were determined by one-way ANOVA with Tukey's post-test analysis and differences between two groups were assessed using paired t test **(B)** or Mann-Whitney **(D, E G)**. *p<0.05; **p<0.01, ***p<0.001.

Figure 8: CD226 loss restrains CD8⁺ T cells antitumor functions.

(A-B) C57BL/6 WT mice were treated with anti-CD137 mAbs (100 μ g; 3H3, i.p) for the indicated period. **(A-B)** Schematic representation of the experimental design, representative histograms **(A)** and graphs **(B)** showing Eomes and CD226 expression by spleen CD8⁺ T cells during anti-

CD137 treatment. **(C)** Graph comparing the expression of Eomes by the indicated CD8⁺ T cells isolated from clg- or anti-CD137-treated mice. n=10 mice/group from 2 pooled experiments. **(D)** FACS plots and graph showing the percentage of CD226⁻CD8⁺ T cells isolated from the blood of CD4^{cre}x Eomes^{fl/fl} (Eomes^{KO}), CD4^{WT}x Eomes^{fl/fl} (Eomes^{het}) and CD4^{WT}x Eomes^{fl/fl} (Eomes^{WT}) mice treated with anti-CD137 mAbs. n = 8-10 mice/group from 2 pooled experiments. **(E)** Graph showing the percentages of CD226⁻CD8⁺ T cells in the spleen of *Cd155*^{-/-} and WT mice treated with anti-CD137 mAbs (red) or IgG control (black). **(F-G)** WT mice were treated for 2 weeks with anti-CD137 mAbs (100µg; 3H3, twice a week) and splenic CD226⁺ and CD226⁻CD8⁺ T cells were sorted by flow cytometry and re-stimulated with α-CD3/CD28 mAbs. **(F)** Representative histogram showing the proliferation of CTV-labeled CD226⁺ and CD226⁻CD8⁺ T cells after 4 days. **(G)** Graphs showing IFN-γ and TNF-α levels in the supernatant of the corresponding cultures after 24 Hrs of stimulation. Data are pooled from 5 independent experiments. **(H)** OT-I mice were treated with anti-CD137 mAbs for 2 weeks and splenic CD8⁺ T cells were purified and activated *in vitro* with α-CD3/CD28 mAbs or ova-peptide for 6hrs. Graphs showing the expression of CD107a and TNF-α by CD226⁺ and CD226⁻CD8⁺ OT-1 cells. n=7 mice/group from 2 independent experiments. **(I-K)** TCR transgenic *Pmel* mice were stimulated with anti-CD137 mAbs and sorted into CD226⁺ and CD226⁻CD8⁺ T cells. B16F10 tumor (10-20mm²) bearing mice were left untreated (control) or injected with the indicated *Pmel* sorted T-cells. Mice pre-conditioned by cyclophosphamide injection were stimulated with a recombinant adenoviral vector vaccine expressing hgp100 and three intratumor injections of TLR ligands CpG and poly(I:C). **(I)** Schematic overview of ACT model, where C= cyclophosphamide, V= Adenovirus encoding hgp100 (=Pmel) and TLR= intra-/peri-tumoral injection of CPG and poly(I:C). **(J-K)** Graph showing tumor area **(J)** and Kaplan-Meier survival curves **(K)** of B16F10 bearing mice. Data depicted are representative of two experiments. Data are presented as mean ± SEM with each symbol representing an individual mouse. Statistical differences between multiple group were determined by one-way ANOVA with Tukey's post-test analysis **(B-E, H, J)** and differences between two groups were assessed using Mann-Whitney **(G)**. Differences in survival were evaluated with Mantel-Cox log rank **(K)**. *p<0.05; **p<0.01, ***p<0.001.

STAR Methods

Contact for Reagent and Resource Sharing

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Ludovic Martinet (ludovic.martinet@inserm.fr)

Human samples

Healthy donors. PBMC obtained from the Etablissement Français du Sang (EFS, Toulouse) were isolated by Ficoll-Hypaque (GE Healthcare) density centrifugation. Unprocessed human bone marrow (BM) aspirates from healthy donors were purchased from Lonza (Switzerland).

Cancer patient's samples. Fresh BM aspirates and peripheral blood from patients with myeloma were collected at the time of diagnosis or relapse in the Institut Universitaire du Cancer de Toulouse-Oncopole (IUCT-O, Toulouse) through the intergroupe francophone du myélome network. BM samples were depleted of malignant plasma cells using anti-CD138-coated magnetic beads (Miltenyi Biotec, France). Samples from newly diagnosed NSCLC, breast or ovarian cancer patients were obtained from surgical resections performed in the IUCT-O (Toulouse, France). Tumor specimens were processed by mechanical dissection and single-cell suspensions were freshly analyzed or cryopreserved. All cancer patients gave written informed consent and collection was approved by French Committee for the Protection of Persons (CPP; DC-2012-1654) as well as by local IUCT-Oncopole review boards.

Flow cytometry

Single cell suspensions were stained according to standard protocols with previously described anti-mouse and human antibodies listed in the STAR*Methods section. Antibodies were purchased from miltenyi biotec, eBioScience, BioLegend, or BD Biosciences. Surface staining was performed with mAbs for 30 min at 4°C in PBS supplemented with 2% FCS and 2 mM EDTA. MM patient CD8⁺ T cells were stained with PE-labeled HLA-A2/NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ (SLLMWITQA) multimers as described previously (Guillerey et al., 2018). For the intracellular staining, cells were fixed and permeabilized using BD Cytotfix/Cytoperm permeabilization kit (BD Biosciences) or Transcription Factor Fixation/Permeabilization kit (Thermofisher). Data were collected with LSR II or Fortessa X20 flow cytometers (BD Biosciences) and analyzed with

FlowJo software (TreeStar). Dead cells and doublets were excluded by LiveDead staining (Thermofisher).

CD8⁺ T cell isolation

Primary human tumor biopsies were manually dissociated and digested enzymatically with Tumor Dissociation Kit (Miltenyi Biotec) and then incubated at 37°C for half an hour. After incubation, digested tumors were mashed through 70µm filters and tumor infiltrating lymphocytes were enriched by using CD8 or CD45 microbeads (Miltenyi Biotec). CD8⁺ T cells were enriched with the appropriate negative selection kits (Miltenyi biotec) from Human PBMCs, MM patient's BM samples, Ovarian and lung cancer biopsies, mouse spleen or tumors and were stained in PBS with 0.5% SVF and 2 mM EDTA containing fluorochrome-conjugated antibodies listed in the listed in STAR*Methods section. The indicated CD8⁺ T cell subsets were then highly purified based on CD226, CD45RA and CD62L expression (human) or CD226, CD44 and CD62L expression (mouse) using Aria Fusion (BD biosciences) or MoFlo Astrios (Beckman Coulter) cell sorters.

Human T cell functional assays

The indicated CD8⁺ T cell subsets purified from HD or cancer patients were stimulated with plate bound α -CD3 mAbs (clone OKT3 or UCHT1, Bioxcell), anti-CD2/CD3/CD28 microbeads (T cell expansion kit, Miltenyi Biotec), CytoStim (Miltenyi Biotec), monocyte-derived allogeneic mature dendritic cells, CMVpp65 peptide pools (PepTivator[®] Miltenyi Biotec) or NY-ESO-1157-165 analog (SLLMWITQA, Peptide 2.0 Inc, 1 µg/ml) in RPMI 1640 medium (ThermoFisher Scientific) supplemented with 10% fetal bovine serum (ThermoFisher Scientific) and L-glutamine (SIGMA Aldrich). Intracellular cytokine staining was performed after 6 hrs in the presence of APC-conjugated α -CD107a (H4A3, BD bioscience) and Golgiplug (BD biosciences). Alternatively, cells were stained with Cell Trace Violet (CTV, Thermo Fisher Scientific) prior to stimulation followed by CTV dilution assessment 5 days later. Cytokine levels were measured in the cell culture supernatants by CBA (BD Biosciences) after 48 hrs. Cytotoxic capacities of CD8⁺ T cells were assessed in co-cultures with P815 mastocytoma cell line coated with the indicated concentrations of anti-CD3 mAbs at a 2:1 effector: target ratio. Where indicated, mAb against TIGIT (Clone MBSA43, Thermo Fisher scientific), CD96 (Clone NK92.39, Biolegend), CD226 (clone DX11, Abcam), CD112 (clone TX31, Biolegend), CD155 (clone SKII.4,

Biolegend) or LFA-1 (Clone TS1/18, BioXcell) or irrelevant IgG1 (clone MG1-45, Biolegend) were added to cultures at a final concentration of 10 μ g/ml. For the detection of the high-affinity form of LFA-1, CD8⁺ T cells were activated for 2 hrs. Previously described m24 mAb (Petit et al., 2016) directed against the extended/open high affinity conformation of LFA-1 (2 μ g/ml; clone 24, Biolegend) were added into the culture for the last 30 minutes of the assay.

Monocyte-derived mature dendritic cells

Monocytes were isolated from PBMCs with CD14⁺ immunomagnetic beads (Miltenyi Biotech) as described by the manufacturer recommendations. Isolated CD14⁺ cells were cultured in complete RPMI 1640 medium with GM-CSF (100 ng/mL) and IL-4 (50 ng/mL) for 5 days. Mature dendritic cells were obtained by adding TNF- α (50 ng/ml), IL-1 β (50 ng/ml) and IL-6 (50 ng/ml) for two additional days and used in functional assays after phenotypic analysis.

Lentiviral vector production

Human tagged CD226 cDNA (NM_006566, Origene) was cloned into PCDH-EF1-copGFP-T2A-Puro vectors kindly provided by Kazuhiro Oka (Addgene plasmid # 72263; <http://n2t.net/addgene:72263>; RRID : Addgene_72263). Lentivirus pseudotyped with a baboon retroviral envelope glycoprotein (BaEV-LVs) and measles virus glycoprotein-displaying LVs (hemagglutinin and fusion protein LVs [H/F-LVs]) that efficiently transduce IL-7 stimulated primary human T lymphocytes were used (Girard-Gagnepain et al., 2014; Levy et al., 2017). Self-inactivating HIV-1-derived vectors encoding CD226 and/or GFP, were generated by transfection of 293T cells as described in detail elsewhere (Levy et al., 2017). Eighteen hours after transfection, the medium was replaced by Opti-MEM supplemented with HEPES (Invitrogen). Viral supernatants were harvested 48 hrs after transfection and filtered. The vectors were concentrated at low speed overnight at 3000g at 4°C. Infectious titers (in transduction units [TU]/ml) were determined by fluorescence-activated cell sorting (FACS) of target cells using serial dilutions of the supernatants added to the 293T cells. Alternatively, highly concentrated CD226 and/or GFP Integrative lentiviral vectors™ that also efficiently transduce IL-7 stimulated primary human T lymphocytes were purchased (Flash Therapeutics) and used to transduce CD8⁺ T cells in proliferation and LFA-1 functional experiments.

Transductions of human CD8⁺ T cells

10⁵ FACS sorted CD226⁻ and CD226⁺ CD8⁺ Tems were cultured in RPMI complete medium supplemented with IL-7 (1-2 ng/ml) for 24 hrs and transduced with either control-GFP or CD226-GFP lentivirus on retronectin-coated 96-well plate at a MOI of 2-10. After 48 hrs, cells were analyzed for GFP expression and tested in functional assays.

TCR signaling analysis

Sorted CD226⁻ and CD226⁺ CD8⁺ Tem cells were stimulated with α -CD3 mAbs (10 μ g/ml; UCHT-1- Thermo fisher) followed by goat anti-mouse Fab'2 secondary antibody (20 μ g/ml; Jackson ImmunoResearch) cross-linking or with plate bound α -CD3 (OKT3, eBiosciences, 10 μ g/ml) for indicated time. Cells were then homogenized in RIPA lysis buffer (Sigma-Aldrich) supplemented with complete protease inhibitor tablet (Roche). Cell extracts were separated by SDS-PAGE and transferred onto PVDF membranes (Bio-Rad). Immunoblots were performed with phospho-specific antibodies (Cell Signaling Technology) to PLC γ 1 (Tyr783), ZAP-70 (Tyr319), LAT (Tyr191), ERK1/2 (Thr202 and Tyr204) and AKT (Ser473) followed by appropriate HRP-conjugated secondary antibodies (Cell Signalling technology). The proteins were visualized by ECL-Plus (GE Healthcare) using Pxi (Syngene) or ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare Life Sciences) imaging systems. For phospho-specific flow cytometry, purified CD8⁺ T cells were incubated with biotin-conjugated α -CD3 (10 μ g/ml; OKT3) for 15 min on ice, washed with ice-cold PBS and incubated with cross-linking anti-biotin secondary antibody on ice for additional 15 minutes. Cells were then stimulated at 37°C for the indicated times. Cells were fixed with pre-warmed Cytofix/Cytoperm solution (BD Biosciences) for 10 min and permeabilized with Perm III solution (BD Biosciences) for 30 min on ice. Cells were washed in FACS buffer solution and stained with anti-SLP76 (Y128) and anti-CD247 (Y142) for 1 hr and phosphoproteins were detected by flow cytometry. Investigation of intracellular calcium flux in CD8⁺ T cells was performed according to previous protocols (Lee et al., 2012) using Calcium Assay kit (BD Biosciences). Briefly calcium dye-loaded CD8⁺ T cells were coated with α -CD3 mAbs (10 μ g/ml; OKT3) for 15 min on ice, washed with ice-cold PBS and activated with goat anti-mouse Fab'2 secondary antibody at 37°C (13 μ g/ml) before flow cytometry analysis of calcium influx.

Confocal microscopy

Eight-well μ -slides (Ibidi) were coated overnight with poly-L-lysine (Sigma-Aldrich) and anti-CD3 (clone OKT3, 10 μ g/ml). 4×10^4 CD226⁻ or CD226⁺ CD8⁺ T cells freshly purified by FACS using AF488 conjugated anti-CD226 antibodies (Clone 11A8) were plated in complete medium for 2 hrs at 37°C. LFA-1 open extended conformation m24 antibody labelled with Alexa Fluor™ 647 Antibody Labeling Kit (thermofisher) was added for the last 30 min of the assay. After 3 washes (PBS, BSA 3%, HEPES 1%) cells were fixed in PBS containing 3% PFA for 3 min at 37°C. Nuclear counterstaining was performed with DAPI (1/3000) for 5 minutes at 37°C. Slides were mounted using Fluoromount™ medium (Thermofisher) and analysed under Fast Airyscan LSM880 Confocal microscope (Zeiss) with 60x oil objective. The cell intensity of each fluorochrome was quantified on 15 representative fields by condition using ImageJ software.

Library construction for RNA sequencing

Total RNA was extracted from freshly FACS purified CD226⁻ or CD226⁺ CD8⁺ T cells or activated for 24 hrs with anti-CD2/CD3/CD28 microbeads (T cell expansion kit, Miltenyi Biotec) using RNeasy micro kit (Qiagen) according to the manufacturer's instruction. The quality of the isolated total RNA from each sample was checked on 2200 TapeStation System (Agilent, Santa Clara, USA) using the RNA ScreenTape assay and the quantitation was performed using the NanoVue Plus Spectrophotometer (Biochrom Ltd, Cambridge, UK). 100-300 ng of total RNA per sample with a RNA integrity number >8 were used for library preparation. The RNA-Seq library preparation was performed using TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation kit (Illumina, San Diego, Calif) according to the manufacturer's instructions (High Sample Protocol). The RNA-Seq libraries were checked on the 2200 TapeStation System (Agilent) using the High-Sensitivity DNA 1000 ScreenTape assay. Libraries were quantified by qPCR on a LightCycler 480 System (Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, Calif) using KAPA Library Quantification Kit for Illumina platforms (Kapa Biosystems, Boston, Massachusetts). Libraries were then pooled in equal quantities, checked and quantified using same techniques (2200 TapeStation and LightCycler 480). Paired-end sequencing (2 x 150 bps) of these libraries was performed on a NextSeq 500 Illumina sequencing platform (Illumina) by 2 successive runs using NextSeq 500 High Output kit v2 (Illumina) generating in average 20 million pairs of reads per sample. RNA-Sequencing data from the CD138-fractions of 73 newly diagnosed MM patient BM aspirates have already been described (GSE63473; (Nakamura et al., 2018)).

RNA-seq bioinformatic analysis

Fastq files were aligned to the Ensembl GRCh38 human reference genome using STAR (version 2.4.2 (Dobin et al., 2013) and gene expression summary was obtained using the Subread featurecount algorithm (version 1.4.6) (Liao et al., 2014). Read counts were normalized using the DESeq function (Love et al., 2014) retaining only genes expressed (more than 10 aligned reads) in at least 50% of samples. *Principal component analysis* (PCA) was created from normalized reads as described previously (Varet et al., 2016). The R packages Sartools (<https://github.com/PF2-pasteur-fr/SARTools>) using DESeq2 (Love et al., 2014) was used to perform differential gene expression analysis (Love et al., 2015). Genes differentially expressed with p value <0.01 and FC>2 with Benjamini-Hochberg (BH) multiple testing correction at 1% false-discovery rate (FDR) were considered. To perform the gene set enrichment analysis, R fgSEA package was used to derive the absolute enrichment scores using C7 immunologic signatures (The signatures were generated by manual curation of published studies in human and mouse immunology) of the Molecular Signature Database version 6.0 (Subramanian et al., 2005).

TCGA transcriptomic analysis

Gene expression data (RNA-seq) of TCGA cohorts was accessed through the cBioportal for Cancer Genomics (<http://www.cbioportal.org>) using the R-based package CGDS-R and following the TCGA guidelines for the use of TCGA data (<https://cancergenome.nih.gov/>). For Kaplan-Meier plots, optimal cutoffs were determined with the survival R package and the Log-Rank p values were corrected using the Benjamini-Hochberg method.

Mouse Models

Mouse strains were maintained either in the SPF animal facility of the US006 CREFRE-Inserm/UPS which is accredited by the French Ministry of Agriculture (accreditation number A-31 55508) or in the SPF animal facility of the QIMR Berghofer Medical Research Institute. Tumor experiments used both male and female mice between 6 and 12 weeks of age. Donors and recipients of adoptive T cell transfers were sex matched. Animal experiments were

conducted and approved by the QIMR Berghofer Medical Research Institute Animal Ethics Committee and the Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (APAFIS#5614-20 16060815487810 v4) and are in compliance with the French and Australian regulations on care and protection of laboratory animals. For survival analysis, mice were monitored daily according to institutional ethic guidelines, and were euthanized when mice developed signs of reduced mobility including paralysis, hunched posture, or respiratory distress. All mice used in this study were on a C57BL/6 genetic background. WT mice were purchased from Janvier laboratories or from the Walter and Eliza Hall institute for Medical Research. *OT1* (Hogquist et al., 1994), *Pmel-1* (Overwijk et al., 2003), *Cd226^{-/-}* (Gilfillan et al., 2008), *Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}* (von Scheidt et al., 2014) and *Cd8^{-/-}* (Fung-Leung et al., 1991) have already been described. *Cd155^{-/-}* mice (Kamran et al., 2013) were kindly provided by the Dr Yoshimi Takai (Kobe University, Kobe, Japan). *Eomes^{fl/fl} x Cd4^{CRE}* mice (Zhu et al., 2010) were kindly provided by Anne Dejean (CPTP institute, Toulouse, France). Mice overexpressing Eomes under the hCD2 promoter (Istaces et al., 2019) were kindly provided by Stanislas Goriely (IMI, Gosselies, Belgium).

Cell lines, cell culture, plasmids and transduction

Well described MC38 colon cancer cell line, B16F10 melanoma cell line and variants expressing constitutively OVA protein (B16F10-OVA) or stably expressing the MHC-I molecule H-2Kb (B16K1) (Porgador et al., 1989) were used in this study. Cells were cultured in DMEM medium containing 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS). Cells were tested negatively for mycoplasma contamination and maintained in culture for a limited number of passages. Transplantable Vk*MYC MM cell line (Vk12653) were kindly provided by Bergsagel. L (Mayo clinic, USA). Transplantable MM cell line Vk12653 were generated and expanded as previously described (Chesi et al., 2008; Guillerey et al., 2015). Briefly, these cells were maintained in *Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}* mice to avoid contamination with host-derived lymphocytes as described previously (Guillerey et al., 2015).

Mouse tumor implantation, tumor digestion and tumor volume measurements

The left flank of mice was shaved and B16F10 (5×10^5), B16-OVA cells (5×10^5), B16K1 cells (10^6), MC38 (2×10^6) were injected subcutaneously (s.c.) in 100 μ l of PBS. Tumor volume were estimated by measuring the tumor size in two dimensions using a caliper. The tumor volume

was calculated according the formula (length x width² / 2). Tumors were measured three times per week. Mice were sacrificed at the indicated time points or when the estimated tumor volume reached 2 cm³. TILs were analyzed as previously described. Briefly, solid tumors were excised, manually dissociated and enzymatically digested with Tumor Dissociation Kit (Miltenyi Biotec) and then incubated at 37°C for 30 minutes. After incubation, digested tumors were mashed through 70µm filters and immune cells were enriched using CD45 microbeads (Miltenyi Biotec) before TILs analysis. Vk12653 MM cells (2×10^6) were injected i.v. into tail vein of indicated strains of mice. The percentage of monoclonal Ig in the serum was quantified by serum protein electrophoresis (Sebia Hydrasys system). The phenotype, percentage and number of BM B220⁻CD138⁺CD155⁺PCs and CD8⁺ TILs were analyzed by flow cytometry at the indicated time points as described previously (Guillerey et al., 2015).

Mouse T-cell functional assays

For cytokine production assays, total splenocytes, TILs or freshly isolated CD8⁺ T cells were stimulated with plate-bound anti-CD3 (3µg/ml; 145-2C11, BioLegend) and anti-CD28 (1 µg/ml; 37.51, BioLegend), ova-peptide (Sigma, 10 µg/mL) or with Phorbol myristate acetate (PMA; 50ng/ml, Sigma) and ionomycin (1µg/ml, Sigma) in the presence of Golgi Plug (BD biosciences) and/or Golgi Stop (BD Biosciences) for 5 hrs. Intracellular cytokine staining was performed as described above. For T cell proliferation assay, freshly sorted CD8⁺ T cells were loaded with CTV (Thermofisher) according to manufacturer's instructions prior to stimulation. CTV dilution was analyzed after 4 days. Cytokine levels were measured in the corresponding cell culture supernatants by Cytometric Bead Array (CBA from BD Biosciences) after 24-48 hrs.

Immune checkpoint blockade treatment

Immune checkpoint blockade treatment (ICB treatment) was started on palpable B16K1 tumors (25-50 mm³ volume). Briefly, groups of C57BL/6 wild type (WT) or *Cd226*^{-/-} mice were injected s.c. with B16K1 melanoma cells. Mice were treated on days 6, 9, 12 (relative to tumor inoculation) with clg (250µg i.p; 2A3, BioXCell) or anti-PD-1 (250µg i.p., RMP1-14). Some groups of WT mice received clg (250µg i.p), anti-CD8β (100µg i.p), anti-AsGM1 (50µg i.p) and/or anti-CD226 (250µg i.p., 480.1) on days 5, 6, 13 and 20. TILs phenotypic and functional analysis was performed one week after the end of the ICB treatment. Alternatively, MC38 (1×10^5) were s.c. injected into the indicated strains of mice in a final volume of 200µl (day 0).

Mice were treated on days 10, 14, 18 and 22 (relative to tumor inoculation) with clg (250µg i.p.; 2A3, BioXCell), anti-PD-1 (250µg i.p., RMP1-14, BioXCell) or anti-CTLA4 (100µg i.p., 9D9 IgG2a, BMS). Some groups of mice received clg (250µg i.p.) or anti-DNAM-1 (250µg i.p., 480.1) on days 9, 10, 14, 17, 20, 24 and 28. Digital callipers were used to measure the perpendicular diameters of each individual tumor every 2-4 days.

TNFR agonist treatment.

C57BL/6 WT, *Eomes^{fl/fl} x Cd4^{CRE}*, *OT-1* or *Pmel-1* mice were treated by i.p. injection with anti-CD137 mAbs (100µg; 3H3, BioXcell, twice a week), anti-mouse OX40 (200µg; OX-86, BioXcell, twice a week), anti-mouse GITR (200µg; DTA-1-, BioXcell, twice a week) or with control IgG (HRPN, BioXcell). After 2-3 weeks, lymphoid organs were isolated for CD8⁺ T cell phenotypic analysis and functional assays. For dose-response experiments, C57BL/6 mice were treated with 1, 10 or 100µg of anti-CD137 mAbs twice a week for 2 weeks.

Adoptive T cell Transfer experiments

For tumor adoptive transfer experiments, 10⁷ OT-1 splenocytes were injected i.v into WT mice that were subsequently injected s.c with B16F10 or B16F10-ova tumors (5 x 10⁵; s.c). After 19 days when the estimated tumor volume reached 1-2 cm³, CD8⁺ T cells were isolated from the spleen and tumors and analyzed for CD226 expression as described above. Alternatively, naïve CD226⁺ CD8⁺ T cells were isolated from the spleen of OT-1 using mouse CD8⁺ T cell isolation kit (Miltenyi Biotec) and FACSaria™ Fusion (BD biosciences). 10⁶ OT-1 cells were adoptively transferred by tail vein injection into *Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}* mice bearing B16F10 or B16F10-OVA tumors for 6 days (5 x 10⁵; s.c). One week later, CD8⁺ T cells were isolated from the spleen and tumors and analyzed for CD226 expression as described above. For anti-CD137 treatment adoptive transfer experiments, either 10⁶ naïve CD226⁺ CD8⁺ T cells or 10⁷ OT-1 splenocytes were transferred by tail vein injection into WT or *Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}* mice respectively. The blood was collected by retro-orbital puncture under isoflurane anesthesia 7 days later and CD8⁺ T cell phenotype was analyzed by flow cytometry. Mice were then treated with 3 injections of anti-CD137 mAbs (100 µg; 3H3 – BioXcell; i.p) or control IgG (HRPN – BioXcell) and lymphoid organs were collected for subsequent CD8⁺ T cells analysis by flow cytometry.

Adoptive Cell Transfer (ACT) Therapy

ACT immunotherapy was performed as previously described (Glodde et al., 2017). Briefly, when s.c. transplanted B16F10 melanomas reached a size of > 5mm in diameter mice were preconditioned by a single i.p. injection of 2mg (~100mg/kg) cyclophosphamide in 100 μ l PBS followed by intravenous delivery of 1×10^6 hgp100-specific CD226⁺ or CD226⁻ CD8⁺ *Pmel-1* T cells (in 200 μ l PBS) the next day. CD226⁺ or CD226⁻ *Pmel-1* T-cells were isolated by FACS from spleens from anti-CD137 mAbs treated mice as described above. 50 μ g of CpG 1826 (MWG Biotech) and 50 μ g of polyinosinic:polycytidylic acid (poly(I:C), Invivogen) in 100 μ l PBS were injected peritumorally 3, 6, and 9 days after adoptive *Pmel-1* T cell transfer and tumor growth and survival monitored.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 7 Software. Mann-Whitney U test or paired and unpaired student t test were used for single comparisons between two groups. For comparison of three or more groups, one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test, Holm-Sidak multiple test correction, or non-parametric Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison post-test were used. Differences in survival were evaluated with the Mantel-Cox test. $P < 0.05$ was considered statistically significant ($P < 0.05 = *$; $P < 0.01 = **$; $P < 0.001 = ***$).

REFERENCES

- Ahmadzadeh, M., Johnson, L.A., Heemskerk, B., Wunderlich, J.R., Dudley, M.E., White, D.E., and Rosenberg, S.A. (2009). Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood* *114*, 1537-1544.
- Attal, M., Lauwers-Cances, V., Hulin, C., Leleu, X., Caillot, D., Escoffre, M., Arnulf, B., Macro, M., Belhadj, K., Garderet, L., *et al.* (2017). Lenalidomide, Bortezomib, and Dexamethasone with Transplantation for Myeloma. *N Engl J Med* *376*, 1311-1320.
- Bachmann, M.F., McKall-Faienza, K., Schmits, R., Bouchard, D., Beach, J., Speiser, D.E., Mak, T.W., and Ohashi, P.S. (1997). Distinct roles for LFA-1 and CD28 during activation of naive T cells: adhesion versus costimulation. *Immunity* *7*, 549-557.
- Barber, D.L., Wherry, E.J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J.P., Sharpe, A.H., Freeman, G.J., and Ahmed, R. (2006). Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* *439*, 682-687.
- Bengsch, B., Ohtani, T., Khan, O., Setty, M., Manne, S., O'Brien, S., Gherardini, P.F., Herati, R.S., Huang, A.C., Chang, K.M., *et al.* (2018). Epigenomic-Guided Mass Cytometry Profiling Reveals Disease-Specific Features of Exhausted CD8 T Cells. *Immunity* *48*, 1029-1045 e1025.
- Bertrand, F., Montfort, A., Marcheteau, E., Imbert, C., Gilhodes, J., Filleron, T., Rochaix, P., Andrieu-Abadie, N., Levade, T., Meyer, N., *et al.* (2017). TNFalpha blockade overcomes resistance to anti-PD-1 in experimental melanoma. *Nat Commun* *8*, 2256.
- Bianchi, E., Denti, S., Granata, A., Bossi, G., Geginat, J., Villa, A., Rogge, L., and Pardi, R. (2000). Integrin LFA-1 interacts with the transcriptional co-activator JAB1 to modulate AP-1 activity. *Nature* *404*, 617-621.
- Blackburn, S.D., Shin, H., Freeman, G.J., and Wherry, E.J. (2008). Selective expansion of a subset of exhausted CD8 T cells by alphaPD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 15016-15021.
- Blackburn, S.D., Shin, H., Haining, W.N., Zou, T., Workman, C.J., Polley, A., Betts, M.R., Freeman, G.J., Vignali, D.A., and Wherry, E.J. (2009). Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol* *10*, 29-37.
- Blake, S.J., Dougall, W.C., Miles, J.J., Teng, M.W., and Smyth, M.J. (2016a). Molecular Pathways: Targeting CD96 and TIGIT for Cancer Immunotherapy. *Clin Cancer Res* *22*, 5183-5188.
- Blake, S.J., Stannard, K., Liu, J., Allen, S., Yong, M.C., Mittal, D., Aguilera, A.R., Miles, J.J., Lutzky, V.P., de Andrade, L.F., *et al.* (2016b). Suppression of Metastases Using a New Lymphocyte Checkpoint Target for Cancer Immunotherapy. *Cancer Discov* *6*, 446-459.
- Braun, M., Das, I., Roman, A., Sundarajan, A., Corvino, D., Kelly, G., Vari, F., Lepletier, A., Pearson, S., Madore, J., *et al.* Tumor CD155 Drives Resistance to Immunotherapy by Downregulating the Activating Receptor CD226 in CD8 + T Cells. *IMMUNITY under revision*
- Buggert, M., Tauriainen, J., Yamamoto, T., Frederiksen, J., Ivarsson, M.A., Michaelsson, J., Lund, O., Hejdeman, B., Jansson, M., Sonnerborg, A., *et al.* (2014). T-bet and Eomes are differentially linked to the exhausted phenotype of CD8+ T cells in HIV infection. *PLoS Pathog* *10*, e1004251.
- Chan, C.J., Martinet, L., Gilfillan, S., Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Chow, M.T., Town, L., Ritchie, D.S., Colonna, M., Andrews, D.M., and Smyth, M.J. (2014a). The receptors CD96 and CD226 oppose each other in the regulation of natural killer cell functions. *Nat Immunol* *15*, 431-438.

Chan, C.J., Smyth, M.J., and Martinet, L. (2014b). Molecular mechanisms of natural killer cell activation in response to cellular stress. *Cell Death Differ* 21, 5-14.

Chen, L., and Flies, D.B. (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* 13, 227-242.

Chesi, M., Robbiani, D.F., Sebag, M., Chng, W.J., Affer, M., Tiedemann, R., Valdez, R., Palmer, S.E., Haas, S.S., Stewart, A.K., *et al.* (2008). AID-dependent activation of a MYC transgene induces multiple myeloma in a conditional mouse model of post-germinal center malignancies. *Cancer Cell* 13, 167-180.

Chester, C., Sanmamed, M.F., Wang, J., and Melero, I. (2018). Immunotherapy targeting 4-1BB: mechanistic rationale, clinical results, and future strategies. *Blood* 131, 49-57.

Choi, B.K., Asai, T., Vinay, D.S., Kim, Y.H., and Kwon, B.S. (2006). 4-1BB-mediated amelioration of experimental autoimmune uveoretinitis is caused by indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent mechanisms. *Cytokine* 34, 233-242.

Comrie, W.A., Babich, A., and Burkhardt, J.K. (2015). F-actin flow drives affinity maturation and spatial organization of LFA-1 at the immunological synapse. *J Cell Biol* 208, 475-491.

Curran, M.A., Geiger, T.L., Montalvo, W., Kim, M., Reiner, S.L., Al-Shamkhani, A., Sun, J.C., and Allison, J.P. (2013). Systemic 4-1BB activation induces a novel T cell phenotype driven by high expression of Eomesodermin. *J Exp Med* 210, 743-755.

Danisch, S., Qiu, Q., Seth, S., Ravens, I., Dorsch, M., Shibuya, A., Shibuya, K., Forster, R., and Bernhardt, G. (2013). CD226 interaction with CD155 impacts on retention and negative selection of CD8 positive thymocytes as well as T cell differentiation to follicular helper cells in Peyer's Patches. *Immunobiology* 218, 152-158.

Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T.R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15-21.

Dustin, M.L., and Springer, T.A. (1989). T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* 341, 619-624.

Fung-Leung, W.P., Schilham, M.W., Rahemtulla, A., Kundig, T.M., Vollenweider, M., Potter, J., van Ewijk, W., and Mak, T.W. (1991). CD8 is needed for development of cytotoxic T cells but not helper T cells. *Cell* 65, 443-449.

Gaud, G., Roncagalli, R., Chaoui, K., Bernard, I., Familiades, J., Colacios, C., Kassem, S., Monsarrat, B., Burlet-Schiltz, O., de Peredo, A.G., *et al.* (2018). The costimulatory molecule CD226 signals through VAV1 to amplify TCR signals and promote IL-17 production by CD4(+) T cells. *Sci Signal* 11.

Gilfillan, S., Chan, C.J., Cella, M., Haynes, N.M., Rapaport, A.S., Boles, K.S., Andrews, D.M., Smyth, M.J., and Colonna, M. (2008). DNAM-1 promotes activation of cytotoxic lymphocytes by nonprofessional antigen-presenting cells and tumors. *J Exp Med* 205, 2965-2973.

Girard-Gagnepain, A., Amirache, F., Costa, C., Levy, C., Frecha, C., Fusil, F., Negre, D., Lavillette, D., Cosset, F.L., and Verhoeyen, E. (2014). Baboon envelope pseudotyped LVs outperform VSV-G-LVs for gene transfer into early-cytokine-stimulated and resting HSCs. *Blood* 124, 1221-1231.

Glodde, N., Bald, T., van den Boorn-Konijnenberg, D., Nakamura, K., O'Donnell, J.S., Szczepanski, S., Brandes, M., Eickhoff, S., Das, I., Shridhar, N., *et al.* (2017). Reactive Neutrophil Responses Dependent on the Receptor Tyrosine Kinase c-MET Limit Cancer Immunotherapy. *Immunity* 47, 789-802 e789.

Guillerey, C., Ferrari de Andrade, L., Vuckovic, S., Miles, K., Ngiow, S.F., Yong, M.C., Teng, M.W., Colonna, M., Ritchie, D.S., Chesi, M., *et al.* (2015). Immunosurveillance and therapy of multiple myeloma are CD226 dependent. *J Clin Invest* 125, 2077-2089.

Guillerey, C., Harjunpaa, H., Carrie, N., Kassem, S., Teo, T., Miles, K., Krumeich, S., Weulersse, M., Cuisinier, M., Stannard, K., *et al.* (2018). TIGIT immune checkpoint blockade restores CD8(+) T cell immunity against multiple myeloma. *Blood*.

Hogquist, K.A., Jameson, S.C., Heath, W.R., Howard, J.L., Bevan, M.J., and Carbone, F.R. (1994). T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 76, 17-27.

Hui, E., Cheung, J., Zhu, J., Su, X., Taylor, M.J., Wallweber, H.A., Sasmal, D.K., Huang, J., Kim, J.M., Mellman, I., and Vale, R.D. (2017). T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition. *Science* 355, 1428-1433.

Iguchi-Manaka, A., Kai, H., Yamashita, Y., Shibata, K., Tahara-Hanaoka, S., Honda, S., Yasui, T., Kikutani, H., Shibuya, K., and Shibuya, A. (2008). Accelerated tumor growth in mice deficient in DNAM-1 receptor. *J Exp Med* 205, 2959-2964.

Intlekofer, A.M., Takemoto, N., Wherry, E.J., Longworth, S.A., Northrup, J.T., Palanivel, V.R., Mullen, A.C., Gasink, C.R., Kaech, S.M., Miller, J.D., *et al.* (2005). Effector and memory CD8+ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nat Immunol* 6, 1236-1244.

Istaces, N., Splittgerber, M., Lima Silva, V., Nguyen, M., Thomas, S., Le, A., Achouri, Y., Calonne, E., Defrance, M., Fuks, F., *et al.* (2019). EOMES interacts with RUNX3 and BRG1 to promote innate memory cell formation through epigenetic reprogramming. *Nat Commun* 10, 3306.

Jin, H.S., Ko, M., Choi, D.S., Kim, J.H., Lee, D.H., Kang, S.H., Kim, I., Lee, H.J., Choi, E.K., Kim, K.P., *et al.* (2020). CD226hiCD8+ T cells are a prerequisite for anti-TIGIT immunotherapy. *Cancer Immunol Res*.

Johnston, R.J., Comps-Agrar, L., Hackney, J., Yu, X., Huseni, M., Yang, Y., Park, S., Javinal, V., Chiu, H., Irving, B., *et al.* (2014). The Immunoreceptor TIGIT Regulates Antitumor and Antiviral CD8(+) T Cell Effector Function. *Cancer Cell* 26, 923-937.

Kaech, S.M., and Cui, W. (2012). Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 12, 749-761.

Kamphorst, A.O., Wieland, A., Nasti, T., Yang, S., Zhang, R., Barber, D.L., Konieczny, B.T., Daugherty, C.Z., Koenig, L., Yu, K., *et al.* (2017). Rescue of exhausted CD8 T cells by PD-1-targeted therapies is CD28-dependent. *Science* 355, 1423-1427.

Kamran, N., Takai, Y., Miyoshi, J., Biswas, S.K., Wong, J.S., and Gasser, S. (2013). Toll-like receptor ligands induce expression of the costimulatory molecule CD155 on antigen-presenting cells. *PLoS One* 8, e54406.

Kim, Y.H., Choi, B.K., Shin, S.M., Kim, C.H., Oh, H.S., Park, S.H., Lee, D.G., Lee, M.J., Kim, K.H., Vinay, D.S., and Kwon, B.S. (2011). 4-1BB triggering ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by modulating the balance between Th17 and regulatory T cells. *J Immunol* 187, 1120-1128.

Koyama, M., Kuns, R.D., Olver, S.D., Lineburg, K.E., Lor, M., Teal, B.E., Raffelt, N.C., Leveque, L., Chan, C.J., Robb, R.J., *et al.* (2013). Promoting regulation via the inhibition of DNAM-1 after transplantation. *Blood* 121, 3511-3520.

Kurtulus, S., Sakuishi, K., Ngiow, S.F., Joller, N., Tan, D.J., Teng, M.W., Smyth, M.J., Kuchroo, V.K., and Anderson, A.C. (2015). TIGIT predominantly regulates the immune response via regulatory T cells. *J Clin Invest* 125, 4053-4062.

Landsberg, J., Kohlmeyer, J., Renn, M., Bald, T., Rogava, M., Cron, M., Fatho, M., Lennerz, V., Wolfel, T., Holzfel, M., and Tuting, T. (2012). Melanomas resist T-cell therapy through inflammation-induced reversible dedifferentiation. *Nature*.

Larkin, J., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Grob, J.J., Cowey, C.L., Lao, C.D., Schadendorf, D., Dummer, R., Smylie, M., Rutkowski, P., *et al.* (2015). Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med* 373, 23-34.

Lee, S.H., Toth, Z., Wong, L.Y., Brulois, K., Nguyen, J., Lee, J.Y., Zandi, E., and Jung, J.U. (2012). Novel Phosphorylations of IKK γ /NEMO. *mBio* 3, e00411-00412.

Levy, C., Amirache, F., Girard-Gagnepain, A., Frecha, C., Roman-Rodriguez, F.J., Bernadin, O., Costa, C., Negre, D., Gutierrez-Guerrero, A., Vranckx, L.S., *et al.* (2017). Measles virus envelope pseudotyped lentiviral vectors transduce quiescent human HSCs at an efficiency without precedent. *Blood Adv* 1, 2088-2104.

Li, J., He, Y., Hao, J., Ni, L., and Dong, C. (2018a). High Levels of Eomes Promote Exhaustion of Anti-tumor CD8(+) T Cells. *Front Immunol* 9, 2981.

Li, X.Y., Das, I., Lepletier, A., Addala, V., Bald, T., Stannard, K., Barkauskas, D., Liu, J., Aguilera, A.R., Takeda, K., *et al.* (2018b). CD155 loss enhances tumor suppression via combined host and tumor-intrinsic mechanisms. *J Clin Invest* 128, 2613-2625.

Liao, Y., Smyth, G.K., and Shi, W. (2014). featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30, 923-930.

Love, M.I., Anders, S., Kim, V., and Huber, W. (2015). RNA-Seq workflow: gene-level exploratory analysis and differential expression. *F1000Res* 4, 1070.

Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15, 550.

Lozano, E., Dominguez-Villar, M., Kuchroo, V., and Hafler, D.A. (2012). The TIGIT/CD226 axis regulates human T cell function. *J Immunol* 188, 3869-3875.

Lozano, E., Joller, N., Cao, Y., Kuchroo, V.K., and Hafler, D.A. (2013). The CD226/CD155 interaction regulates the proinflammatory (Th1/Th17)/anti-inflammatory (Th2) balance in humans. *Journal of immunology* 191, 3673-3680.

Maiti, A.K., Kim-Howard, X., Viswanathan, P., Guillen, L., Qian, X., Rojas-Villarraga, A., Sun, C., Canas, C., Tobon, G.J., Matsuda, K., *et al.* (2010). Non-synonymous variant (Gly307Ser) in CD226 is associated with susceptibility to multiple autoimmune diseases. *Rheumatology* 49, 1239-1244.

Martinet, L., Ferrari De Andrade, L., Guillerey, C., Lee, J.S., Liu, J., Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Hutchinson, D.S., Kolesnik, T.B., Nicholson, S.E., Huntington, N.D., and Smyth, M.J. (2015). DNAM-1 Expression Marks an Alternative Program of NK Cell Maturation. *Cell reports* 11, 85-97.

Martinet, L., and Smyth, M.J. (2015). Balancing natural killer cell activation through paired receptors. *Nat Rev Immunol* 15, 243-254.

Melero, I., Shuford, W.W., Newby, S.A., Aruffo, A., Ledbetter, J.A., Hellstrom, K.E., Mittler, R.S., and Chen, L. (1997). Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors. *Nat Med* 3, 682-685.

Nakamura, K., Kassem, S., Cleyne, A., Chretien, M.L., Guillerey, C., Putz, E.M., Bald, T., Forster, I., Vuckovic, S., Hill, G.R., *et al.* (2018). Dysregulated IL-18 Is a Key Driver of Immunosuppression and a Possible Therapeutic Target in the Multiple Myeloma Microenvironment. *Cancer Cell* 33, 634-648 e635.

Overwijk, W.W., Theoret, M.R., Finkelstein, S.E., Surman, D.R., de Jong, L.A., Vyth-Dreese, F.A., DelleMijn, T.A., Antony, P.A., Spiess, P.J., Palmer, D.C., *et al.* (2003). Tumor regression and autoimmunity after reversal of a functionally tolerant state of self-reactive CD8+ T cells. *J Exp Med* 198, 569-580.

Paley, M.A., Kroy, D.C., Odorizzi, P.M., Johnnidis, J.B., Dolfi, D.V., Barnett, B.E., Bikoff, E.K., Robertson, E.J., Lauer, G.M., Reiner, S.L., and Wherry, E.J. (2012). Progenitor and terminal subsets of CD8+ T cells cooperate to contain chronic viral infection. *Science* 338, 1220-1225.

Pauken, K.E., Sammons, M.A., Odorizzi, P.M., Manne, S., Godec, J., Khan, O., Drake, A.M., Chen, Z., Sen, D.R., Kurachi, M., *et al.* (2016). Epigenetic stability of exhausted T cells limits durability of reinvigoration by PD-1 blockade. *Science* *354*, 1160-1165.

Perez, O.D., Mitchell, D., Jager, G.C., South, S., Murriel, C., McBride, J., Herzenberg, L.A., Kinoshita, S., and Nolan, G.P. (2003). Leukocyte functional antigen 1 lowers T cell activation thresholds and signaling through cytohesin-1 and Jun-activating binding protein 1. *Nat Immunol* *4*, 1083-1092.

Petit, A.E., Demotte, N., Scheid, B., Wildmann, C., Bigirimana, R., Gordon-Alonso, M., Carrasco, J., Valitutti, S., Godelaine, D., and van der Bruggen, P. (2016). A major secretory defect of tumour-infiltrating T lymphocytes due to galectin impairing LFA-1-mediated synapse completion. *Nat Commun* *7*, 12242.

Philip, M., Fairchild, L., Sun, L., Horste, E.L., Camara, S., Shakiba, M., Scott, A.C., Viale, A., Lauer, P., Merghoub, T., *et al.* (2017). Chromatin states define tumour-specific T cell dysfunction and reprogramming. *Nature* *545*, 452-456.

Porgador, A., Feldman, M., and Eisenbach, L. (1989). H-2Kb transfection of B16 melanoma cells results in reduced tumourigenicity and metastatic competence. *J Immunogenet* *16*, 291-303.

Qiu, Q., Ravens, I., Seth, S., Rathinasamy, A., Maier, M.K., Davalos-Misslitz, A., Forster, R., and Bernhardt, G. (2010). CD155 is involved in negative selection and is required to retain terminally maturing CD8 T cells in thymus. *J Immunol* *184*, 1681-1689.

Ralston, K.J., Hird, S.L., Zhang, X., Scott, J.L., Jin, B., Thorne, R.F., Berndt, M.C., Boyd, A.W., and Burns, G.F. (2004). The LFA-1-associated molecule PTA-1 (CD226) on T cells forms a dynamic molecular complex with protein 4.1G and human discs large. *J Biol Chem* *279*, 33816-33828.

Rizvi, N.A., Hellmann, M.D., Snyder, A., Kvistborg, P., Makarov, V., Havel, J.J., Lee, W., Yuan, J., Wong, P., Ho, T.S., *et al.* (2015). Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* *348*, 124-128.

Robert, C., Long, G.V., Brady, B., Dutriaux, C., Maio, M., Mortier, L., Hassel, J.C., Rutkowski, P., McNeil, C., Kalinka-Warzocha, E., *et al.* (2015). Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med* *372*, 320-330.

Robert, C., Thomas, L., Bondarenko, I., O'Day, S., M, D.J., Garbe, C., Lebbe, C., Baurain, J.F., Testori, A., Grob, J.J., *et al.* (2011). Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med* *364*, 2517-2526.

Sabatos, C.A., Doh, J., Chakravarti, S., Friedman, R.S., Pandurangi, P.G., Tooley, A.J., and Krummel, M.F. (2008). A synaptic basis for paracrine interleukin-2 signaling during homotypic T cell interaction. *Immunity* *29*, 238-248.

Schumacher, T.N., and Schreiber, R.D. (2015). Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* *348*, 69-74.

Scott, A.C., Dundar, F., Zumbo, P., Chandran, S.S., Klebanoff, C.A., Shakiba, M., Trivedi, P., Menocal, L., Appleby, H., Camara, S., *et al.* (2019). TOX is a critical regulator of tumour-specific T cell differentiation. *Nature* *571*, 270-274.

Seo, S.K., Choi, J.H., Kim, Y.H., Kang, W.J., Park, H.Y., Suh, J.H., Choi, B.K., Vinay, D.S., and Kwon, B.S. (2004). 4-1BB-mediated immunotherapy of rheumatoid arthritis. *Nat Med* *10*, 1088-1094.

Seth, S., Qiu, Q., Danisch, S., Maier, M.K., Braun, A., Ravens, I., Czeloth, N., Hyde, R., Dittrich-Breiholz, O., Forster, R., and Bernhardt, G. (2011). Intranodal interaction with dendritic cells dynamically regulates surface expression of the co-stimulatory receptor CD226 protein on murine T cells. *J Biol Chem* *286*, 39153-39163.

Shibuya, A., Campbell, D., Hannum, C., Yssel, H., Franz-Bacon, K., McClanahan, T., Kitamura, T., Nicholl, J., Sutherland, G.R., Lanier, L.L., and Phillips, J.H. (1996). DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. *Immunity* *4*, 573-581.

Shibuya, K., Lanier, L.L., Phillips, J.H., Ochs, H.D., Shimizu, K., Nakayama, E., Nakauchi, H., and Shibuya, A. (1999). Physical and functional association of LFA-1 with DNAM-1 adhesion molecule. *Immunity* *11*, 615-623.

Shibuya, K., Shirakawa, J., Kameyama, T., Honda, S., Tahara-Hanaoka, S., Miyamoto, A., Onodera, M., Sumida, T., Nakauchi, H., Miyoshi, H., and Shibuya, A. (2003). CD226 (DNAM-1) is involved in lymphocyte function-associated antigen 1 costimulatory signal for naive T cell differentiation and proliferation. *J Exp Med* *198*, 1829-1839.

Shirakawa, J., Shibuya, K., and Shibuya, A. (2005). Requirement of the serine at residue 329 for lipid raft recruitment of DNAM-1 (CD226). *Int Immunol* *17*, 217-223.

Shirakawa, J., Wang, Y., Tahara-Hanaoka, S., Honda, S., Shibuya, K., and Shibuya, A. (2006). LFA-1-dependent lipid raft recruitment of DNAM-1 (CD226) in CD4+ T cell. *Int Immunol* *18*, 951-957.

Song, G., Bae, S.C., Choi, S., Ji, J., and Lee, Y. (2012). Association between the CD226 rs763361 polymorphism and susceptibility to autoimmune diseases: a meta-analysis. *Lupus* *21*, 1522-1530.

Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S., and Mesirov, J.P. (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 15545-15550.

Sun, Y., Lin, X., Chen, H.M., Wu, Q., Subudhi, S.K., Chen, L., and Fu, Y.X. (2002). Administration of agonistic anti-4-1BB monoclonal antibody leads to the amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* *168*, 1457-1465.

Tahara-Hanaoka, S., Shibuya, K., Kai, H., Miyamoto, A., Morikawa, Y., Ohkochi, N., Honda, S., and Shibuya, A. (2006). Tumor rejection by the poliovirus receptor family ligands of the DNAM-1 (CD226) receptor. *Blood* *107*, 1491-1496.

Thommen, D.S., Koelzer, V.H., Herzig, P., Roller, A., Trefny, M., Dimeloe, S., Kiialainen, A., Hanhart, J., Schill, C., Hess, C., *et al.* (2018). A transcriptionally and functionally distinct PD-1(+) CD8(+) T cell pool with predictive potential in non-small-cell lung cancer treated with PD-1 blockade. *Nat Med* *24*, 994-1004.

Thommen, D.S., and Schumacher, T.N. (2018). T Cell Dysfunction in Cancer. *Cancer Cell* *33*, 547-562.

Todd, J.A., Walker, N.M., Cooper, J.D., Smyth, D.J., Downes, K., Plagnol, V., Bailey, R., Nejentsev, S., Field, S.F., Payne, F., *et al.* (2007). Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nat Genet* *39*, 857-864.

Topalian, S.L., Hodi, F.S., Brahmer, J.R., Gettinger, S.N., Smith, D.C., McDermott, D.F., Powderly, J.D., Carvajal, R.D., Sosman, J.A., Atkins, M.B., *et al.* (2012). Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* *366*, 2443-2454.

Tumeh, P.C., Harview, C.L., Yearley, J.H., Shintaku, I.P., Taylor, E.J., Robert, L., Chmielowski, B., Spasic, M., Henry, G., Ciobanu, V., *et al.* (2014). PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* *515*, 568-571.

Varet, H., Brillet-Gueguen, L., Coppee, J.Y., and Dillies, M.A. (2016). SARTools: A DESeq2- and EdgeR-Based R Pipeline for Comprehensive Differential Analysis of RNA-Seq Data. *PLoS One* *11*, e0157022.

von Scheidt, B., Leung, P.S., Yong, M.C., Zhang, Y., Towne, J.E., Smyth, M.J., and Teng, M.W. (2014). Combined anti-CD40 and anti-IL-23 monoclonal antibody therapy effectively suppresses tumor growth and metastases. *Cancer Res.*

Wang, B., Zhang, W., Jankovic, V., Golubov, J., Poon, P., Oswald, E.M., Gurer, C., Wei, J., Ramos, I., Wu, Q., *et al.* (2018). Combination cancer immunotherapy targeting PD-1 and GITR can rescue CD8(+) T cell dysfunction and maintain memory phenotype. *Sci Immunol* 3.

Wherry, E.J. (2011). T cell exhaustion. *Nat Immunol* 12, 492-499.

Wherry, E.J., and Kurachi, M. (2015). Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nature reviews. Immunology* 15, 486-499.

Zhang, Z., Wu, N., Lu, Y., Davidson, D., Colonna, M., and Veillette, A. (2015). DNAM-1 controls NK cell activation via an ITT-like motif. *J Exp Med* 212, 2165-2182.

Zhu, Y., Ju, S., Chen, E., Dai, S., Li, C., Morel, P., Liu, L., Zhang, X., and Lu, B. (2010). T-bet and eomesodermin are required for T cell-mediated antitumor immune responses. *J Immunol* 185, 3174-3183.

Zhu, Y., Panicia, A., Schulick, A.C., Chen, W., Koenig, M.R., Byers, J.T., Yao, S., Bevers, S., and Edil, B.H. (2016). Identification of CD112R as a novel checkpoint for human T cells. *J Exp Med* 213, 167-176.

Zumwalde, N.A., Domae, E., Mescher, M.F., and Shimizu, Y. (2013). ICAM-1-dependent homotypic aggregates regulate CD8 T cell effector function and differentiation during T cell activation. *J Immunol* 191, 3681-3693.

Figure 1

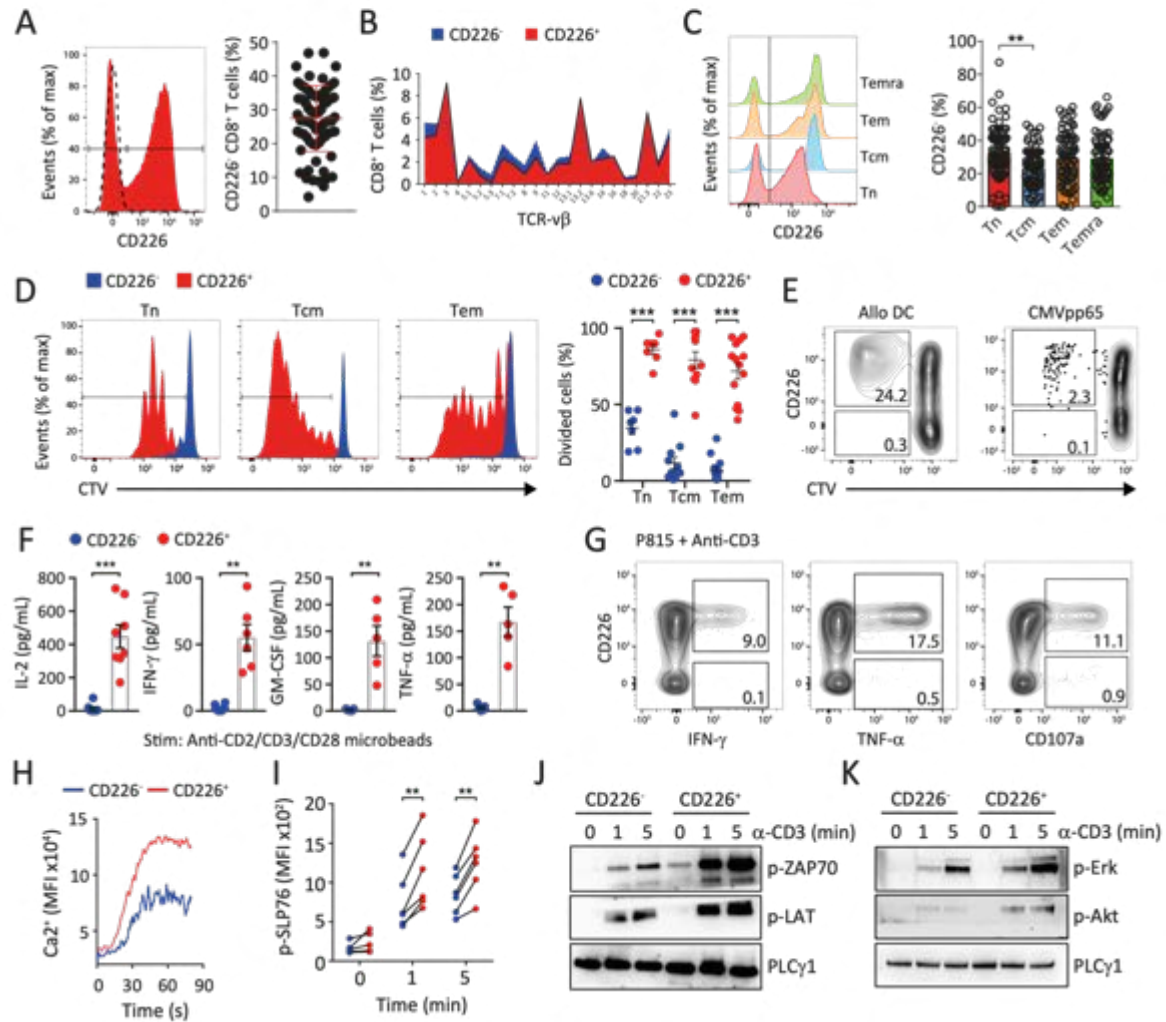


Figure 2

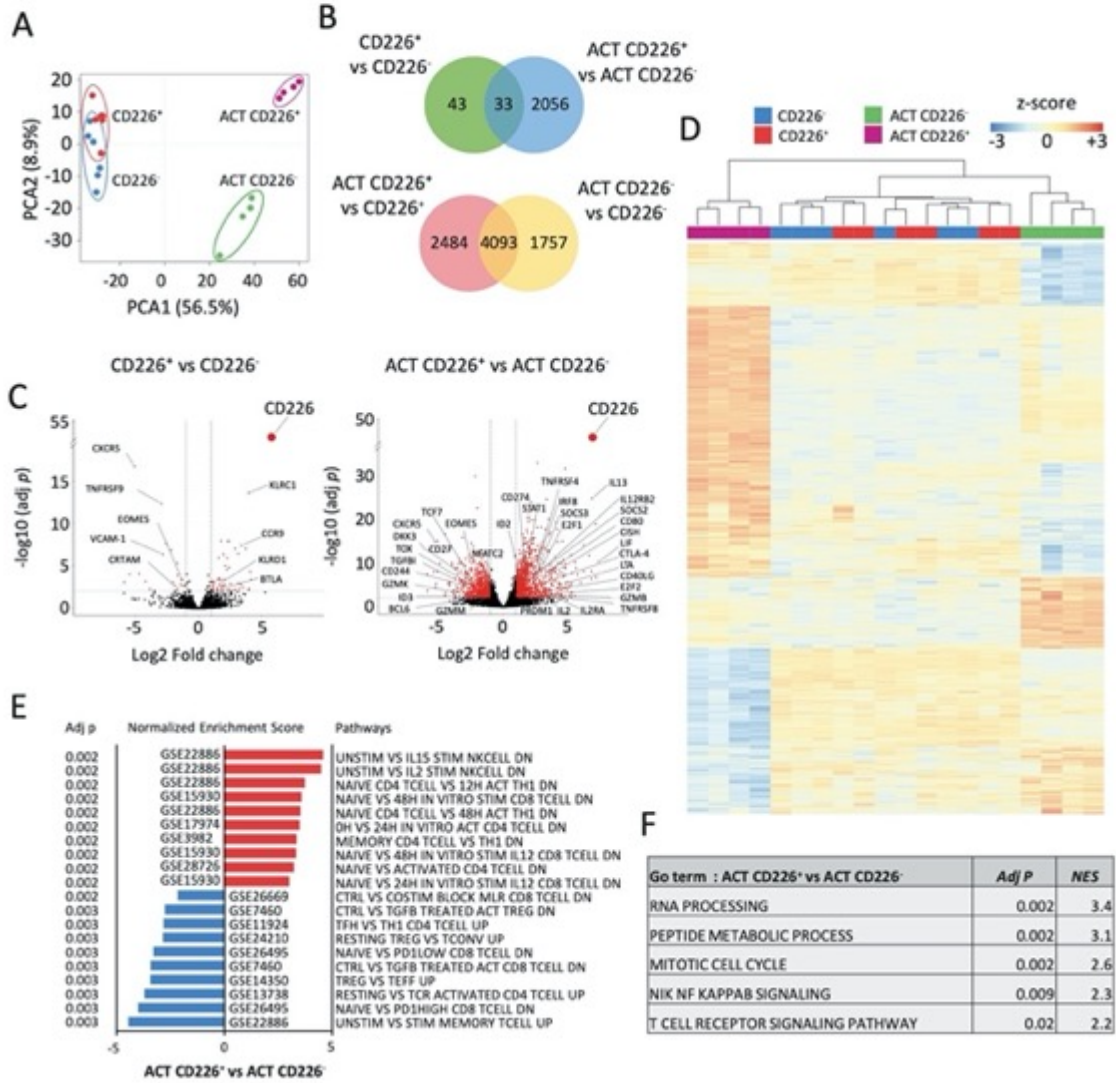


Figure 3

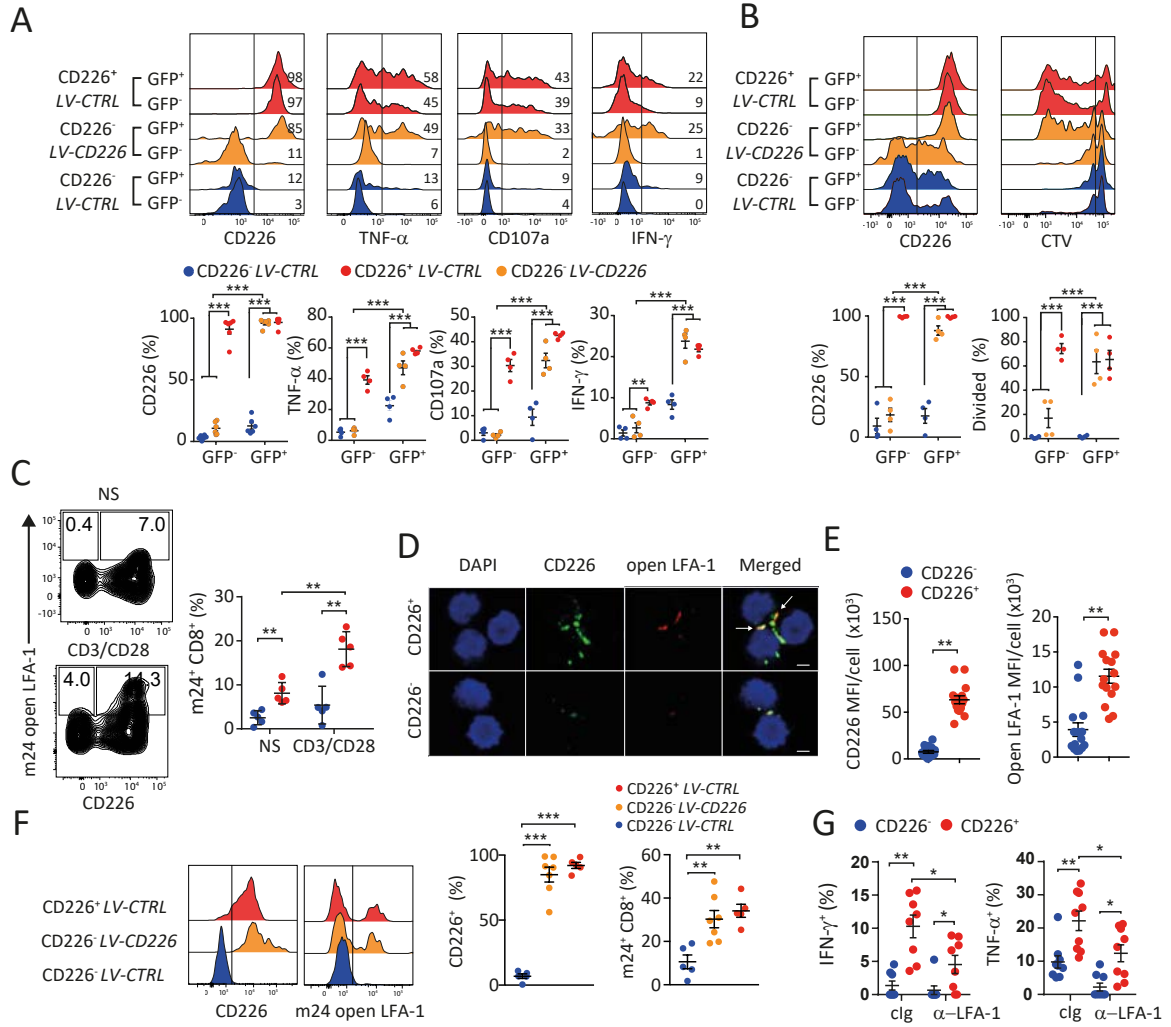


Figure 4

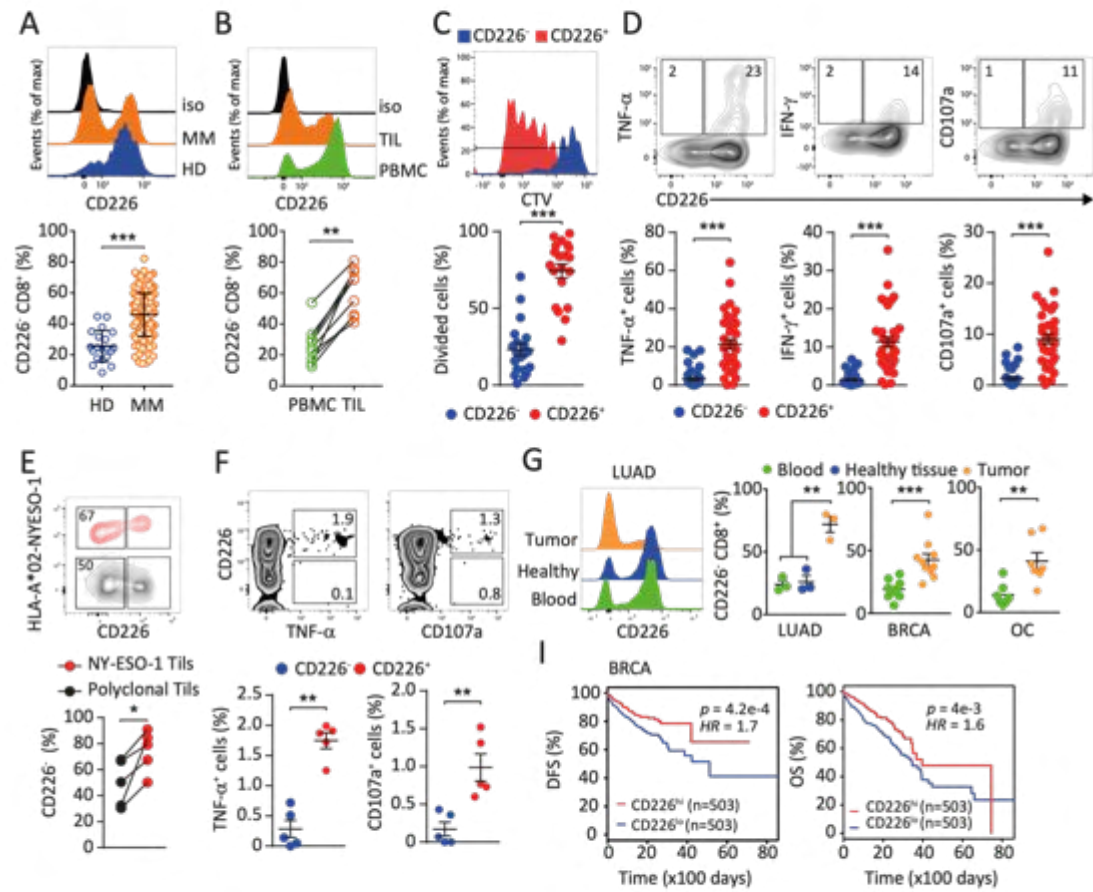


Figure 5

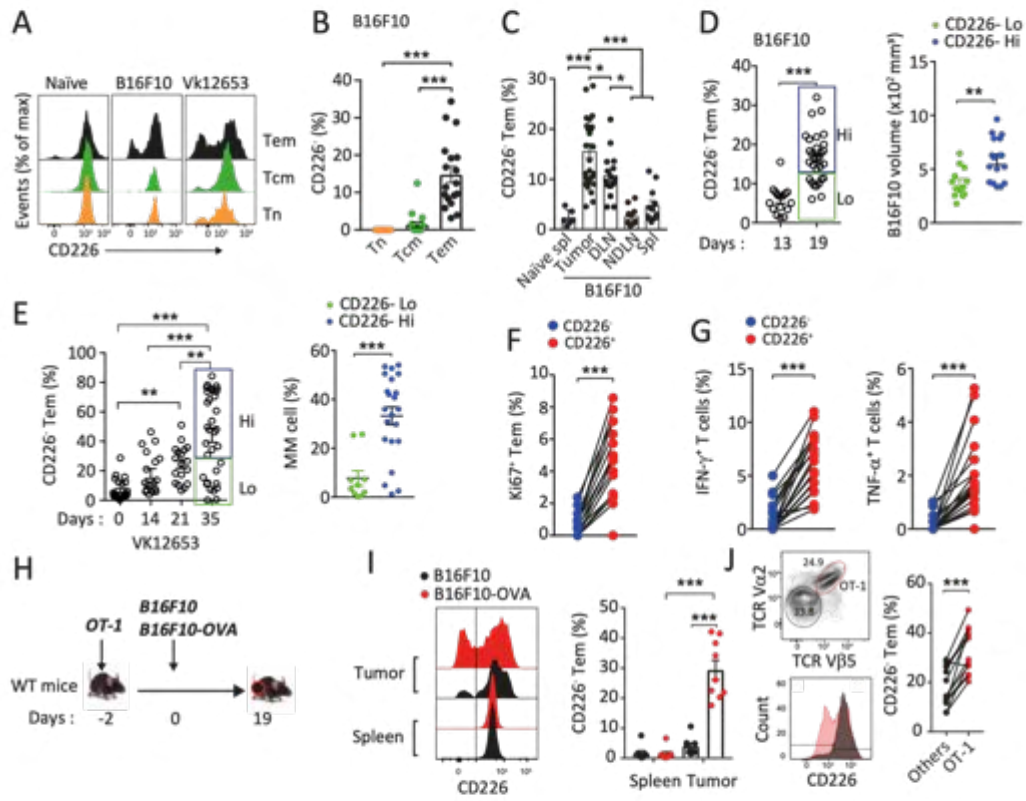


Figure 6

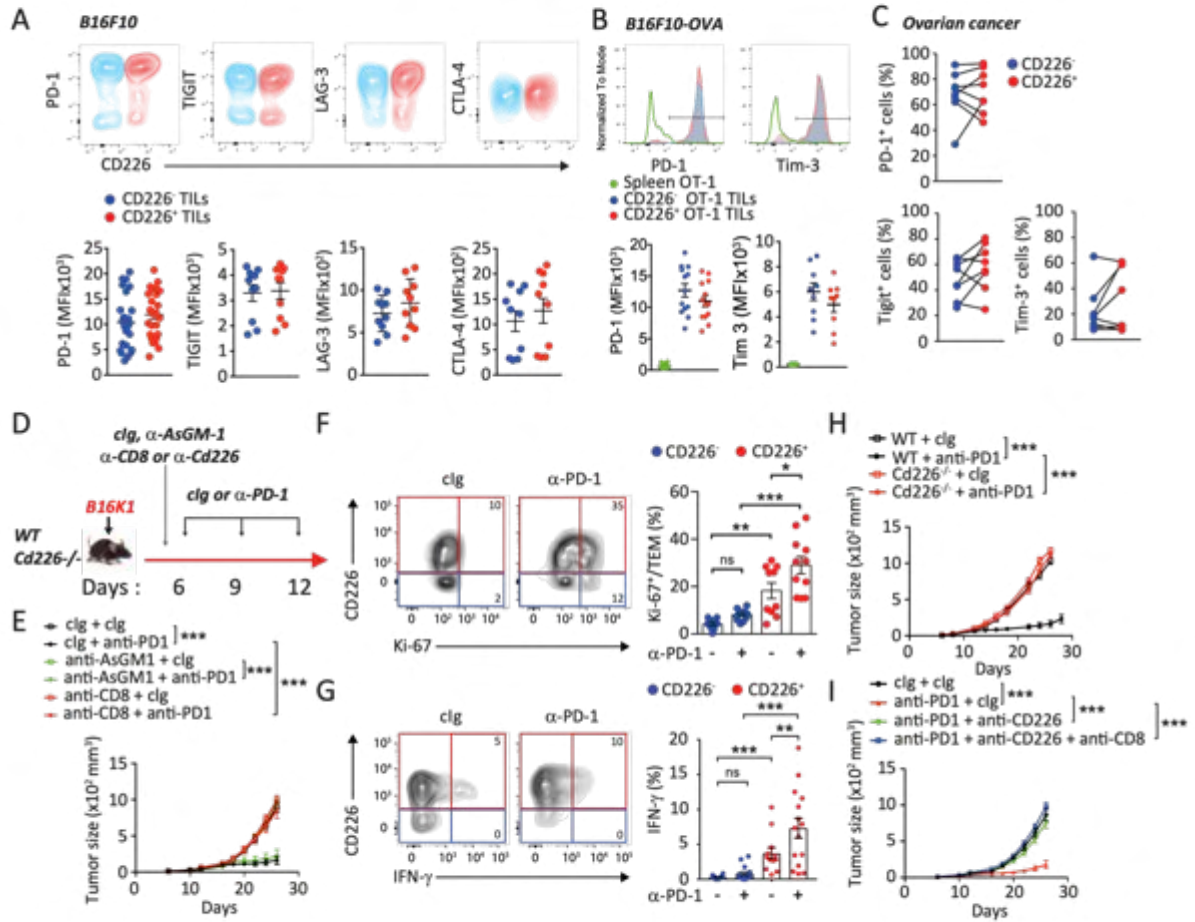


Figure 7

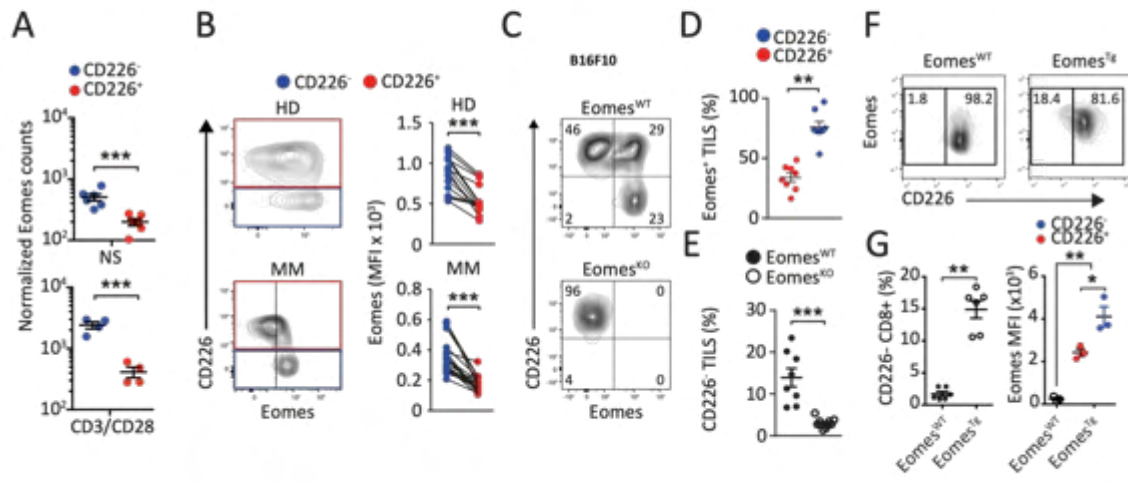
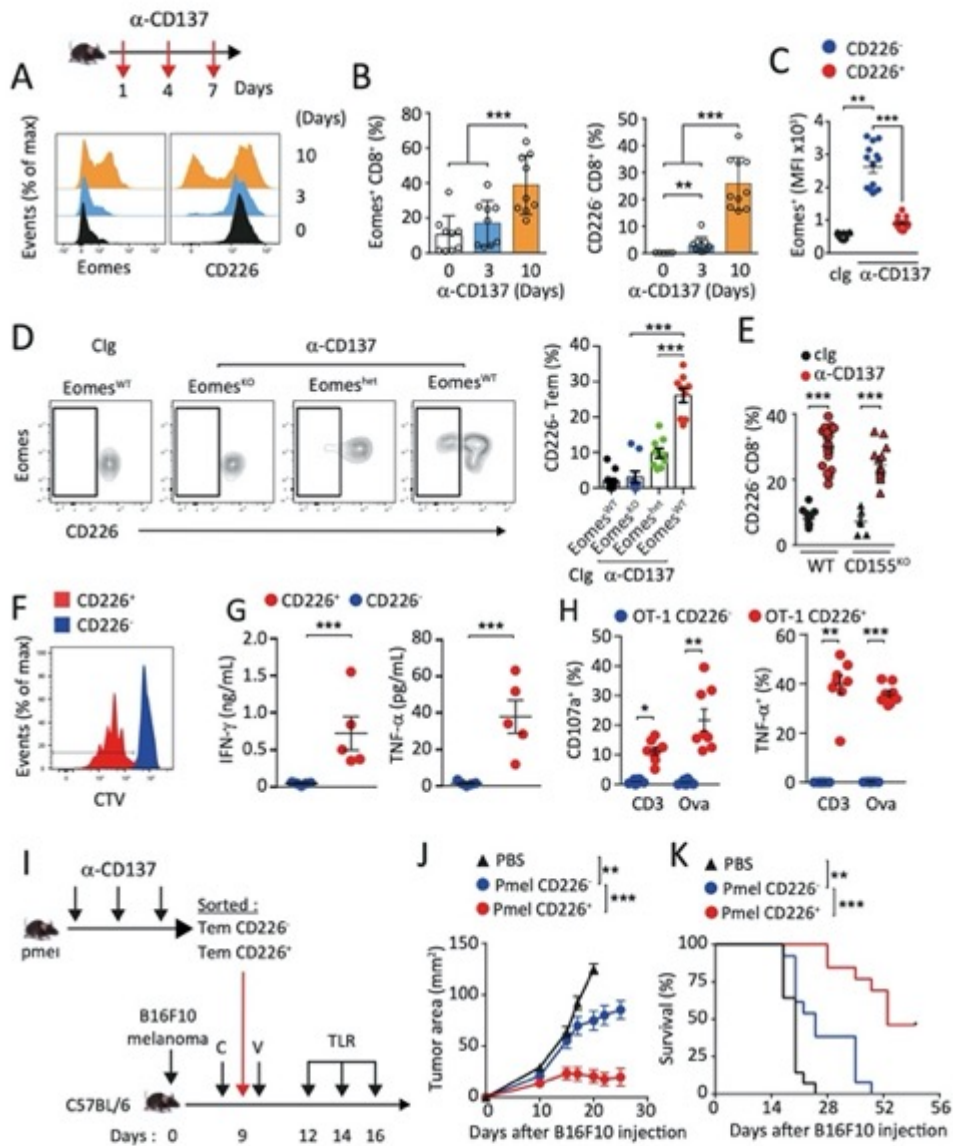


Figure 8




II. Article 4 : Article publié en co-auteur

Prat M., Le Naour A., Coulson K., Lemée F., Leray H., Jacquemin G., Chirine Rahabi M., Lemaitre L., Authier H, Ferron G, Barret J M., Martinez A., Ayyoub M., Delord J P., Gladieff L., Tabah-Fisch I., Prost J F., Couderc B and Coste A.

Circulating CD14 high CD16 low Intermediate Blood Monocytes as a Biomarker of Ascites Immune Status and Ovarian Cancer Progression.

Circulating CD14^{high} CD16^{low} intermediate blood monocytes as a biomarker of ascites immune status and ovarian cancer progression

Mélissa Prat,^{1,2} Augustin Le Naour,^{1,2,3,4} Kimberley Coulson,^{1,2} Fanny Lemée,⁵ Héliène Leray,^{3,4} Godefroy Jacquemin,^{1,2} Mouna Chirine Rahabi,^{1,2} Léa Lemaître,^{3,4} Héliène Authier,^{1,2} Gwenaél Ferron,⁴ Jean-Marc Barret,⁵ Alejandra Martinez,⁴ Maha Ayyoub,³ Jean-Pierre Delord,⁴ Laurence Gladieff,⁴ Isabelle Tabah-Fisch,⁵ Jean-François Prost,⁵ Bettina Couderc,^{3,4} Agnès Coste ^{1,2}

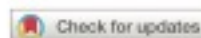
To cite: Prat M, Le Naour A, Coulson K, et al. Circulating CD14^{high} CD16^{low} intermediate blood monocytes as a biomarker of ascites immune status and ovarian cancer progression. *Journal for Immunotherapy of Cancer* 2020;**8**:e000472. doi:10.1136/jitc-2019-000472

► Additional material is published online only. To view, please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/jitc-2019-000472>).

MP and ALN contributed equally.

BC and AC are joint senior authors.

Accepted 02 May 2020



© Author(s) (or their employer(s)) 2020. Re-use permitted under CC BY-NC. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ.

For numbered affiliations see end of article.

Correspondence to
Dr Agnès Coste;
agnes.coste@univ-tlse3.fr

ABSTRACT

Background Besides the interest of an early detection of ovarian cancer, there is an urgent need for new predictive and prognostic biomarkers of tumor development and cancer treatment. In healthy patients, circulating blood monocytes are typically subdivided into classical (85%), intermediate (5%) and non-classical (10%) populations. Although these circulating monocyte subsets have been suggested as biomarkers in several diseases, few studies have investigated their potential as a predictive signature for tumor immune status, tumor growth and treatment adaptation.

Methods In this study, we used a homogeneous cohort of 28 chemotherapy-naïve patients with ovarian cancer to evaluate monocyte subsets as biomarkers of the ascites immunological status. We evaluated the correlations between circulating monocyte subsets and immune cells and tumor burden in peritoneal ascites. Moreover, to validate the use of circulating monocyte subsets to follow tumor progression and treatment response, we characterized blood monocytes from ovarian cancer patients included in a phase 1 clinical trial at baseline and following murlentamab treatment.

Results We demonstrate here a robust expansion of the intermediate blood monocytes (IBMs) in ovarian cancer patients. We establish a significant positive correlation between IBM percentage and tumor-associated macrophages with a CCR2^{high}/CD163^{high}/CD206^{high}/CD86^{low} profile. Moreover, IBM expansion is associated with a decreased effector/regulatory T-cell ratio in ascites and with the presence of soluble immunosuppressive mediators. We also establish that IBM proportion positively correlates with the peritoneum tumor burden. Finally, the study of IBMs in patients with ovarian cancer under immunotherapy during the phase clinical trial supports IBMs to follow the evolution of tumor development and the treatment adaptation.

Conclusions This study, which links IBM level with immunosuppression and tumor burden in peritoneum, identifies IBMs as a potential predictive signature of ascites immune status and as a biomarker of ovarian cancer development and treatment response.

Trial registration number EudraCT: 2015-004252-22
NCT02978755.

INTRODUCTION

Ovarian cancer is the second most common gynecological malignancy and the fourth leading cause of cancer deaths in women.¹ For the past 20 years, the standard treatment has been surgical debulking of tumors followed by chemotherapy with platinum salts and taxanes in combination. Despite an initial clinical response in most patients (70%–80%), recurrence and acquired resistance to platinum salts frequently occur.² The 5-year survival rate for patients with ovarian cancer is still only 30%, even with the application of promising new therapeutic agents, such as between other angiogenesis inhibitors, poly-ADP-ribose polymerase inhibitors³ or inducers of apoptosis like second mitochondria-derived activator of caspase mimetics.⁴ The poor prognosis of ovarian cancers can be explained by the fact that it is still difficult (1) to detect ovarian cancer at an early stage, (2) to monitor patients' response to cancer treatment and adapt therapeutics, and (3) to predict and detect resistance to drugs. In this context, there is an urgent need of new predictive and prognostic biomarkers. However, to date, there is no effective screening tool for this peritoneal cancer, and one of the best few available tumor biomarker, the serum cancer antigen 125 (CA125), has a sensitivity of only 50%.⁵ Recently, the risk of ovarian malignancy algorithm, which combines the serum levels of CA125, human epididymis-specific protein 4 and the patients' menopausal status, has been proposed to evaluate the risk of malignancy.⁶

However, this algorithm has not been evaluated as predictive biomarker of ovarian cancer in large cohorts.

Several authors have suggested that monocyte subsets in the peripheral blood should be evaluated as biomarkers in several diseases.⁷ Monocytes can be classified into three subsets according to CD14 and CD16 surface marker expression.⁷ In healthy donors, the predominant subset, classical monocytes (CD14^{high} CD16^{neg}), accounts for approximately 85% of the total monocyte population. Of the remaining 15%, 10% are non-classical monocytes (CD14^{low} CD16^{high}) and 5% are intermediate monocytes (CD14^{high} CD16^{int}). An expansion of the CD16-positive monocytes has been well described in different types of diseases, mostly in infectious or inflammatory conditions.⁷ This expansion has also been described in some malignancies, and the frequency of CD16-positive monocytes has been related to tumor size and stage in breast cancer,⁸ to the invasive character of cholangiocarcinoma⁹ or to poor patients' response to immunotherapy in melanoma.¹⁰

Sixty percent of women who are diagnosed with ovarian cancer present an extensive peritoneal carcinomatosis associated with the development of tumor ascites. This peritoneal fluid is a reservoir of a complex mixture of soluble factors and cellular components which provide an immunosuppressive and tumor-promoting microenvironment.^{11–13} Thus, the identification of specific subsets of circulating blood monocytes, which are induced by disease progression and whose expansion can be correlated with the immunological status of peritoneal ascites, may be an interesting approach to predict the disease course. Here, we established a homogeneous cohort of 28 patients diagnosed with ovarian cancer and characterized circulating blood monocytes and immune cells from peritoneal ascites at diagnosis. Moreover, to determine the potential of circulating monocyte subsets as a biomarker to follow tumor progression and to assess treatment efficiency, particularly immunotherapies, we also analyzed circulating blood monocytes from patients with ovarian cancer included in a phase I clinical trial with GM102, also named murlentamab (a low-fucose humanized IgG subclass 1 (IgG1) anti-Müllerian hormone receptor type 2 (AMHR2) antibody) at baseline and following treatment. GM102 targets AMHR2, which is expressed in 96% of human primary granulosa cell tumors¹⁴ and in around 70% of ovarian cancer cells.¹⁵

We demonstrate here an increase in the intermediate blood monocyte (IBM) subset in patients with ovarian cancer. This increase is positively correlated with the protumoral and immunosuppressive microenvironment of peritoneal ascites and with the peritoneum tumor burden. This study demonstrates that the frequency of blood monocyte populations reflects the situation in the peritoneum and identifies circulating monocyte subsets as a potential predictive signature for ovarian cancer progression at diagnosis and following treatments.

Finally, the results obtained from patients included in a phase I clinical trial under GM102 reinforce the use of

blood monocyte profiling as a new strategy to follow up tumor growth and treatment response.

MATERIALS AND METHODS

Ascites fluid and blood sample collection

Ascitic fluids and blood samples from individuals with ovarian cancer were collected from chemotherapy-naïve patients who underwent a tumor surgical resection at the Claudius Regaud Institute (IUCT Oncopole, Toulouse, France). We also analyzed blood samples of patients included in a phase I multicentric clinical trial who underwent an immunotherapy treatment with murlentamab (GM102, a low-fucose IgG1 anti-AMHR2 antibody). Only blood samples from the six patients managed by IUCT were analyzed. The progression of the disease was established by the analysis of tumor markers (CA125 or inhibin B) and of tumor lesions evaluated by Response Evaluation Criteria In Solid Tumors (RECIST V.1.1). Blood samples from healthy volunteers were provided by the French Blood Establishment (EFS).

Isolation of mononuclear cells from blood and ascites

Blood samples and ascitic fluids were obtained using an aseptic technique from 28 chemotherapy-naïve patients with ovarian cancer. Blood samples were also obtained from seven healthy subjects and from six patients with ovarian cancer who underwent a tumor-targeted immunotherapy treatment.

Mononuclear cells were isolated from patients' blood and ascites with a Ficoll density gradient (Lymphoprep, Stemcell Technologies). The fractions containing peripheral blood mononuclear cells or ascitic mononuclear cells were then washed two times. Cell number was evaluated and 250 000 cells were stained for flow cytometry analysis.

Flow cytometry

All analyses were gated on viable cells after live/dead staining (Molecular Probes LIVE/DEAD Fixable Violet Dead Cell Stain Kit, Life Technologies).

To study blood monocyte populations, CD14 and CD16 were respectively detected after staining with CD14-PerCPVio700 and CD16-PE antibodies (Myltenyi Biotec). To study the phenotype of blood monocytes and macrophages from ascitic fluid, cells were labelled with the following antibodies: CD14-PerCPVio700, CCR2-PEVio770, CD163-PEVio770, CD86-Vioblue, TLR-2-APC, CD36-FITC, MHC2-APCVio700 (Myltenyi Biotec) and CD206-APC (BD Biosciences). In ascites, analysis of the percentage of cells expressing studied receptors and/or the level of expression of the receptors (measured as the mean fluorescence intensity) was conducted in a population of cells characterized by medium-sized granules (Side Scatter (SSC)^{med}) and the expression of the monocyte/macrophage receptor CD14.

To study the ascitic lymphocyte population, cells were labelled with the following antibodies: CD45-Viogreen, CD3-Vioblue, CD4-APCVio770, CD8-PerCP, CD25-PE,

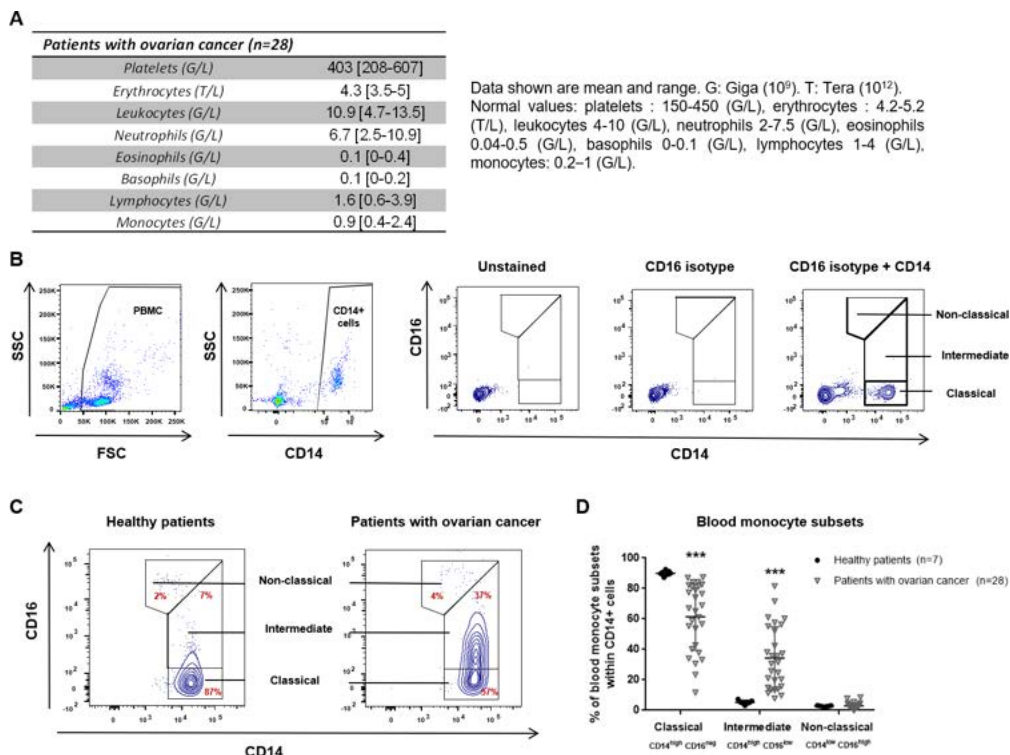


Figure 1 Characterization of blood monocyte subsets at diagnosis from healthy subjects and patients with ovarian cancer. (A) Complete blood counts of 28 patients with ovarian cancer. (B–D) Blood monocyte subsets from healthy subjects and patients with ovarian cancer were characterized by flow cytometry after CD14 and CD16 staining. Blood monocyte subset analysis was conducted in a population of cells characterized by SSC^{med} and the expression of the monocyte/macrophage receptor CD14. (B) Gating strategy for the identification of the three monocyte subsets. (C) Dot plot of representative data for both analyzed groups. (D) Quantification of classical ($CD14^{high} CD16^{neg}$), intermediate ($CD14^{high} CD16^{low}$) and non-classical ($CD14^{low} CD16^{high}$) monocytes. Results correspond to mean \pm SEM. *** $P < 0.001$ compared with the respective monocyte subset in healthy subjects. P values were determined using an analysis of variance followed by Bonferroni's multiple comparisons test. FSC, Foward scatter; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; SSC, Side scatter.

CD56-APC, CD19-PEVio700 and CD183-FITC (Myltenyi Biotec). For intracellular staining, cells were fixed and permeabilized with the FoxP3 staining buffer set (Myltenyi Biotec) and stained with the FoxP3-APC antibody (Myltenyi Biotec).

Appropriate fluorochrome-matched isotype antibodies were used to determine non-specific background staining. All stainings were performed on 100 μ L of phosphate-buffered saline (PBS) solution without calcium and magnesium (PBS $^{-/-}$) and 1% heat-inactivated fetal calf serum. A population of 10,000 cells was analyzed for each data point. All analyses were carried out in a BD Fortessa flow cytometer with Diva software.

For ascitic fluid cytokine titration, a multiplex bead-based immunoassay was used according to the manufacturer's instructions (LEGENDPlex Mix and Match System, Biolegend).

Statistical analysis

For blood monocyte comparison between healthy subjects and patients with ovarian cancer, the data were subjected to analysis of variance followed by the Bonferroni's multiple comparisons test. Spearman rank correlation was used to investigate the relationships between IBMs and immune/clinical parameters of patients with ovarian cancer. Analysis was performed using GraphPad Prism V.7.0. A p value of < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

CD14^{high} CD16^{low} IBM frequency is increased in patients with ovarian cancer

In our cohort of chemotherapy-naïve patients with ovarian cancer (see online supplementary table 1 for clinical parameters of subjects), complete blood count



revealed a slight increase in leukocyte concentration compared with normal values established in healthy subjects (figure 1A). Moreover, although the blood counts of some patients with ovarian cancer deviate from healthy subject reference intervals, the average concentrations for leukocyte subtypes and other blood cells did not show any significant change in regard to normal values (figure 1A).

Human blood monocytes are heterogeneous and are classified into three subsets based on CD14 and CD16 expressions. Fluorescence-activated cell sorting analysis performed in the blood of patients with ovarian cancer demonstrated that the proportions of monocyte subsets were altered (figure 1B–D). As expected, in healthy subjects (n=7), classical monocytes (CD14^{high} CD16^{neg}) represented 85%–90% of total monocytes, whereas non-classical (CD14^{low} CD16^{high}) and intermediate (CD14^{high} CD16^{low}) populations, these represented only 5%–10% (figure 1C,D). Interestingly, in 28 chemotherapy-naïve patients with ovarian cancer, there was a significant increase in CD14^{high} CD16^{low} monocytes (on average, 34%±4% of total circulating monocytes) to the detriment of CD14^{high} CD16^{neg} monocytes (on average, 61%±4% of total monocytes). The proportion of CD14^{low} CD16^{high} monocytes was the same as in healthy subjects (on average, 3%±1% of total monocytes) (figure 1C,D). These data reveal a robust expansion of the IBM population in patients with ovarian cancer.

We then characterized the phenotype of the three monocyte subsets and analyzed whether it could change in patients with ovarian cancer (online supplementary figure 1). In healthy subjects, classical, intermediate and non-classical monocytes displayed different protein levels of markers, such as CCR2, CD206, CD163, CD86, CD36 and MHC2. However, the expression level of these markers remained unchanged in patients with ovarian cancer compared with those observed in healthy donors. Together, these results support that ovarian tumors impact the proportion of monocyte subsets without altering their phenotype.

CD14^{high} CD16^{low} IBM frequency predicts the peritoneal ascites immune status in patients with ovarian cancer

To establish whether intermediate monocyte expansion in the blood of patients with ovarian cancer may reflect the immune microenvironment in the tumor site, we evaluated the correlation between the circulating IBM population and innate and adaptive immune cells in tumor ascites.

We found significant positive correlations between the percentage of IBMs and the percentage of regulatory T cells (Spearman rank correlation coefficient (r)=0.6503, p =0.0002), of CD4⁺ T cells (r =0.5907, p =0.0012) and of B cells (r =0.4946, p =0.0102) in the ascites (figure 2A). Conversely, we observed significant inverse correlations between the proportion of IBMs and cytotoxic CD8⁺ T cells (r =−0.5509, p =0.0035),

natural killer (NK) cells (r =−0.515, p =0.0068) and the CD8⁺/regulatory T-cell ratio present in the ascites of patients with ovarian cancer (figure 2A). Together, these results clearly demonstrate that circulating IBM expansion is associated with a decrease in the effector/regulatory T-cell ratio in tumor ascites.

The phenotypical characterization of macrophages (CD45⁺ CD14⁺ cells) in tumor ascites of the 28 patients with ovarian cancer demonstrated that almost all of them express CCR2, CD163, CD206 and CD86 (online supplementary figure 2). However, considering the variation in the expression level (geomean) of these markers on CD14⁺ cells, we established significant positive correlations between the proportion of IBM subset and the expression on CD14⁺ cells from tumor ascites of CCR2, CD163 and CD206, markers associated with ovarian tumor progression and poor prognosis (figure 2B). Conversely, we established an inverse correlation between the percentage of IBMs and the expression of CD86, costimulatory molecule for the priming and activation of T cells, on macrophages from tumor ascites (figure 2B).

The quantification of protein levels of ascites soluble mediators showed a significant negative correlation between the frequency of IBMs and interferon- γ (IFN- γ), CXCL10 and CCL3, factors that are involved in the Th1 response (figure 2C). Moreover, this inverse correlation was also observed with granzyme B, which is well described as a mediator of the cytotoxic response of T lymphocytes and NK cells. However, the frequency of IBMs was significantly correlated with the protein level in ascites of interleukin (IL)-10 and IL-6 immunosuppressive cytokines (figure 2C). Finally, the increase in IBM frequency significantly correlated with the augmentation of the proangiogenic vascular endothelial growth factor (VEGF) (figure 2C).

Together, these data link the expansion of the IBM population in patients with ovarian cancer to the peritoneal ascites protumor immunosuppressive status.

CD14^{high} CD16^{low} IBM population increase is associated with progression of ovarian cancer

To evaluate whether the higher frequency of circulating IBMs in patients with ovarian cancer might be related to tumor burden, and hence might reflect disease progression, we examined the correlation between the circulating IBM population and the peritoneal cancer index (PCI) used to assess the extent of peritoneal cancer throughout the peritoneal cavity.¹⁶ Interestingly, we established a correlation between the percentage of IBMs and the PCI (r =0.6503, p =0.0004) (figure 2D), highlighting the circulating IBM subset as a potential signature for the progression of ovarian cancer.

In line with the link between IBMs and ovarian tumor progression, we also established a positive correlation between IBM proportion and the platelet count (figure 2E), which has been previously described to be related to poor prognosis and unfavorable

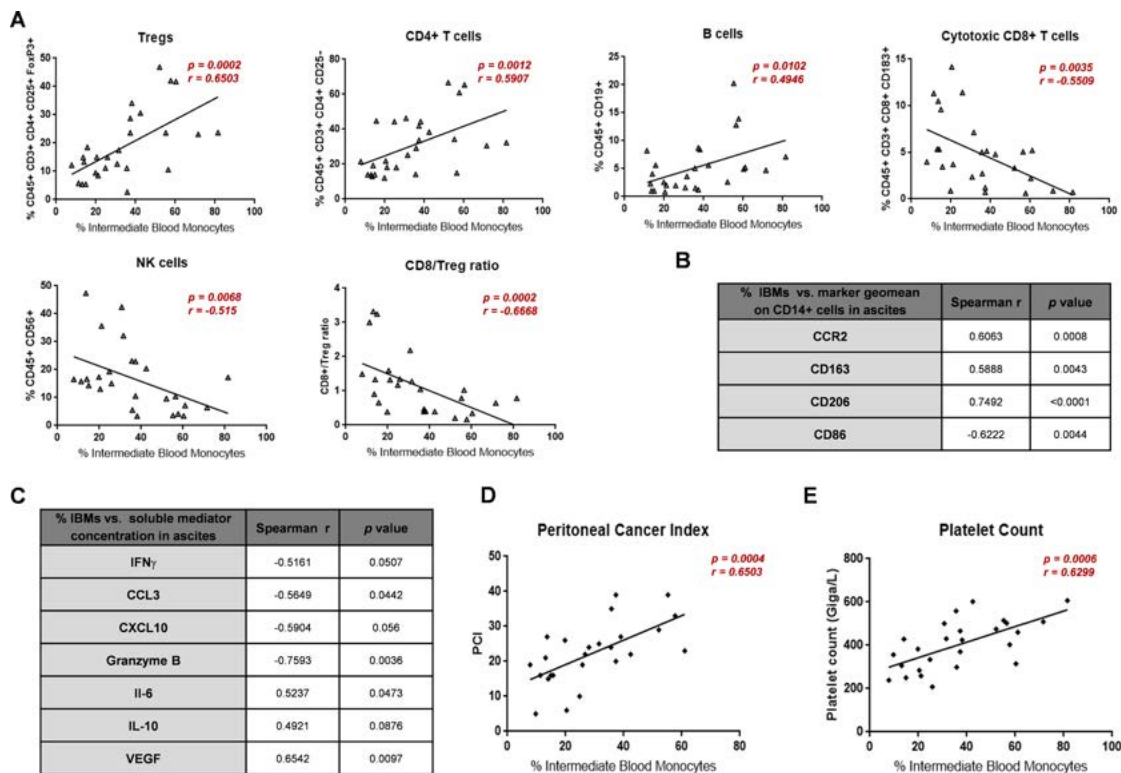


Figure 2 Correlation between CD14^{high}CD16^{low} IBMs and ascites immune status and cancer development in patients with ovarian cancer. (A–C) Analysis of immune cell population and soluble mediators of blood and ascitic fluid samples from 28 patients with ovarian cancer. (A) Correlation of circulating IBMs with the proportion in ascites of T-cell populations, B cells, NK cells and with the CD8/regulatory T-cell ratio. (B) Correlation of circulating IBMs with the geomean of several markers (CCR2, CD163, CD206 and CD86) at the surface of CD14+ cells of ascites. (C) Correlation of circulating IBMs with the concentration of several soluble mediators of ascites involved in immunity (IFN- γ , CCL3, CXCL10 and granzyme B), tolerance (IL-6 and IL-10) and tumor progression (VEGF). (D) Correlation of circulating IBMs with the PCI. (E) Correlation of circulating IBMs with the platelet count. P values were determined using the Spearman rank correlation. CCL3, C-C Motif Chemokine Ligand 3; CXCL10, C-X-C Motif Chemokine Ligand 10; IBM, intermediate blood monocyte; IFN- γ , interferon- γ ; IL, interleukin; NK, natural killer; PCI, peritoneal cancer index; VEGF, vascular endothelial growth factor.

clinico-pathological parameters for patients with ovarian cancer.¹⁷ Except for platelets, no other correlations could be established between IBM proportions and blood cell counts (online supplementary figure 3).

CD14^{high}CD16^{low} IBMs as a biomarker to follow up the progression of ovarian cancer

We analyzed blood samples, at diagnosis and following treatment, from six patients with ovarian cancer who underwent a tumor targeted immunotherapy with murlentamab (GM102) (see online supplementary table 2 for clinical parameters of subjects). Preliminary data have demonstrated various responses under GM102 treatment from stabilization to partial response.¹⁸ Moreover, GM102 has been shown to activate the antitumor T-cell immune response.¹⁹

As observed in the first cohort of 28 chemotherapy-naïve patients with ovarian cancer (figure 1C,D), the

6 patients with ovarian cancer included in the GM102 phase I clinical trial presented a high proportion of CD14^{high}CD16^{low} IBMs and a low proportion of CD14^{high}CD16^{neg} classical blood monocytes prior to treatment (CID1 SOI) (figure 3A).

Interestingly, we observed a decrease of IBMs, which was mirrored by an increase of classical blood monocytes over time following GM102 infusion in three out of six patients with ovarian cancer (patients 1, 2, and 3) (figure 3A). These data support that GM102 treatment can orient monocyte subset proportions towards those found in healthy subjects. In patient 1, the orientation of classical and IBM subsets towards standard proportions was accompanied by a stabilization of both tumor markers (figure 3B) and tumor lesions evaluated by RECIST V.1.1 (figure 3C). During the first few hours after GM102 treatment, we observed in patient

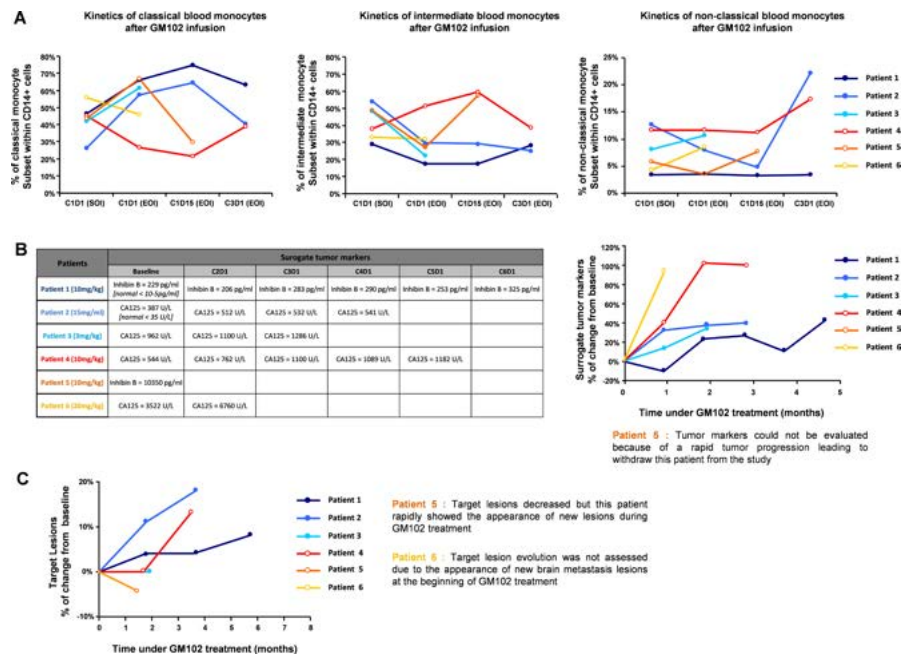


Figure 3 Effect of GM102 infusion on blood monocyte subsets and tumor progression in patients with gynecological cancer. (A–C) Proportion of blood monocyte subsets, evolution of surrogate tumor markers and tumor development were evaluated in six patients with ovarian cancer at diagnosis and after GM102 (an anti-anti-Müllerian hormone receptor type 2 low fucose IgG subclass 1 antibody) treatment. These six patients included in a phase I multicentric study were followed up on the site of Toulouse IUCT Oncopole. (A) Quantification of classical ($CD14^{\text{high}} CD16^{\text{neg}}$), intermediate ($CD14^{\text{high}} CD16^{\text{low}}$) and non-classical ($CD14^{\text{low}} CD16^{\text{high}}$) monocytes during GM102 treatment in six patients with ovarian cancer. (B) Evolution of tumor markers (CA125 and inhibin B) in these six patients during GM102 treatment. (C) Evolution of target lesions evaluated with RECIST V.1.1 in these six patients during GM102 treatment. C, cycle; D, day; EOI, end of infusion; SOI, start of infusion.

3 a profile similar to patient 1, that is, a decrease in IBM proportion associated with a moderate increase in tumor marker, as well as a stabilization of tumor lesions (figure 3A–C). Surprisingly, in patient 2, although the orientation of classical and IBM subsets towards standard proportions was accompanied by a stabilization of tumor proportions was accompanied by a stabilization of tumor proportions (figure 3B), the tumor lesions gradually increased after GM102 infusion (figure 3C). These mitigated results are further corroborated by the fact that, contrary to the first two patients (patients 1 and 3), the reduction of IBM proportions observed in patient 2 during GM102 treatment was accompanied by a strong increase in $CD14^{\text{low}} CD16^{\text{high}}$ non-classical monocytes whose deleterious role has already been described in tumors.²⁰

In patient 4, 5 and 6, GM102 infusion was not followed by reduced IBM proportions and simultaneous increased classical monocyte proportions (figure 3A). In patient 4, the continuous IBM elevation after GM102 infusion was associated with the progression of the disease, as indicated by the increase in tumor markers and lesion development (figure 3B,C). In patient 5, while the target lesion evaluated by RECIST V.1.1 appeared to decrease (figure 3C), the failure of

GM102 treatment to orient IBM proportions towards those found in healthy subjects was accompanied by the appearance of new non-target lesions resulting from a rapid tumor progression that led to the withdrawal of this patient from the study (figure 3A–C). Similarly, in patient 6, the increase in IBMs during treatment was also accompanied by an increase in tumor markers and tumor progression, as evidenced by the appearance of non-target tumor lesions in the brain, resulting in the exclusion of this patient from the study (figure 3B,C).

In addition to the established positive correlation between IBM frequency and the PCI (figure 2D), these results suggest that the expansion of IBM is linked to tumor load and could therefore be used to follow up tumor growth and to monitor treatment adaptation in patients with ovarian cancer.

DISCUSSION

Circulating monocytes have an essential role in cancer pathophysiology. Indeed, monocytes are recruited at the tumor site and differentiate into macrophages which support tumor growth. An increase in the proportion of $CD16$ -positive monocytes has been described in various

infectious and inflammatory diseases.⁷ Although the reasons for this expansion remain unclear, several studies suggest that these intermediate or non-classical populations are associated with the promotion of several pathologies and a poor prognosis.⁸ In the context of tumors, although several studies report that classical monocytes exert numerous potent antitumor effects,²¹ non-classical and intermediate monocytes perform protumor functions through their proangiogenic capacities.^{22–23} In this study, we demonstrate a change in the proportion of circulating monocyte subsets—a significant increase in CD14^{high} CD16^{low} IBMs and a decrease in CD14^{high} CD16^{neg} classical monocytes—in chemotherapy-naïve patients with ovarian cancer. Our findings are consistent with previous studies showing an increase in CD16-positive populations has been found in the peripheral blood of patients with breast cancer,⁸ gastric cancer,²⁴ cholangiocarcinoma,⁹ multiple myeloma,²⁵ melanoma¹⁰ and chronic lymphocytic leukemia.²⁶ The expansion of the blood of CD16-positive populations is clearly associated with the presence of tumor tissue, since after resection of the tumor the CD16-positive population decreased close to the normal levels found in healthy subjects.⁹ Moreover, several cytokines, such as IL-10, macrophage colony-stimulating factor, P-selectin and CCL2, have been reported to induce the in vivo and in vitro expansion of the blood CD16-positive population.^{8, 27–28} Given the high concentration of these mediators in ascites of patients with ovarian adenocarcinoma,^{11–29} these data support the idea that the modulation of peripheral blood monocyte subpopulations may be mediated by secreted factors produced by ovarian tumor cells and stromal cells of tumor microenvironment. This was also reinforced by our results showing a robust expression of CCR2, the CCL2 receptor, on macrophages from ascites of patients with a strong expansion of IBMs. Moreover, the ability of tumor cells to ‘re-educate’ immune cells towards a tolerogenic state suggests that these intermediate monocytes may have a role in tumor promotion.

In this context, we have shown here that the robust expansion of the IBM population in patients with ovarian cancer is associated with a protumor immunosuppressive microenvironment in ascites. Indeed, a high proportion of circulating IBMs is positively correlated with decreased effector/regulatory T-cell ratio in tumor ascites. In line with this, we have demonstrated that the expansion of IBMs is also associated with the decrease in ascites of IFN- γ , CCL3, CXCL10 and granzyme B, and the increase of IL-6, IL-10 and VEGF, thus linking the frequency of IBMs with a decrease in the balance between immunity and tolerance. Furthermore, we have established a positive correlation between this intermediate population and the expression level on tumor-associated macrophages (TAMs) of CCR2, CD206 and CD163, markers associated with ovarian tumor progression and poor prognosis. Given the well-established correlation between CCL2 overexpression, TAM infiltration and poor prognosis in many cancers,^{30–31} TAM CCR2 expression is associated

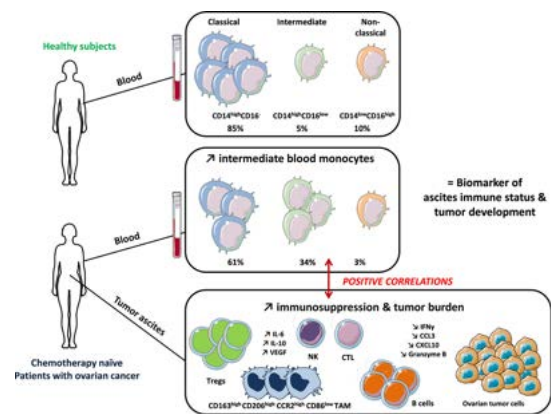


Figure 4 Schematic illustration of IBM population as a predictive signature of ascites immune status and as a biomarker of ovarian cancer development and treatment adaptation. We report a strong expansion of intermediate blood monocytes in patients with ovarian cancer. IBM proportion positively correlates with the pro-tumoral and immunosuppressive microenvironment in ascites and with the peritoneal tumor burden, therefore identifying IBMs as a predictive signature of ascites immune status and as a biomarker of ovarian cancer development. CCL3, C-C Motif Chemokine Ligand 3; CTL, Cytotoxic T Lymphocytes; CXCL10, C-X-C Motif Chemokine Ligand 10; IFN- γ , interferon- γ ; IL, interleukin; NK, natural killer; TAM, tumor-associated macrophage; VEGF, vascular endothelial growth factor.

with tumor development. Moreover, while absolute densities of CD206-positive cells are not prognostic, a high CD206/CD68 ratio is strongly associated with worse progression-free survival in patients with high-grade ovarian epithelial carcinoma.³² Similarly, the number of CD163-positive TAMs in borderline and malignant ovarian tumors is significantly higher than that in benign ovarian tumors.³³ In ovarian adenocarcinoma, the density of CD163-positive TAMs and the CD163/CD68 ratio have been identified as negative predictors for progression-free survival and overall survival.³⁴ In addition, several studies have suggested the role of CD163 in the induction of immune tolerance.³⁵ Together, these data link the high proportion of circulating IBMs in patients with ovarian cancer with the presence in ascites of TAMs strongly expressing markers involved in immunosuppression and tumor development (figure 4). The presence of these protumor TAMs is consistent with the high concentrations in ascites of IL-6 and IL-10, which are soluble mediators that are involved in the generation of immunosuppressive TAMs.^{36–37} Thus, our data suggest that the expansion of the IBM subpopulation in patients with ovarian cancer may represent a new biomarker for the immunosuppressive status of the ascites microenvironment.

Given the evidence that a high CD8+/regulatory T-cell ratio is associated with a favorable prognosis in ovarian cancer,^{13–38} our results showing a significant inverse



correlation between IBM proportions and cytotoxic CD8+ cells also strongly suggest that the expansion of IBMs may be correlated with poor prognosis. In line with this, we established a positive correlation between the percentage of IBMs and the tumor burden in the peritoneum of patients with ovarian cancer. Moreover, we demonstrated that IBM proportions are also positively correlated to platelet count. Since an elevated platelet count has been previously described to be related to poor prognosis and unfavorable clinicopathological parameters for patients with ovarian cancer,¹⁷ these results further support that IBMs, in addition to being a predictive signature of the immunosuppressive status in ascites, could also be used to predict patients' prognosis. Finally, in our study, the orientation of the proportion of classical and IBM subsets towards normal in patients with ovarian cancer under murlentamab treatment and the associated stabilization of tumor markers and tumor burden strongly suggest that the monitoring of monocyte subsets could be used to follow up tumor growth and treatment response. This is consistent with the data showing that the frequency of classical monocytes and an increased abundance of intratumoral CD8+ T cells are positively correlated with better clinical outcomes in patients receiving pembrolizumab, an anti-PD-1 for metastatic melanoma.¹⁰

In conclusion, we have demonstrated a robust expansion of the IBM population in patients with ovarian cancer and have linked this high subpopulation frequency with the protumor immunosuppressive microenvironment in ascites. We have also established a positive correlation between the percentage of IBMs and the PCI (figure 4). Altogether, our results highlight the potential use of IBMs as biomarkers for ascites immune status and ovarian cancer progression.

Author affiliations

¹UMR152 Pharmadev, Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, Occitanie, France

²UMR152 Pharmadev, IRD, Toulouse, France

³UMR1037, CRCT, Toulouse, Midi-Pyrénées, France

⁴Institut Claudius Regaud, IUCT Oncopole, Toulouse, Languedoc-Roussillon-Midi, France

⁵Gamamabs Pharma, Toulouse, Languedoc-Roussillon-Midi, France

Acknowledgements We thank Alexia Zakaroff-Girard and Elodie Riant (TRI imaging platform, IFR150/I2MC) for flow cytometry technical assistance. We are grateful to the 'Phil-Anthrope' Association, which provided a special grant for this project.

Contributors AC and BC designed the experiments (concept and design, collection and assembly of data, data analysis and interpretation); MP, ALN, KC and HL designed some experiments, performed experiments and analyzed the data (collection and assembly of data); GJ, MCR, LL, and HA provided help with the experiments; GF, AM, J-PD, MA and LG provided critical clinical feedbacks and patients' samples. FL, J-MB, IT-F and J-FP provided patients' samples from GM102 phase I clinical trial and intellectual support; AC, BC and MP wrote the manuscript.

Funding This work was funded by a grant from the French government (IDEX 2012) and the Groupe de Recherche de l'Institut Claudius Regaud.

Competing interests None declared.

Patient consent for publication Not required.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

Data availability statement All data relevant to the study are included in the article or uploaded as supplementary information. If you need information about data related to this manuscript, please contact the corresponding author.

Open access This is an open access article distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited, appropriate credit is given, any changes made indicated, and the use is non-commercial. See <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

ORCID iD

Agnès Coste <http://orcid.org/0000-0001-7781-3323>

REFERENCES

- Jemal A, Bray F, Center MM, *et al.* Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;61:69–90.
- Jayson GC, Kohn EC, Kitchener HC, *et al.* Ovarian cancer. *The Lancet* 2014;384:1376–88.
- Moore K, Colombo N, Scambia G, *et al.* Maintenance olaparib in patients with newly diagnosed advanced ovarian cancer. *N Engl J Med* 2018;379:2495–505.
- Thibault B, Genre L, Le Naour A, *et al.* Debio 1143, an IAP inhibitor, reverses carboplatin resistance in ovarian cancer cells and triggers apoptotic or necroptotic cell death. *Sci Rep* 2018;8:17862.
- Menon U, Griffin M, Gentry-Maharaj A. Ovarian cancer screening—current status, future directions. *Gynecol Oncol* 2014;132:490–5.
- Moore RG, McMeekin DS, Brown AK, *et al.* A novel multiple marker bioassay utilizing HE4 and CA125 for the prediction of ovarian cancer in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol* 2009;112:40–6.
- Wong KL, Yeap WH, Tai JJY, *et al.* The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol Res* 2012;53:41–57.
- Feng A-L, Zhu J-K, Sun J-T, *et al.* CD16+ monocytes in breast cancer patients: expanded by monocyte chemoattractant protein-1 and may be useful for early diagnosis. *Clin Exp Immunol* 2011;164:57–65.
- Subimerb C, Pinlaor S, Lulitanond V, *et al.* Circulating CD14(+) CD16(+) monocyte levels predict tissue invasive character of cholangiocarcinoma. *Clin Exp Immunol* 2010;161:471–9.
- Krieg C, Nowicka M, Guglietta S, *et al.* High-Dimensional single-cell analysis predicts response to anti-PD-1 immunotherapy. *Nat Med* 2018;24:144–53.
- Giuntoli RL, Webb TJ, Zoso A, *et al.* Ovarian cancer-associated ascites demonstrates altered immune environment: implications for antitumor immunity. *Anticancer Res* 2009;29:2875–84.
- Ahmed N, Stenvers KL. Getting to know ovarian cancer ascites: opportunities for targeted therapy-based translational research. *Front Oncol* 2013;3:256.
- Lieber S, Reinartz S, Raifer H, *et al.* Prognosis of ovarian cancer is associated with effector memory CD8+ T cell accumulation in ascites, CXCL9 levels and activation-triggered signal transduction in T cells. *Oncimmunology* 2018;7:e1424672–00.
- Anttonen M, Färkkilä A, Tauriala H, *et al.* Anti-Müllerian hormone inhibits growth of AMH type II receptor-positive human ovarian granulosa cell tumor cells by activating apoptosis. *Lab Invest* 2011;91:1605–14.
- Bakkum-Gamez JN, Aletti G, Lewis KA, *et al.* Müllerian inhibiting substance type II receptor (MISIR): a novel, tissue-specific target expressed by gynecologic cancers. *Gynecol Oncol* 2008;108:141–8.
- Tentes A-AK, Tripsiannis G, Markakidis SK, *et al.* Peritoneal cancer index: a prognostic indicator of survival in advanced ovarian cancer. *Eur J Surg Oncol* 2003;29:69–73.
- Zhou Q, Huang F, He Z, *et al.* Clinicopathological and prognostic significance of platelet count in patients with ovarian cancer. *Climacteric* 2018;21:60–8.
- Leary A, Aftimos PG, Delord J-P, *et al.* A first-in-human study of monoclonal antibody GM102 in patients with anti-Müllerian-hormone-receptor II (AMHRII) positive gynecological cancers. *JCO* 2018;36:5542.
- Bougherara H, Némati F, Nicolas A, *et al.* The humanized anti-human AMHRII mAb 3C23K exerts an anti-tumor activity against human ovarian cancer through tumor-associated macrophages. *Oncotarget* 2017;8:99950–65.
- Jung K, Heishi T, Khan OF, *et al.* Ly6Clo monocytes drive immunosuppression and confer resistance to anti-VEGFR2 cancer therapy. *J Clin Invest* 2017;127:3039–51.



- 21 Mukherjee R, Kanti Barman P, Kumar Thatoi P, *et al.* Non-Classical monocytes display inflammatory features: validation in sepsis and systemic lupus erythematosus. *Sci Rep* 2015;5:13886.
- 22 De Palma M, Murdoch C, Venneri MA, *et al.* Tie2-expressing monocytes: regulation of tumor angiogenesis and therapeutic implications. *Trends Immunol* 2007;28:519–24.
- 23 Zawada AM, Rogacev KS, Rotter B, *et al.* SuperSAGE evidence for CD14+CD16+ monocytes as a third monocyte subset. *Blood* 2011;118:e50–61.
- 24 Eljaszewicz A, Jankowski M, Gackowska L, *et al.* Clinical immunology gastric cancer increase the percentage of intermediate (CD14+CD16+) and nonclassical (CD14+CD16+) monocytes. *Central European Journal of Immunology* 2012;4:355–61.
- 25 Sponaas AM, Moen SH, Liabakk NB, *et al.* The proportion of CD16(+)/CD14(dim) monocytes increases with tumor cell load in bone marrow of patients with multiple myeloma. *Immun Inflamm Dis* 2015;3:94–102.
- 26 Lapuc I, Bolkun L, Eljaszewicz A, *et al.* Circulating classical CD14+CD16- monocytes predict shorter time to initial treatment in chronic lymphocytic leukemia patients: Differential effects of immune chemotherapy on monocyte-related membrane and soluble forms of CD163. *Oncol Rep* 2015;34:1269–78.
- 27 Li G, Kim Y-J, Mantel C, *et al.* P-Selectin enhances generation of CD14+CD16+ dendritic-like cells and inhibits macrophage maturation from human peripheral blood monocytes. *J Immunol* 2003;171:669–77.
- 28 Li G, Hangoc G, Broxmeyer HE. Interleukin-10 in combination with M-CSF and IL-4 contributes to development of the rare population of CD14+CD16+ cells derived from human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;322:637–43.
- 29 Chambers SK, Kacinski BM, Ivins CM, *et al.* Overexpression of epithelial macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) and CSF-1 receptor: a poor prognostic factor in epithelial ovarian cancer, contrasted with a protective effect of stromal CSF-1. *Clin Cancer Res* 1997;3:999–1007.
- 30 Sanford DE, Belt BA, Panni RZ, *et al.* Inflammatory monocyte mobilization decreases patient survival in pancreatic cancer: a role for targeting the CCL2/CCR2 axis. *Clin Cancer Res* 2013;19:3404–15.
- 31 Teng K-Y, Han J, Zhang X, *et al.* Blocking the CCL2-CCR2 axis using CCL2-Neutralizing antibody is an effective therapy for hepatocellular cancer in a mouse model. *Mol Cancer Ther* 2017;16:312–22. ...
- 32 Le Page C, Marineau A, Bonza PK, *et al.* BTN3A2 expression in epithelial ovarian cancer is associated with higher tumor infiltrating T cells and a better prognosis. *PLoS One* 2012;7:e38541.
- 33 Kawamura K, Komohara Y, Takaishi K, *et al.* Detection of M2 macrophages and colony-stimulating factor 1 expression in serous and mucinous ovarian epithelial tumors. *Pathol Int* 2009;59:300–5.
- 34 Lan C, Huang X, Lin S, *et al.* Expression of M2-polarized macrophages is associated with poor prognosis for advanced epithelial ovarian cancer. *Technol Cancer Res Treat* 2013;12:259–67.
- 35 Onofre G, Kolácková M, Jankovicová K, *et al.* Scavenger receptor CD163 and its biological functions. *Acta Medica* 2009;52:57–61.
- 36 Duluc D, Delneste Y, Tan F, *et al.* Tumor-Associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood* 2007;110:4319–30.
- 37 Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res* 2006;66:605–12.
- 38 Sato E, Olson SH, Ahn J, *et al.* Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:18538–43.

III. Article 5 : Article publié en co-auteur

Le Naour A., Prat M., Thibault B., Mével R., Lemaitre L., Leray H., Joubert M V., Coulson K., Golzio M., Lefevre L., Mery E., Martinez A., Ferron G., Delord J P., Coste A., and Couderc B.

Tumor cells educate mesenchymal stromal cells to release chemoprotective and immunomodulatory factors

Article

Tumor cells educate mesenchymal stromal cells to release chemoprotective and immunomodulatory factors

Augustin Le Naour^{1,2,†}, Mélissa Prat^{3,†}, Benoît Thibault^{1,2}, Renaud Mével^{1,2}, Léa Lemaitre^{1,2}, Hélène Leray^{1,2}, Marie-Véronique Joubert^{1,2}, Kimberley Coulson³, Muriel Golzio⁴, Lise Lefevre³, Eliane Mery¹, Alejandra Martinez¹, Gwénaél Ferron¹, Jean-Pierre Delord^{1,2}, Agnès Coste^{3,‡}, and Bettina Couderc^{id 1,2,‡,*}

¹ Institut Claudius Regaud –IUCT Oncopole, Université de Toulouse, Toulouse, France

² INSERM UMR 1037, Cancer Research Center of Toulouse (CRCT), Toulouse, France

³ UMR 152 Pharma Dev, Université de Toulouse, IRD, UPS, Toulouse, France

⁴ UMR CNRS 5089, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS), Toulouse, France

[†] These authors contributed equally to this work.

[‡] These authors contributed equally to this work.

* Correspondence to: Bettina Couderc, E-mail: Couderc.bettina@iuct-oncopole.fr

Edited by Bing Su

Factors released by surrounding cells such as cancer-associated mesenchymal stromal cells (CA-MSCs) are involved in tumor progression and chemoresistance. In this study, we characterize the mechanisms by which naïve mesenchymal stromal cells (MSCs) can acquire a CA-MSCs phenotype. Ovarian tumor cells trigger the transformation of MSCs to CA-MSCs by expressing pro-tumoral genes implicated in the chemoresistance of cancer cells, resulting in the secretion of high levels of CXC chemokine receptors 1 and 2 (CXCR1/2) ligands such as chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (CXCL1), CXCL2, and interleukin 8 (IL-8). CXCR1/2 ligands can also inhibit the immune response against ovarian tumor cells. Indeed, through their released factors, CA-MSCs promote the differentiation of monocytes towards M2 macrophages, which favors tumor progression. When CXCR1/2 receptors are inhibited, these CA-MSC-activated macrophages lose their M2 properties and acquire an anti-tumoral phenotype. Both *ex vivo* and *in vivo*, we used a CXCR1/2 inhibitor to sensitize ovarian tumor cells to carboplatin and circumvent the pro-tumoral effects of CA-MSCs. Since high concentrations of CXCR1/2 ligands in patients' blood are associated with chemoresistance, CXCR1/2 inhibition could be a potential therapeutic strategy to revert carboplatin resistance.

Keywords: chemoresistance, macrophages, mesenchymal stromal cells, ovarian adenocarcinoma, chemokines

Introduction

Chemoresistance is a major problem in the treatment of cancer. In the case of ovarian tumors, resistance can occur during treatment, or several months later, and is generally associated with a dismal prognosis. The acquired chemoresistance within the tumor cells can be caused by molecular alterations affecting metabolism, growth control and apoptosis pathways, uptake, or efflux of the drug (Lønning et al., 2013). Some chemotherapeutic agents induce a rapid host response involving a 'storm' of cells, cytokines, and growth factors that promote angiogenesis,

tumor regrowth, metastasis, and chemoresistance (McMillin et al., 2010; Voloshin et al., 2013; Beyar-Katz et al., 2016). Thus, the microenvironment surrounding the tumor cells has been proposed to promote the acquisition of chemoresistance.

The tumor microenvironment is composed of different cell types including endothelial cells, fibroblasts, adipocytes, immune cells, and mesenchymal stromal cells (MSCs). MSCs are multipotent stromal cells that can differentiate into adipocytes, chondrocytes, osteoblasts, fibroblasts, and vascular structures (Chamberlain et al., 2007). They can be isolated from different tissues including bone marrow and adipose tissue (Phinney et al., 2007). In tumors, cancer-associated MSCs (CA-MSCs) (Shi et al., 2016) are able to stimulate tumor growth, angiogenesis, and promote chemoresistance. This phenomenon occurs through direct interactions of CA-MSCs with tumor cells (Rafii et al., 2008) and/or the release of various factors including

Received January 3, 2019. Revised June 5, 2019. Accepted July 17, 2019.

© The Author(s) (2019). Published by Oxford University Press on behalf of *Journal of Molecular Cell Biology*, IBCB, SIBS, CAS.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

cytokines, growth factors, exosomes, and fatty acids (Le Naour and Couderc, 2017). For example, CCL5, IL-6, and IL-8 (Wang et al., 2010, 2011; Hofer et al., 2016) have been shown to be involved in the acquisition of chemoresistance. Wang et al. (2011) have shown that autocrine IL-8 secretion by tumor cells induced their chemoresistance, while inhibiting IL-8 was able to re-sensitize the tumor cells to cisplatin and paclitaxel. These data suggest that IL-8, as well as other ligands of CXC chemokine receptors 1 and 2 (CXCR1/2) could be involved in the chemoresistance acquisition via the recruitment of MSCs around the tumor (Wang et al., 2011).

The signaling pathways activated by IL-8 (PI3K and phospholipase C) are stimulated through the interaction of the cytokine with CXCR1/2 that are expressed by neutrophils, monocytes, endothelial cells, astrocytes, microglia, and different types of tumor cells (Thomson, 1998; Hillyer et al., 2003; Ha et al., 2017). Browne et al. (2013) have reported a strong correlation between CXCR1/2 expression and the grade of ovarian tumors.

Beside its role in chemoresistance, IL-8 is a chemo-attractant for neutrophils, and may also interact with CXCR1/2 expressing monocytes (Thomson, 1998). Monocytes differentiate into macrophages when infiltrating tissues and represent an important component of the ovarian tumor microenvironment. Macrophages are particularly plastic and capable of differentiating into specific functional states in response to stromal signals. M1-macrophages have tumoricidal activity through the secretion of cytotoxic factors, while M2-macrophages generally only produce low levels of reactive nitrogen/oxygen species (ROS), exhibit low amounts of antigen-presentation, and suppress anti-tumor immunity (Mantovani et al., 2004). Several studies have evidenced the recruitment of M2-macrophages to solid tumors in response to chemotherapy (De Palma et al., 2013). These tumor-associated macrophages (TAMs) provide an immunosuppressive microenvironment (Zheng et al., 2009; Gutierrez-Gonzalez et al., 2016), participate in angiogenesis through the release of vascular endothelial growth factors and protect tumor cells against paclitaxel chemotherapy for solid tumors (Shree et al., 2011), or melphalan-induced apoptosis in the case of multiple myeloma (Beyar-Katz et al., 2016).

Overall, it has become evident that the tumor environment determines the clinical behavior of the disease, and its content has a direct impact on patients' overall survival (Dalton et al., 2004). In the case of ovarian cancers, patients frequently develop ascites, which refers to the abnormal accumulation of fluid in the peritoneal cavity. It contains tumor cells, stromal cells, as well as the factors secreted by these different cellular populations. In an effort to study the complex interactions between the tumor microenvironment and ovarian tumor cells (OTCs), we show that naïve MSCs can acquire a CA-MSCs phenotype in proximity with OTCs, and in turn, secrete chemoprotective factors and polarize macrophages into a less cytotoxic phenotype. We then demonstrate the plasticity of this phenotype *in vivo* and *ex vivo* by re-sensitizing the tumor cells to chemotherapy using CXCR1/2 receptor inhibitors, which may be a promising therapeutic strategy to circumvent resistances in patients.

Results

CA-MSCs isolated from tumor biopsies confer chemoresistance to OTCs

Isolated cells from freshly extracted human ovarian adenocarcinoma biopsies ($n = 12$) were selected based on their adherence to plastic and their fibroblast-like morphology (Figure 1A and B). These cells were CD73⁺CD90⁺CD105⁺ and presented a similar phenotype to BM-MSC (Figure 1C). According to the expression of these typical MSC markers, and the absence of CD14, CD20, CD34, and CD45 expression, we define this population as CA-MSCs.

Next, to evaluate the ability of CA-MSCs to induce chemoresistance in OTCs, we cultured the human OTC line IGROV-1 in conditioned media (CM) from CA-MSCs, and treated them with carboplatin, the standard-of-care in ovarian cancer treatment. CA-MSC CM induced an increase of 44% in the carboplatin IC50 on IGROV-1 cells (Figure 1D and E). All the CA-MSCs that we cultured ($n = 12$) were able to induce chemoresistance in IGROV-1 cells through released factors (Figure 1E; Supplementary Figure S1A). We observed a similar effect on SKOV-3 cells, with an increase of 33% in the carboplatin IC50 (Supplementary Figure S1B).

BM-MSCs could differentiate into CA-MSCs in a tumoral microenvironment

MSCs display different phenotypes and functions, depending on the type of tissue from where they are isolated, including ovaries, bone marrow, adipose tissue, heart, and bladder (Hass et al., 2011; Stimpfel et al., 2014). Thus, we aimed to analyze whether CA-MSCs acquired specific functions in response to the surrounding OTCs. We hypothesized that CA-MSCs isolated from ovarian nodules could be MSCs pre-educated by OTCs to adopt new functions such as the ability to induce chemoresistance. To address if CA-MSCs could be differentiated cells derived from progenitor MSCs, we cultured multipotent BM-MSCs from healthy female donors either in control medium (physiological BM-MSCs), in CM obtained from two different human OTC lines (IGROV-1 or SKOV-3), or in patients ascites. MSCs cultured with human OTC lines or in patients ascites were referred to as induced CA-MSC (iCA-MSC).

While the physiological MSC CM did not confer chemoresistance to OTCs, iCA-MSC CM induced an increase in the chemoresistance of IGROV-1 cells to carboplatin (Figure 1F), similar to that observed with CA-MSC CM (Figure 1E; Supplementary Figure S1A).

In order to test our hypothesis *in vivo*, we injected intraperitoneally BM-MSCs from healthy donors to nude mice bearing ovarian tumors (SKOV-3 cells) and analyzed their ability to confer chemoresistance to OTCs. We evaluated tumor progression by measuring the peritoneal cancer index (Supplementary Table S1) as previously described (Picaud et al., 2014). The injection of BM-MSCs did not affect tumor progression (Figure 1G) but altered the efficiency of carboplatin treatment showing that BM-MSCs injected at the same time as OTCs conferred

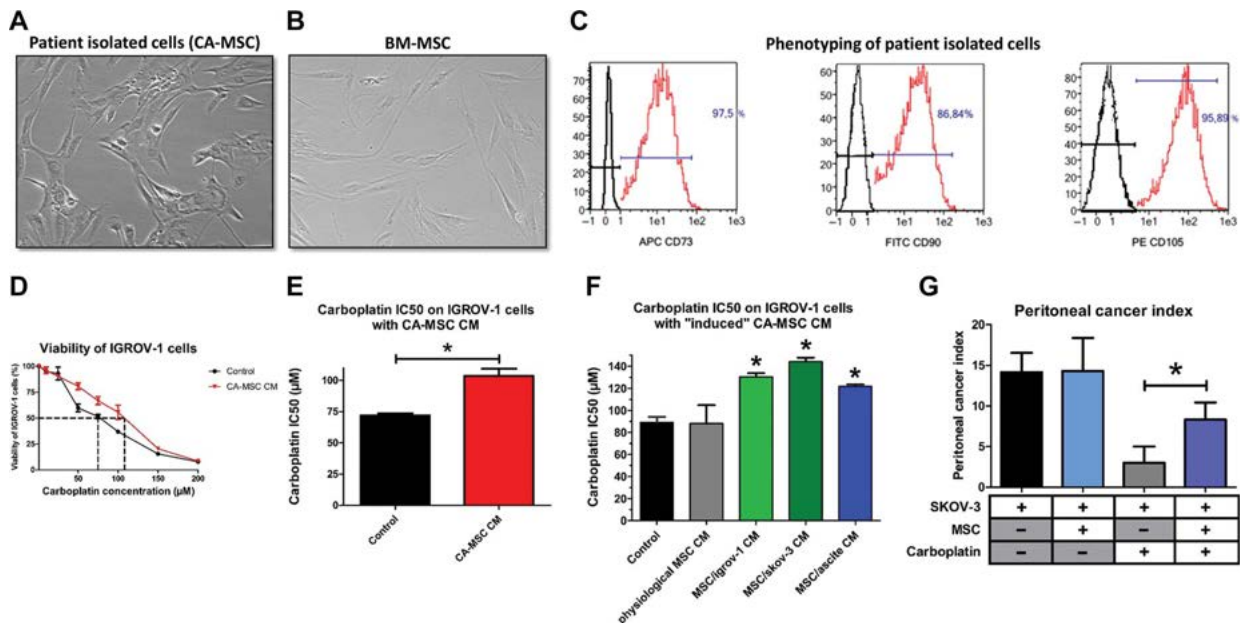


Figure 1 The chemoresistance acquisition by OTCs through factors secreted by CA-MSCs. **(A and B)** Phenotype of stromal cells from patient biopsies and BM-MSCs (X40). **(C)** Flow cytometry analysis of stromal cells from patient biopsies. The expression of CD73, CD90, and CD105 was evaluated. **(D)** OTCs cultured alone or in the presence of CA-MSC CM were treated with increasing carboplatin concentrations for 48 h. Cell viability was measured for IGROV-1 cells cultured in control medium or in CA-MSC CM. The dotted line corresponds to 50% cell viability. **(E)** Histogram representing the mean carboplatin IC₅₀ ± SEM on IGROV-1 cells cultured with CA-MSC CM ($n = 12$). **(F)** Histogram representing the carboplatin IC₅₀ on IGROV-1 cells cultured with BM-MSC CM (physiological MSCs) or iCA-MSC CM from different origins (BM-MSCs cultivated with IGROV-1 CM, SKOV-3 CM, or ascites) ($n = 4$ for each type of MSC). **(G)** The mean value of the peritoneal cancer index ± SEM calculated in mice is presented ($n = 6$ mice/group). P -values of <0.05 (*) using a Wilcoxon–Mann–Whitney test indicate a significant difference.

chemoresistance to OTCs *in vivo* (Figure 1G). Taken together, our results showed that BM-MSCs in the vicinity of OTCs acquired a CA-MSC phenotype, which in turn induced the acquisition of chemoresistance by OTCs.

CA-MSCs and iCA-MSCs lose their multipotency

The activation of the three major signaling pathways involved in chemoresistance was evaluated in MSCs cultured in OTC CM. The PI3K/Akt, MAPK, and NF- κ B signaling pathways were activated in iCA-MSCs derived from MSCs cultured in CM from OTC lines (IGROV-1) compared to native BM-MSCs (Figure 2A and B).

Since BM-MSCs are multipotent cells, we evaluated the capacity of CA-MSCs isolated from patient tumors to differentiate into osteoblasts or adipocytes. BM-MSC were able to differentiate into either osteoblasts or adipocytes as opposed to CA-MSCs (Supplementary Figures S2A and S3A). In contrast, BM-MSCs cultured for 21 days in control medium maintained multipotency. Similarly, BM-MSCs cultured in a tumoral environment lost their multipotency (Supplementary Figures S2B and S3B). CA-MSCs did not appear to be cancer-associated fibroblasts (CAFs) as demonstrated by the absence of upregulation of

α -SMA, FAP, FSP1, or PDGFR α . On the contrary, these CAF markers were downregulated in comparison to the control BM-MSC (Supplementary Figure S4).

Overall, factors secreted by OTCs activated signaling pathways in BM-MSCs and led them to differentiate into a CA-MSCs phenotype, which is characterized by a loss of their multipotency.

CA-MSCs and iCA-MSCs upregulate CXCL1, CXCL2, and IL-8

We observed that iCA-MSCs acquired functions such as the ability to secrete factors able to induce OTC chemoresistance. In order to determine the implicated factors, gene expression in BM-MSCs and their derived iCA-MSCs from the same donor was compared to overcome inter-individual variability. The iCA-MSCs upregulated several pro-tumoral (e.g. IL-6), pro-metastatic (e.g. CCL5), and pro-angiogenic genes (e.g. IL-8 and CCL5) (Figure 2C and D), indicating that culturing MSCs in a tumoral context is able to modify them to a pro-tumoral phenotype.

To identify the secreted factors produced by CA-MSCs and responsible for the acquisition of chemoresistance by OTCs, we analyzed data obtained from the gene expression analysis. We focused on secreted factors shown in the literature to be involved in the acquisition of chemoresistance (Castells

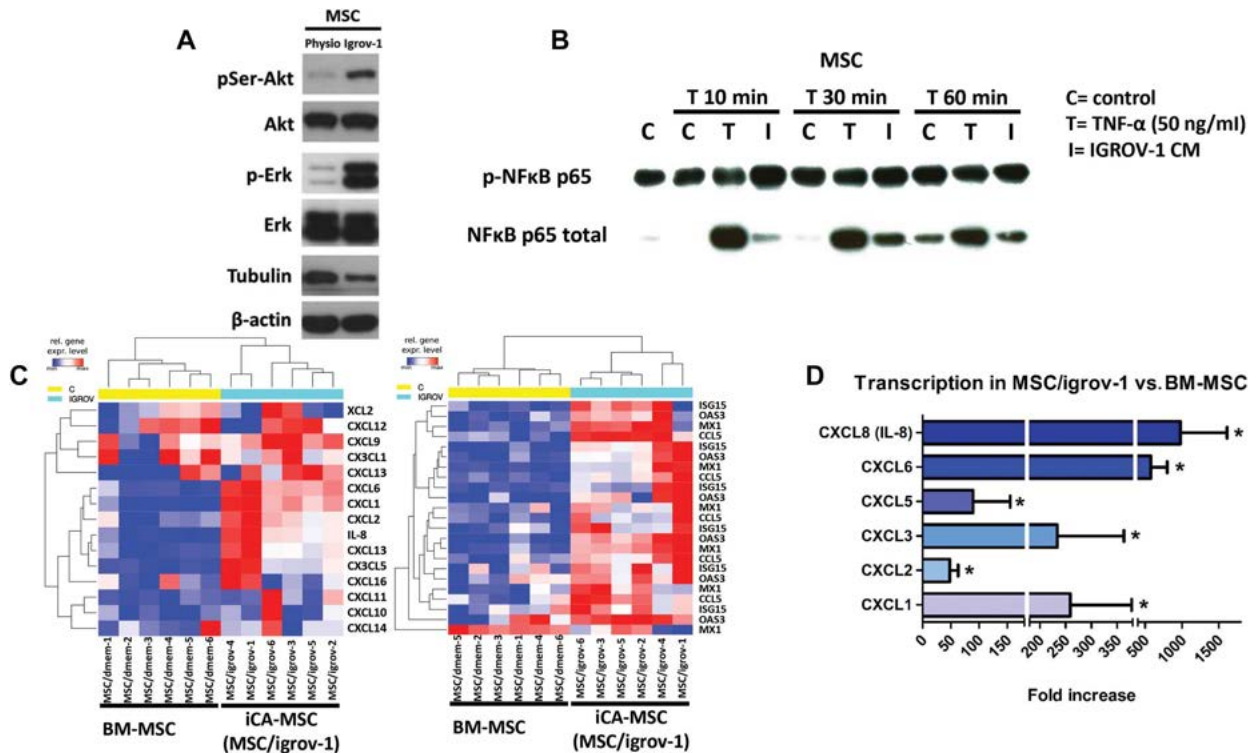


Figure 2 Factors secreted by OTCs activate PI3K/Akt, MAPK, and NF-κB signaling pathways and modify gene expression in MSCs. (A) Akt, phospho-Akt (Ser473), Erk, and Phospho-Erk expression levels were assayed by western blot on physiological BM-MSC or MSC/igrov-1 (representative of three experiments). (B) BM-MSCs were cultured with IGROV-1 CM or with control medium (control) for the indicated amount of time. T represents treatment of the BM-MSCs with 50 ng/ml of TNF α . NF-κB and phospho-NF-κB p65 protein expression was assayed by western blot. (C) Representative gene expression of physiological BM-MSCs ($n = 6$) and iCA-MSCs (MSC/igrov-1) ($n = 6$). RNA was extracted and analyzed by Nanostring™ technology. (D) Quantification of the transcriptomic analysis showing the log₂ fold change of the selected genes with an initial filter ($SD > 0.25$) to eliminate genes with little variation. An ANOVA test was applied to compare the six BM-MSC control samples versus the six iCA-MSC (MSC/igrov-1) samples. The P -values were corrected for multiple tests using the BH method.

et al., 2013). We focused on CXCR1/2 ligands, since these chemokines are known to be involved in the OTC chemoresistance to cisplatin and taxan (Wang et al., 2011) and to be associated with solid tumor progression (Ijichi et al., 2011). In particular, CXCL1 (log₂ fold-change = 7.5), CXCL2 (log₂ fold-change = 5.0), and IL-8 (log₂ fold-change = 8.5) were found to be largely upregulated in iCA-MSCs compared to BM-MSCs (Figure 2D).

In order to confirm these results, we performed RT-qPCR and ELISA analysis on BM-MSCs or their counterpart iCA-MSCs and compared the expression of CXCL1, CXCL2, and IL-8. There was a strong upregulation of CXCL1, CXCL2, and IL-8 mRNAs and protein levels in all three types of iCA-MSCs (MSC/igrov-1, MSC/skov-3, and MSC/ascite) compared to the control condition (Figure 3A–F).

Additionally, we have evaluated whether carboplatin treatment could modify the nature of the chemokines secreted by iCA-MSC. CXCL1 secretion was enhanced by both physiological BM-MSC and iCA-MSC (Supplementary Figure S5A),

while it only minimally affected CXCL2 and IL-8 production (Supplementary Figure S5B and C).

The increased chemokine secretions of iCA-MSC could be explained by the activation of the signaling pathways observed in the iCA-MSC (Figure 2A and B). However, inhibitors of PI3K, MAPK, and NF-κB (Supplementary Figure S5D–K) pathways did not completely abrogate the production of these chemokines. Therefore, we hypothesize that both MEK and NF-κB signaling pathways could be involved in the overproduction of CXCR1/2 ligands by iCA-MSCs.

Finally, we evaluated the levels of the three CXCR1/2 ligands in serum from patients with ovarian adenocarcinoma (Supplementary Table S2) collected at diagnosis. The classification of the relapse is obtained according to the duration of the platinum-free interval, corresponding to the time between the date of the last dose of platinum and the date of the relapse (Tomao et al., 2017). There was an increased concentration of the three chemokines in the serum from patients with resistant tumors compared to those with sensitive tumors

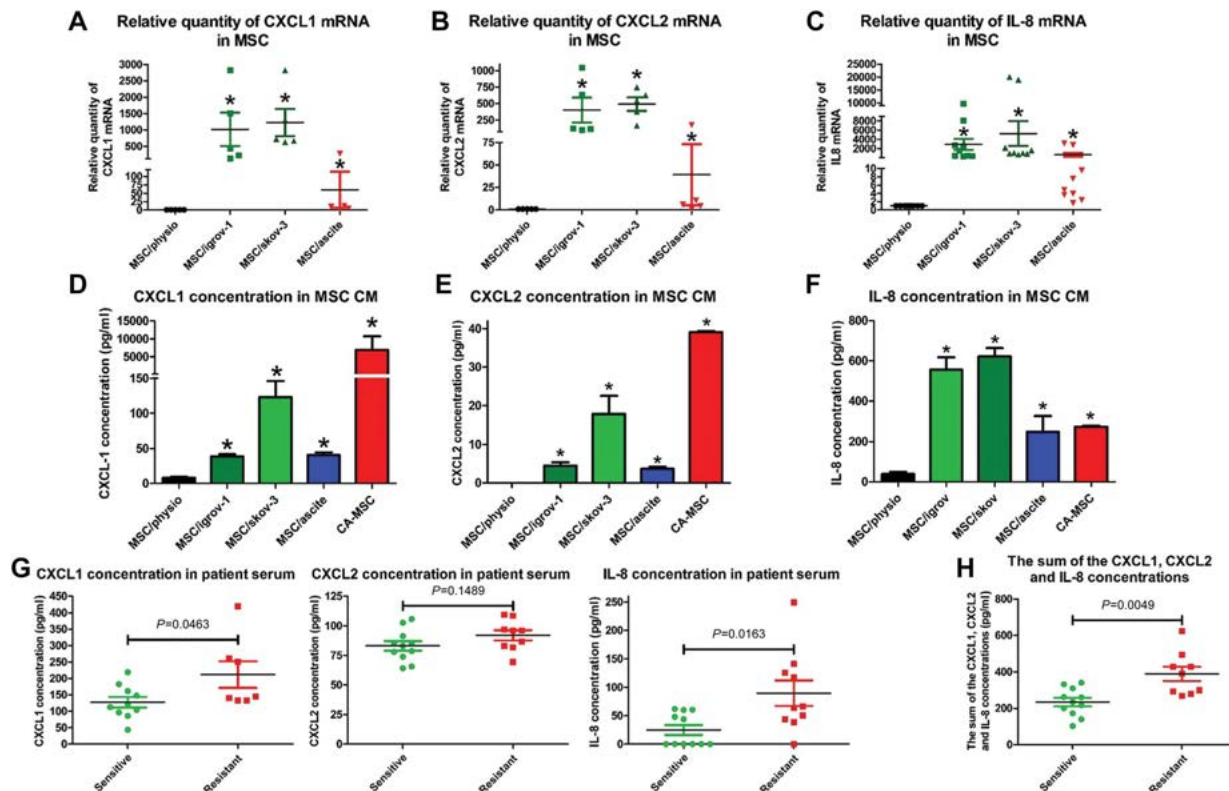


Figure 3 Determination of the CXCR1/2 ligands secreted by CA-MSCs and iCA-MSCs. (A–C) The upregulation of genes coding for CXCL1, CXCL2 and IL-8 was validated by RT-qPCR performed on RNA extracted from BM-MSCs and different types of iCA-MSCs (induced by IGROV-1 CM, SKOV-3 CM, or ascites). The data from BM-MSCs were set to 1 and the relative quantity of mRNA is shown. CXCL1 (A), CXCL2 (B), IL-8 (C). (D–F) The concentrations of CXCL1, CXCL2, and IL-8 in the CM were quantified using ELISA kits. The CM from CA-MSCs was also tested. Histograms show the mean concentrations of CXCL1 (D), CXCL2 (E), and IL-8 (F) from three independent experiments performed in triplicate (mean \pm SEM). (G) The CXCL1, CXCL2, and IL-8 concentrations were determined using ELISA kits on samples of serum from patients with ovarian adenocarcinoma collected at diagnosis. (H) The sum of the CXCL1, CXCL2, and IL-8 concentrations was obtained by adding together the serum concentration of these three chemokines. *P*-values of <0.05 (*) using a Wilcoxon–Mann–Whitney test indicate a significant difference.

(*P*-values of 0.046, 0.149, and 0.016 for CXCL1, CXCL2, and IL-8, respectively) (Figure 3G). The sum of the concentrations of CXCL1, CXCL2, and IL-8 was obtained by adding together the serum concentrations of these three chemokines, and showed that patients with resistant tumors had a higher serum concentration of these chemokines ($P = 0.0049$). Our results showed that increased levels of CXCR1/2 ligands may be predictive markers of a tumor's response to chemotherapy. Thus, they appear as promising targets to understand mechanisms by which MSCs induce the chemoresistance acquisition in OTCs.

CXCR1/2 inhibition reverses chemoresistance

In order to determine whether CXCR1/2 ligands could play a role in the chemoresistance mediated by MSCs, we determined the carboplatin IC₅₀ on IGROV-1 cells in the presence of

a CXCR1/2 inhibitor (Hayashi et al., 1995). We previously verified that CXCR1/2 were expressed in different human OTC lines and showed that epithelial adenocarcinoma cell lines (OVCAR-3, IGROV-1, and SKOV-3 cells) as well as a clear cell carcinoma cell line (JHOC-5) expressed both CXCR1 (Supplementary Figure S6A) and CXCR2 (Supplementary Figure S6B).

While the CXCR1/2 inhibitor alone did not alter the viability of OTCs (Supplementary Figures S6C, S7A and B), it induced an increase in their sensitivity to carboplatin when cultured in control medium. This is due to the inhibition of the autocrine production of IL-8 by the tumor cells (Pasquet et al., 2010). The acquired chemoresistance by IGROV-1 cells mediated through factors secreted by CA-MSCs or iCA-MSC could be reversed by the CXCR1/2 inhibitor (Figure 4A and B).

To confirm that CXCR1/2 inhibition could re-sensitize OTCs, we used our *in vivo* murine model with the CXCR1/2 inhibitor reparixin (Kim et al., 2011). The co-administration of MSCs with

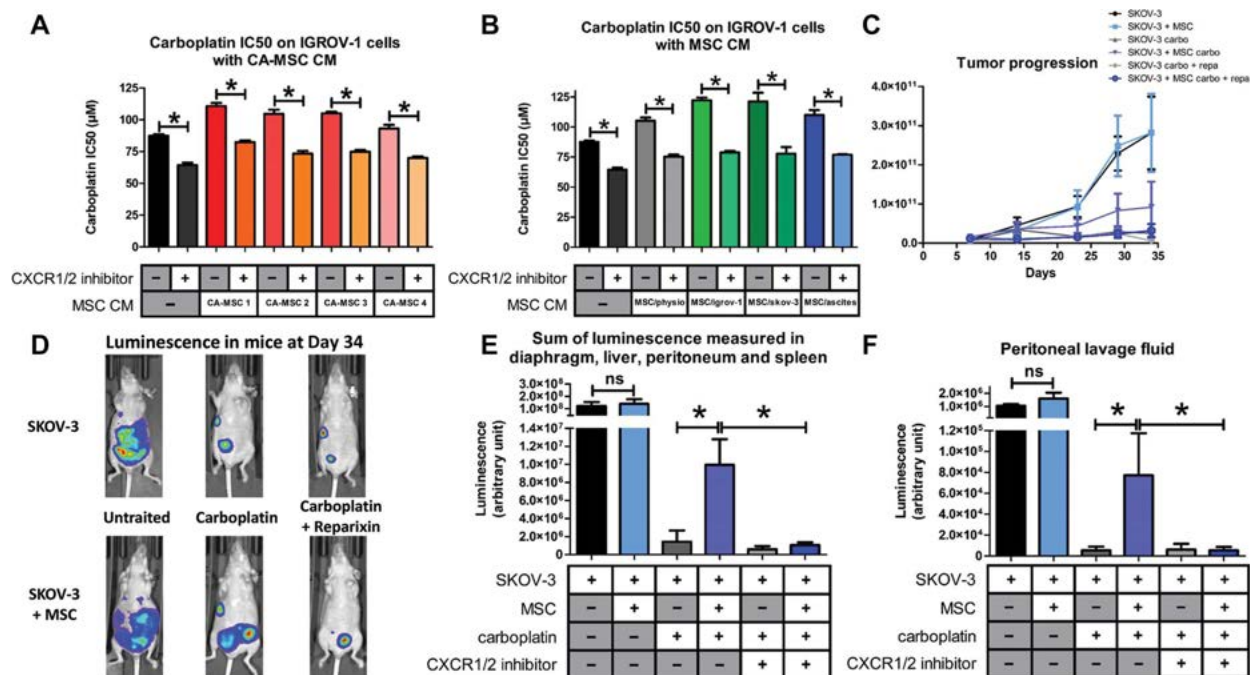


Figure 4 Implication of the CXCR1/2 axis in OTC resistance to carboplatin. **(A and B)** The carboplatin IC50 was monitored as described previously in [Figure 1](#). IGROV-1 cells were cultured in the presence or not of CM from BM-MSCs (MSC/physio), CA-MSCs ($n = 4$), or iCA-MSCs (MSC/igrov-1 and MSC/skov-3, MSC/ascites). At Day 1, cells were treated with carboplatin admixed or not with a CXCR1/2 inhibitor (100 µM). Cell viability was evaluated at Day 3. **(C)** Bioluminescence analysis through the whole body of the mice was performed once a week after an intraperitoneal injection of luciferin. **(D)** At Day 34, the whole-body bioluminescence of the mice was analyzed making it possible to obtain photographs to visualize and to quantify the luminescence illustrated here using one mouse per group. **(E and F)** On Day 36, the mice were euthanized and a peritoneal lavage was carried out with 5 ml of NaCl 0.9%. The peritoneum, spleen, liver, and diaphragm were removed. After addition of luciferin, the sum of the luminescence of the peritoneum, spleen, diaphragm, and liver **(E)** and the luminescence in the peritoneal lavage fluid **(F)** was measured. P -values of <0.05 (*) using a Wilcoxon–Mann–Whitney test indicate a significant difference.

OTCs did not affect tumor development ([Figure 4C](#)). Carboplatin treatment effectively reduced tumor development in mice, but significantly less when OTCs were co-injected with MSCs, confirming that MSCs induced chemoresistance to carboplatin. Interestingly, CXCR1/2 inhibition reversed the chemoresistance induced by MSCs, as tumor progression was abolished when mice were treated with a mix of carboplatin and CXCR1/2 inhibitor (reparixin) ([Figure 4D and E](#)). Therefore, we conclude that CXCR1/2 inhibitor can reverse the acquired chemoresistance mediated by MSCs via CXCR1/2 ligands.

MSCs could play a role in the anti-tumoral activity of immune cells

We and others have shown that factors secreted by MSCs are involved in re-educating macrophages by manipulating metabolic programs in differentially polarized macrophages ([Castells et al., 2012](#); [Vasandan et al., 2016](#)) such as IL-8 ([Gerszten et al., 1999](#)), IL-6, and LIF ([Duluc et al., 2007](#); [Castells et al., 2012](#)). Transcriptomic analysis ([Figure 2A](#)) revealed that iCA-MSCs upregulated factors involved in the activation of

immune cells, in particular CXCR1/2 ligands, IL-6, and LIF ([Figure 5A and B](#)), as well as CCL5, CXCL3, CXCL5, and CXCL6.

To clarify which factors secreted by MSCs are involved in macrophage polarization, we cultured monocytes from healthy donors in the presence of CM from BM-MSCs (physiological), CA-MSCs, or iCA-MSCs. The expression levels of M2-specific genes ([Figure 5C](#); [Supplementary Table S3](#)) were increased in the monocytes/macrophages cultured in the presence of CM from iCA-MSCs. Therefore, iCA-MSC CM were able to induce the upregulation of M2-specific markers, suggesting a conversion of naive monocytes into M2 macrophages.

M2 macrophages are generally pro-tumoral, and they do not have the tumoricidal properties of M1 macrophages. In order to assess this phenotype, we cultured luciferase expressing IGROV-1 (IGROV1-luc) with monocytes cultured in control medium, in CM from CA-MSCs ([Figure 5D](#)) or iCA-MSCs (MSC/igrov-1 or MSC/skov-3), or in ascites. Monocytes were cultured in ascites as a positive control for the M2 polarization of naive monocytes, as described by [Duluc et al. \(2007\)](#). In co-cultured conditions with either control medium or in BM-MSC CM, the monocytes were able to kill 70%–80%

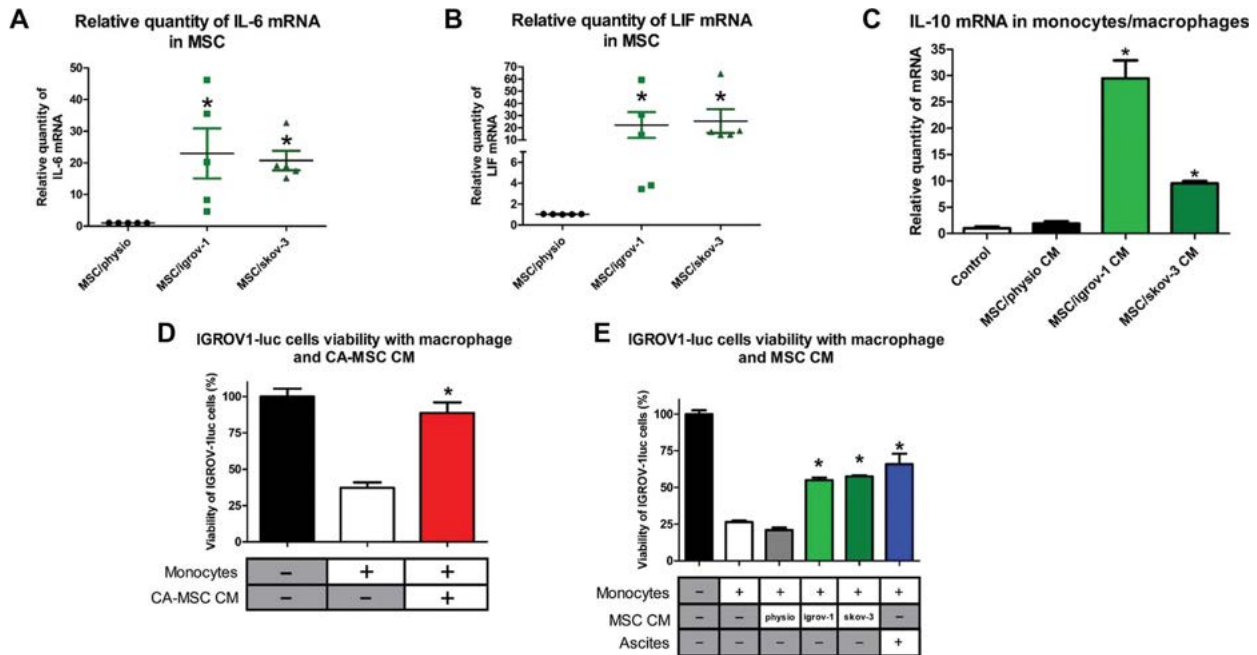


Figure 5 CA-MSCs facilitate monocyte to macrophage differentiation towards the M2 TAM phenotype. **(A and B)** The relative expression of mRNA coding for IL-6 **(A)** and LIF **(B)** was evaluated on BM-MSCs and the iCA-MSCs (induced by IGROV-1 (MSC/igrov-1) or SKOV-3 (MSC/skov-3) CM). The data from BM-MSCs were set to 1 and the relative quantity of mRNA is shown. **(C)** IL-10 mRNA expression levels were analyzed in human monocytes cultured in control media or in MSC/physio, MSC/igrov-1, or MSC/skov-3 CMs. The data from control media were set at 1 and the relative quantity of mRNA is shown. **(D and E)** The cytotoxic activity of the macrophages that have been cultured in different media (CA-MSC, BM-MSC, MSC/igrov-1, or MSC/skov-3 CMs or ascites) toward the IGROV-1luc (expressing luciferase) cells was evaluated by measuring luciferase activity. Bar graphs representing the IGROV-1luc cells viability (%) ($n = 4$). P -values of <0.05 (*) using a Wilcoxon–Mann–Whitney test indicate a significant difference.

of the OTCs. On the contrary, when naïve monocytes were cultured in CM from CA-MSCs or iCA-MSCs, they lost their ability to kill OTCs, and instead enhanced their proliferation **(Figure 5D and E)**.

In addition to their role in promoting the chemoresistance of OTCs, we conclude that CA-MSCs can be involved in polarizing macrophages via abolition of their tumoricidal functions.

CXCR1/2 inhibition restores the tumoricidal function of macrophages

Since CA-MSC and iCA-MSC induced a modification of the macrophage tumoricidal activity, and because this observation could be associated with a difference in CXCL1/2 and IL-8 secretions between these cells, we evaluated the impact of CXCR1/2 inhibition on the ability of macrophages cultured in CA-MSC CM to kill OTCs. We cultured IGROV1-luc with naïve monocytes either in control medium, in CM from CA-MSCs or iCA-MSCs (MSC/igrov-1 and MSC/skov-3), or in ascites, in the presence or absence of the CXCR1/2 inhibitor. While naïve monocytes cultured in CM from CA-MSCs or iCA-MSCs or in ascites were not able to efficiently kill OTCs, the same monocytes had greater tumoricidal ability when cultured in the same conditions in the

presence of the CXCR1/2 inhibitor **(Figure 6A)**. The CXCR1/2 inhibitor effect was particularly more pronounced on the monocytes cultured in CM from CA-MSCs than on the monocytes cultured in ascites.

Since the CXCR1/2 inhibitor restored the anti-tumoral properties of macrophages *in vitro*, we wondered if it would be similar *in vivo*. M1 macrophages are characterized by high levels of ROS production **(Tan et al., 2016)**. We therefore measured ROS production in macrophages isolated from mice that were injected with OTCs with or without MSCs and treated or not with a combination of carboplatin and the CXCR1/2 inhibitor (reparixin). We observed that the presence of MSCs caused a decrease in the ROS production by peritoneal macrophages. When mice injected with OTCs and MSCs were treated with reparixin, we observed an increase in the ROS production of peritoneal macrophages **(Figure 6B)** suggesting a polarization of the macrophages to an M1 phenotype. This observation could explain the slower tumor progression observed in this condition **(Figure 4C)**. In addition to the ROS production, part of the tumoricidal effect of peritoneal macrophages observed in mice could be due to an increase in phagocytosis observed in macrophages from mice injected with MSCs and treated with carboplatin and reparixin **(Supplementary Figure S7C)**.

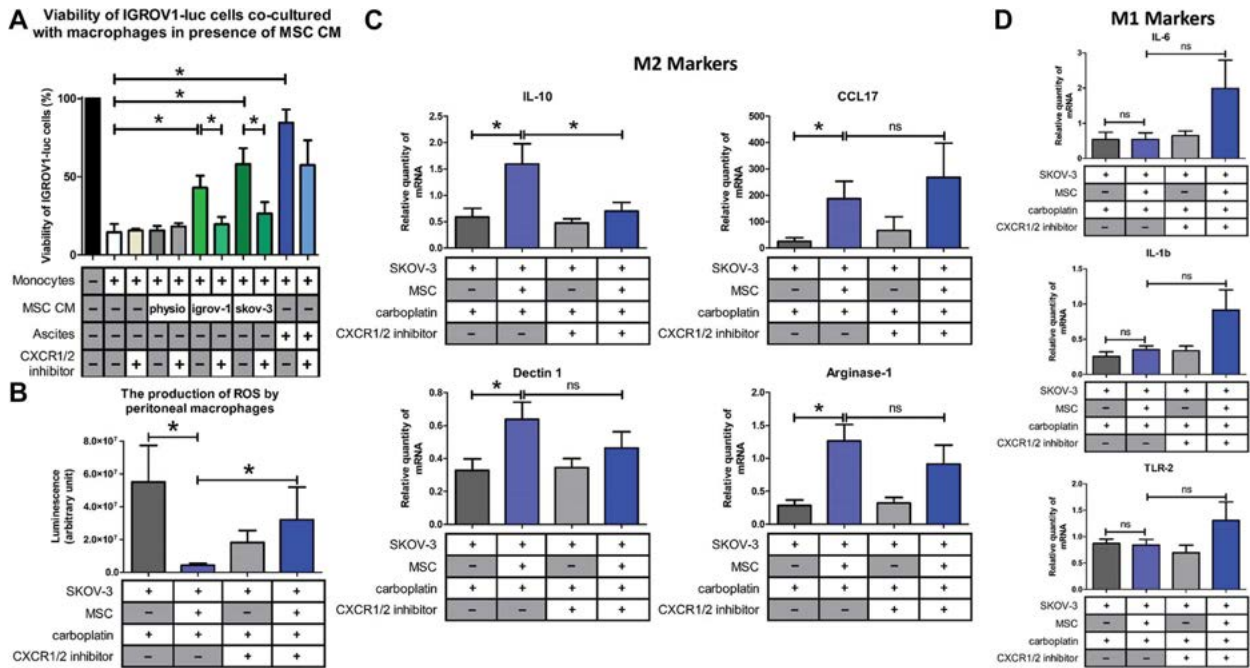


Figure 6 CXCR1/2 inhibition prevented the M2 macrophage polarization induced by CA-MSCs. (A) The cytotoxic activity of the macrophages was evaluated as described Figure 5D and E in the presence of a CXCR1/2 inhibitor. (B) The ROS production by peritoneal macrophages isolated from mice injected with SKOV-3 cells admixed or not with MSCs and treated or not with carboplatin +/- CXCR1/2 inhibitor was analyzed. (C and D) Gene expression analysis of peritoneal macrophages was analyzed by RT-qPCR (8 mice/group) on M2 (IL-10, CCL17, dectin-1, and arginase-1) and M1 (IL-6, IL-1 β , and TLR-2) markers. P-values of <0.05 (*) using a Wilcoxon–Mann–Whitney test indicate a significant difference.

When mice were injected with a combination of SKOV-3 cells and MSCs, and then treated with carboplatin, there was a high proportion of IL-10, arginase-1, dectin-1, and CCL17-positive macrophages, suggesting a M2 polarization compared to the mice injected with SKOV-3 cells alone (Figure 6C). When mice were co-treated with carboplatin and reparixin, macrophages did not express as much IL-10 levels, suggesting a shift in macrophage polarization. With regards to the M1 markers (Mantovani et al., 2004), our data suggest a slight upregulation of IL-1 β , IL-6, and TLR-2 expression in the presence of MSCs and reparixin (Figure 6D), despite the fact that gene expression profiles reveal usually an M1/M2 mixed-polarization phenotype in ovarian cancer (Reinartz et al., 2014; Zheng et al., 2017). The effect of reparixin appeared to be dependent on CXCR1/2 ligands secretions by MSCs because the CXCR1/2 inhibitor had no effect on the macrophage polarization in absence of these cells (Supplementary Figure S7D and E).

In order to evaluate whether the chemoresistance observed in the presence of MSCs was due to differential macrophage polarization, we performed an *in vivo* experiment to deplete macrophages in mice by clodronate injection. Upon macrophage depletion, the protective nature of MSCs was no longer effective (Supplementary Figure S7A and B). Similarly, in this context, the use of reparixin had no additive antitumor effect when combined

with carboplatin (Supplementary Figure S7A and B). Thus, most of the chemoprotective effect of MSCs observed *in vivo* appears to be a consequence of macrophage polarization.

In line with our previous results, we observed an increase in the concentration of human CXCL1, CXCL2, and IL-8 (Figure 7A–C, respectively) in the peritonea of mice injected with SKOV-3 cells and MSCs. When SKOV-3 and MSC tumor-bearing mice were treated with reparixin, we observed a decrease in the amount of the three cytokines, suggesting that a blockade of the CXCR1/2 leads to a reduction in the expression of these chemokines (Figure 7D). Of note, the endogenous mouse CXCL1 and CXCL2 levels were not affected (Figure 7E–G). We propose that decreasing number of OTCs could reduce the recruitment of MSCs to peritoneal tumors and their differentiation in CA-MSC, therefore resulting in a reduced concentration of peritoneal chemokines.

Altogether, our results show that through their released factors, CA-MSCs can protect OTCs to carboplatin but can also trigger monocyte differentiation to a pro-tumoral M2 phenotype, favoring tumor progression and the acquisition of chemoresistance by OTCs. When CXCR1/2 are inhibited, these CA-MSC-activated macrophages lose their M2 phenotype and exhibit anti-tumoral functions. Inhibition of CXCR1/2 is able to counteract the pro-tumoral effect of the microenvironment by sensitizing OTCs to carboplatin and inducing anti-tumor immunity (Figure 8).

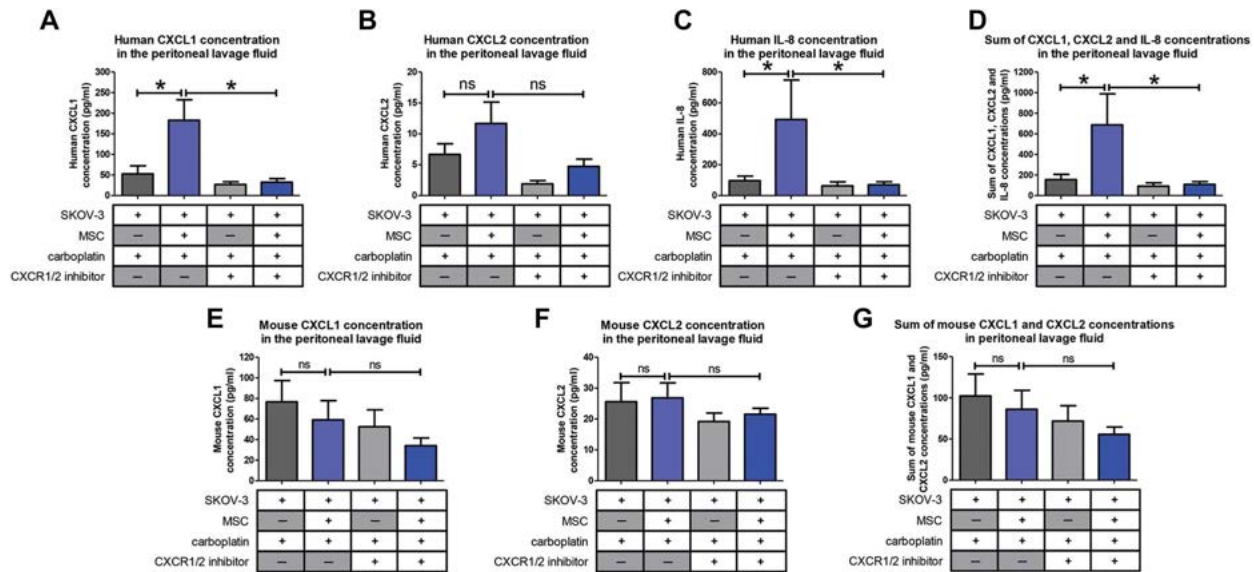


Figure 7 Levels of pro-inflammatory cytokines in the mouse peritonea. Levels of human and mouse chemokines CXCL1, CXCL2, and IL-8 in the mice peritonea were evaluated by ELISA (8 mice/group). *P*-values of <0.05 (*) using a Wilcoxon–Mann–Whitney test indicate a significant difference.

Discussion

In this study, we showed that MSCs recruited to an injury site such as a cancer nodule (CA-MSCs) presented specific properties compared to naïve BM-MSCs. We showed that CA-MSCs did not influence the OTC dissemination or proliferation either *in vitro* or *in vivo*, but instead played a role in the acquired chemoresistance of OTCs against carboplatin. In addition, we demonstrated that CA-MSCs are involved in the recruitment and the polarization of macrophages. We characterized the precise mechanisms by which CA-MSCs exert their biological functions, in particular via secreting CXCR1/2 ligands. We studied the role played by these ligands, while other authors have mainly focused their attentions on IL-6 and its role in cancer cell proliferation (Wang et al., 2010; Lo et al., 2011; Qiao et al., 2018).

CA-MSCs may differentiate from MSCs of different origins. In this study, we obtained iCA-MSCs by culturing BM-MSCs from healthy female donors at 60–70 years of age in the presence of CM from OTCs or in the presence of ascites. We were able to transform BM-MSCs to CA-MSCs via the secreted factors present in their microenvironment. Interestingly, ascitic fluid from cancer patients had more or less the same effect on the differentiation of BM-MSCs. These data indicated that factors secreted by OTCs are sufficient to induce the chemoprotective phenotype of CA-MSCs, and that ascites contain factors secreted by various cell types resulting in a comparable phenotype. This work is supported by the recent published data by Coffman et al. (2019) who showed that ovarian CA-MSCs are reprogrammed in the vicinity of the tumor.

We found that BM-MSCs cultured in IGROV-1 CM (iCA-MSCs) lost their ability to differentiate into osteoblasts and adipocytes and behaved as CA-MSCs isolated from tumor biopsies of ovarian adenocarcinomas. We have shown that through their secreted factors, cancer cells can educate MSCs depending on the tumor microenvironment, therefore validating the hypothesis that tumor cells can influence the function of MSCs. However, it remains to be determined to what cellular state these CA-MSCs would have differentiated into, and what markers and function would define them. While it may be plausible to find them differentiating into CAF, we were not able to characterize them by the expression of classical markers such as α SMA, PDGFR, FSP1, or FAP.

Even if iCA-MSCs obtained from BM-MSCs adopted a phenotype similar to the CA-MSCs found in ovarian adenocarcinomas, it does not prove that CA-MSCs originate from BM-MSCs. These CA-MSCs could originate from MSCs recruited to the tumor site. Nevertheless, they could also derive from ‘resident’ MSCs located in the tissues where the tumor develops. Indeed, MSCs are not restricted to the bone marrow and are found in virtually all tissues, including ovaries (Stimpfel et al., 2014). Another possible origin could be the adipose tissue, a source of MSCs called adipose tissue-derived stromal cells (ADSC). Thus, especially during peritoneal carcinomatosis, ADSCs from the epiploon could constitute a source of CA-MSCs, given their proximity to the OTCs disseminated in the peritoneum.

CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL8 (IL-8), and CCL5 were found to be upregulated in iCA-MSCs. As CXCL1, CXCL2, and IL-8 interact with the same receptors (CXCR1/2), we analyzed

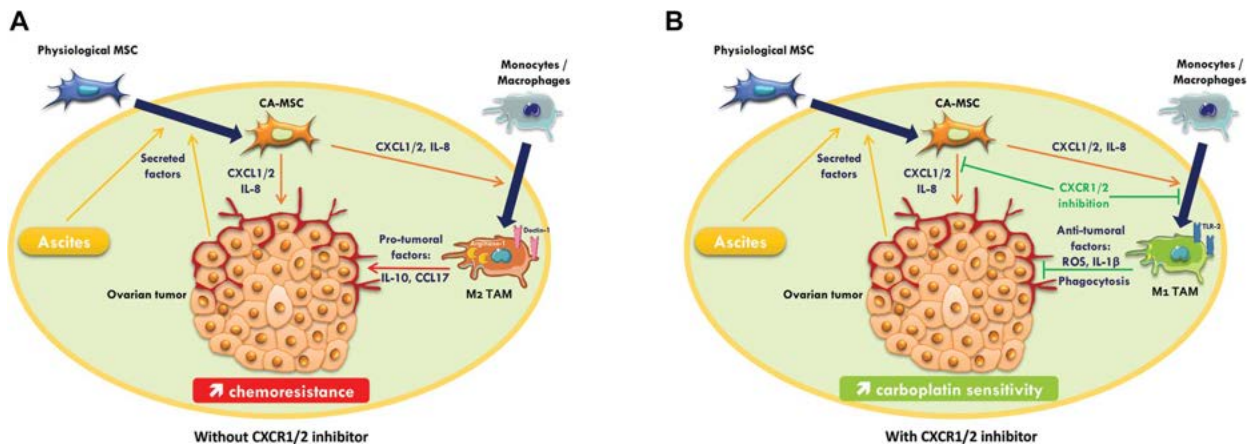


Figure 8 Roles of MSCs and macrophages on ovarian tumor. (A) Secreted factors by OTCs induce differentiation of MSC into CA-MSC, which in turn lead to the secretion of chemoprotective factors such as CXCL1/2 and IL-8. These chemokines polarize monocytes/macrophages to a M2 pro-tumoral phenotype promoting tumor growth. (B) CXCR1/2 inhibition restores carboplatin sensitivity in OTCs and reinstates the anti-tumoral activity of tumor-associated macrophages, thereby improving treatment efficiency.

their combined interactions and implications for the acquisition of chemoresistance and the recruitment of immune cells in our model. We confirmed that their upregulation was correlated to patient prognosis. We found that the serum concentrations of these three chemokines, measured in ovarian adenocarcinoma patients at the time of diagnosis, predicted the sensitivity profile of the patients to platinum-based chemotherapy. To corroborate this retrospective study, it would be of interest to perform a prospective study to show that chemokine assays can predict patient treatment response, in order to adjust the treatment regimen.

We found IL-8 to be the most highly upregulated cytokine in CA-MSCs or iCA-MSCs. It has been reported to promote angiogenesis and cancer growth (Wang et al., 2015), therefore in previous experiments, we tried to abolish the chemoresistance acquisition by OTCs using an antibody directed against IL-8 (Skov et al., 2008). We observed that the antibody had only a very weak effect, suggesting that other molecules were playing an important role, and/or that the pathway involving IL-8 receptors (CXCR1/2) was not inhibited because other molecules such as CXCL1 and CXCL2 could activate these receptors.

Hence, in this study, we analyzed the effect of the inhibition of the IL-8 receptors, CXCR1/2. Reparixin, a CXCR1/2 inhibitor, had previously been used in a mouse model of pancreatic ductal adenocarcinoma to disrupt tumor/fibroblast interactions and improve overall survival in mice (Ijichi et al., 2011). We found that the CXCR1/2 inhibitor could revert the acquired chemoresistance of OTCs both *in vitro* and *in vivo*. Therefore, reparixin is an effective drug to prevent acquired carboplatin chemoresistance. Reparixin is currently being tested in patients with metastatic non-human epidermal growth factor receptor (HER2)-amplified breast cancers in an open label Phase 1b clinical study (REP0111) in combination with paclitaxel. This

study has demonstrated the safety and tolerability of the combination and recorded objective responses. A 30% response rate was recorded, with durable responses of longer than 12 months in two patients (Schott et al., 2017) (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02370238>).

In the case of cancer, IL-8 (as well as CXCL1 or CXCL2) is known to be involved in angiogenesis and the recruitment and activation of immune cells. Castells et al. (2012) observed increased recruitment of macrophages to the tumor site in the presence of CA-MSCs. In fact, monocytes, upon sensing several environmental stresses are recruited to damaged and infected tissues as well as tumor sites and differentiate to macrophages en-route (Vasandan et al., 2016). Previous work performed in our laboratory suggests that CA-MSCs may be able to influence the phenotype of peritoneal macrophages by polarizing them to a pro-tumoral phenotype (M2) (Castells et al., 2012). In addition, in the case of inflammation, MSCs can induce distinct alterations in human macrophage polarization programs depending on the activation module at macrophage interface (Vasandan et al., 2016). In hematological diseases such as multiple myeloma, MSCs and macrophages can interact to induce a distinct state of macrophage polarization (Kim et al., 2012; Asimakopoulos et al., 2013). IL-8, known to induce the chemotaxis of immune cells to the tumor site, may play a role in CA-MSC-induced macrophage recruitment. It could also be the factor responsible for the CA-MSC-induced polarization of macrophages to a pro-tumoral phenotype. Dijkgraaf et al. (2013) have shown that carboplatin chemotherapy increases the number of cancer-supporting M2 macrophages. Our experimental model allowed us to isolate peritoneal macrophages and determine that MSCs could induce M2 polarization. Co-administration of reparixin and carboplatin was able to decrease the transcription of IL-10, a major marker of M2-type macrophages. This combined treatment also led to

an increase of ROS production by peritoneal macrophages and an upregulation of the M1 markers: IL-1 β , IL-6, and TLR-2. Therefore, reparixin can sensitize OTCs to carboplatin by decreasing the proportion of M2 macrophages or by repolarizing these macrophages to an anti-tumoral M1 phenotype.

Finally, when SKOV-3 + MSC tumor-bearing mice were treated with reparixin, we observed a decrease in the levels of peritoneal CXCR1/2 ligands, suggesting that a CXCR1/2 blockade leads to a decrease in the expression of its ligands. In addition, we propose that a decrease in the number of tumor cells could reduce the number of MSCs recruited to peritoneal tumors and differentiated in CA-MSC, resulting in a decreased concentration of the chemokines in the peritoneum. Therefore, CXCR1/2 inhibition could have a direct effect on macrophages by restoring their anti-tumoral activity. Moreover, it could also have an indirect effect by decreasing the levels of chemokines secreted by CA-MSCs, which would reduce M2 macrophage polarization.

To conclude, we showed that CA-MSCs, which are part of the ovarian tumor microenvironment, can induce OTCs resistance to chemotherapy such as carboplatin. These CA-MSCs secrete chemokines, including IL-8, CXCL1, and CXCL2 that bind to CXCR1/2. The combination of a CXCR1/2 inhibitor and platinum-based chemotherapy may be a useful strategy to restore carboplatin sensitivity in OTCs. This strategy may also modify the phenotype of tumour-associated macrophages and reinstate their anti-tumoral activity.

Materials and methods

Cell culture

The human ovarian adenocarcinoma IGROV-1 (a gift from the Gustave Roussy Institute, Paris) and SKOV-3 (ATCC: HTB-77) cell lines were grown in RPMI supplemented with fetal calf serum (10%), L-glutamine (1%), and penicillin/streptomycin (1%).

Primary BM-MSCs from donors that had undergone orthopedic surgery (Médipole Clinic - Toulouse), CA-MSCs from ovarian cancer patients, were grown in DMEM supplemented with fetal calf serum (10%), L-Glutamine (1%), and penicillin/streptomycin (1%).

Primary human macrophages derived from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were cultured in the Macrophage-SFM mediumTM (Gibco).

All cells were cultured at 37°C in 5% CO₂. They were regularly treated with NormocinTM (Invivogen) (100 μ g/ml), to prevent mycoplasma contamination.

Ascites and CM

Ascite samples ($n = 10$) from ovarian cancer patients were obtained from the biological resource center bank at the IUCT-Oncopole. The ascitic fluid was centrifuged at 300 g for 5 min. Supernatants were pooled and filtered at 0.2 μ m. The CM from BM-MSCs, CA-MSCs, IGROV-1, and SKOV-3 cells corresponded to the supernatant of the cell culture media from confluent cells after 3 days of growth and filtered at 0.2 μ m.

Isolation of CA-MSCs from patient biopsies

From fresh tumor biopsies of patients with ovarian cancer, cells were isolated according to their plastic adhesion and then sorted by FACS using the MSC Phenotyping Kit, human (Miltenyi Biotec). CD73⁺ CD90⁺ CD105⁺ and CD14⁻ CD20⁻ CD34⁻ CD45⁻ cells were considered to be CA-MSCs.

Generation of iCA-MSCs

BM-MSCs were cultured in DMEM diluted 1:1 either with CM from the different types of OTCs or ascites. The medium was renewed twice a week. iCA-MSCs were generated after 21 days. Three types of iCA-MSCs, MSC/igrov-1, MSC/skov-3, and MSC/ascite, were induced using the CM of IGROV-1 or SKOV-3 cells or ascites, respectively. To generate CM from iCA-MSCs, media were replaced by complete DMEM and 3 days later, supernatants were filtered at 0.2 μ m. MSCs cultured in complete DMEM were named physiological BM-MSCs. After 21 days in different CM, MSCs were treated with carboplatin (50 μ M, Fresenius Kabi), the pan-PI3K inhibitor GDC0941 (1 μ M, Axon), the MEK inhibitor AZD6244 (1 μ M, Apexbio), the NF- κ B inhibitor Bay 11-7082 (10 μ M, Sigma-Aldrich), or vehicle (DMSO, 0.05%, Sigma-Aldrich) in complete DMEM. Three days later, supernatants were filtered at 0.2 μ m.

Cell viability tests

IGROV-1 cells (5×10^3) were added per well into 96-well plates in the presence of CM from the different types of MSCs (described above) diluted 1:1 in complete RPMI. After 24 h, cells were treated with a range of concentrations of carboplatin (Fresenius Kabi) (15.625–1000 μ M) with or without the CXCR1/2 inhibitor (AS-62401, AnaSpec, 100 μ M). After 48 h of treatment, cell viability was evaluated using the WST-8 Cell Counting Kit (Dojindo) according to the manufacturer's instructions.

OTC viability in co-culture with macrophages

PBMC-derived monocytes (5×10^4) were added per well into 96-well white plates and were cultured in CM (diluted 1:1 with Macrophage-SFM (GibcoTM)) from BM-MSCs, CA-MSCs, iCA-MSCs or in ascites. After 24 h, 2.5×10^4 IGROV-1luc were added into the wells. After 3 days of co-culture, IGROV-1luc cells viability was evaluated by bioluminescence using the Steady-Glo[®] Luciferase Assay System (Promega) according to the manufacturer's instructions.

Western blot analysis

Protein extractions were performed and 15 μ g of extracted proteins were separated by SDS-PAGE and revealed by antibodies directed against actin (1:1000, Cell Signaling Technology, #8457), PDGFR α (1:1000; Cell Signaling Technology, #3174), and α -smooth muscle actin (1:1000, Cell Signaling Technology, #19245).

RNA extractions

RNA was extracted from MSCs using the RNeasy Protect Cell Reagent and the RNeasy Plus mini kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions. RNA was extracted from murine macrophages after 2 h of adhesion in 48-well plates, using the RNeasy-Micro Total RNA Isolation kit (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions.

Transcriptomic analysis by Nanostring Technology

The total RNAs extracted from BM-MSCs and iCA-MSCs (six sample pairs) were analyzed by Nanostring[®] technology with the 'nCounter PanCancer Immune Profiling Panel' to study the transcription of 770 genes (Cesano, 2015). A selection of 29 housekeeping genes was used to calculate the relative amount of target RNA.

Transcriptional analysis by RT-qPCR

Complementary DNA (cDNA) derived from total RNA was synthesized using the Verso cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific), according to the manufacturer's instructions. PCR was performed using the LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master (Roche). The primers used are listed in the Supplementary Table S4.

Quantification of chemokine concentrations by ELISA

The concentrations of murine and human CXCL1, murine and human CXCL2, and human IL-8 were determined by ELISA using the respective ELISA kits, EK0722, EK0723, EK0452 (Boster Biological Technology), ARG80185 (Arigo biolaboratories), EK0413 (Boster Biological Technology), and the IL-8 DuoSet[®] ELISA Development System (R&D Systems), according to the manufacturer's instructions.

Transcriptional analysis to study macrophage polarization

PBMC (1×10^5) were added per well in 48-well plate wells. Macrophages were selected by adhesion (2 h). Then, they were immediately brought into contact with CM from BM-MSCs or iCA-MSCs. Twenty-four hours later, macrophage RNAs were extracted as previously described.

Animals

The 4 to 5-week-old female Swiss nude athymic mice (Charles River laboratories, France) were housed according to the standards of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations. They were included in experiments after one week of quarantine.

In vivo experiments

SKOV-3 or SKOV-3luc cells (1×10^7) with or without 10^6 MSCs were injected intraperitoneally into nude mice. Treatments began at Day 7 and consisted of carboplatin injection (200 μ l/mouse of a solution of 4.5 mg/ml diluted in 0.9% NaCl, Fresenius Kabi) every 7 days for 3 weeks and reparixin injection (30 mg/kg diluted in a solution of DMSO/PBS (v/v), AdooQ

Bioscience) three times a week for 3 weeks. Intraperitoneal injection of clodronate liposome (200 μ l/mouse of a solution of 1.25 mg/ml diluted in PBS, CliniSciences, #16001003) began one day prior cell injection and then once a week for 4 weeks. Tumor progression was monitored after 4 weeks by determining the peritoneal cancer index as described in Supplementary Table S1.

Bioluminescence

Mice were anesthetized by inhalation of isoflurane (Abbott) at 3% with 1 L/min flow of oxygen. An injection of luciferin (XenoLight D-Luciferin-K + Salt Bioluminescent Substrate, PerkinElmer) was performed intraperitoneally in each mouse 10 min prior to analysis with IVIS[®] Spectrum *in vivo* imaging system (PerkinElmer), according to the manufacturer's instructions. Normal mouse behaviour was evaluated before returning them to their original housing. Images were analyzed by Living Image Software (PerkinElmer) for evaluation and quantification.

Organ luminescence

After euthanasia, the peritonea, spleens, livers, and diaphragms of the mice were removed. These organs were dissected and placed in 96-well white plates. The peritoneal lavage fluid (150 μ l) was also placed in white plates. After the addition of luciferin (150 μ g/ml, XenoLight D-Luciferin-K + Salt Bioluminescent Substrate, PerkinElmer), organ luminescence was measured using the EnVision[™] Multilabel Plate Reader (PerkinElmer).

Isolation of peritoneal macrophages

The peritoneal lavage fluid (see above) was centrifuged (300 g for 10 min). After lysis of the red blood cells, cells were separated using percoll (GE Healthcare Life Sciences, 17-0891), according to the manufacturer's instructions. Cells (1×10^5) from the macrophage-containing fraction were inoculated in 48-well plates. The macrophages were selected by adhesion (2 h). ROS production, as well as their mRNA expression levels were evaluated as described below or previously, respectively.

ROS production

After 2 h of adhesion at 37°C and 5% CO₂, the NADPH oxidase activity of 10^5 peritoneal macrophages was measured by chemiluminescence in the presence of 60 μ M of a chemiluminescent probe (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione, Sigma-Aldrich). Chemiluminescence production was analyzed continuously for 90 min with a luminometer (EnVision[™] Multilabel Plate Readers, PerkinElmer).

Macrophage phagocytosis assay

Peritoneal macrophages were co-cultured 2 h at 37°C with pHrodo[™] Red Zymosan Bioparticles[™] Conjugate for Phagocytosis (ThermoFischer Scientific), according to the manufacturer's instructions. Fluorescence was measured with a plate reader luminometer (Envision, PerkinElmer).

Statistics

For chemoresistance tests, RT-qPCRs, co-cultures, cytometry data, and *in vivo* test results, the comparison between groups was performed using a Wilcoxon–Mann–Whitney test (independent non-parametric data). *P*-values < 0.05 indicate a significant difference. An ANOVA test was applied to compare the six BM-MSc control samples versus the six iCA-MSc (MSc/igrov-1) samples. The *P*-values were corrected for multiple tests using the Benjamini and Hochberg (BH) method.

Study approval

All experiments involving animals were performed in accordance with the relevant European guidelines and regulations. The protocols and the experiments were approved by the Claudius Regaud Institute animal ethics committee (approval number: ICR-2015-06).

Human studies: All human biopsies and sera came from patients who provided written informed consent prior to inclusion in the study. The study has been approved by the IUCT-O (Toulouse University Institute of Cancer-Oncopole) ethics committee.

Supplementary material

Supplementary material is available at *Journal of Molecular Cell Biology* online.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the animal facilities of the Institut Claudius Regaud and the CRCT, as well as the transcriptomic platform at the CRCT. The authors thank Elisabeth Bellard and the ‘Toulouse Réseau Imagerie’ core IPBS facility (Genotoul, Toulouse, France) for technical support. The authors thank Emeline Sarot, Carine Valle, Marie Tosolini, Manon Farcé, Frédéric Lopez, and Pôle Technologique du CRCT—Plateaux Génomique et Transcriptomique, Bioinformatique, Cytométrie, Imagerie, INSERM-UMR1037. The authors thank Hubert Lulka for his help with animal imaging and Prof. H. Avet-Loiseau, Prof. E. Chatelut, and J. Guillermet-Guibert for administrative support. The manuscript has been revised for the English by an independent scientific language editing service (AngloScribe).

Funding

This work was funded by a grant from the French government (IDEX 2012) and the Groupe de recherche de l’Institut Claudius Regaud (GRICR). We are grateful to the associations ‘Phil-Anthrope’ and the Rotary club of Lectoure who provided a special grant for this project.

Conflict of interest: none declared.

Author contributions: B.C. and A.C. designed the experiments (concept and design, collection and assembly of data, data analysis and interpretation); A.L.N. and M.P. designed some experiments, performed experiments, and analyzed the data

(collection and assembly of data); B.T., L.Lemaitre, R.M., H.L., M.-V.J., K.C., M.G., L.Lefevre, E.M., A.M., and G.F. provided help with the experiments (collection and assembly of data); A.L.N. and B.C. wrote the manuscript; J.-P.D. provided critical feedback (intellectual support). All authors reviewed the manuscript.

References

- Asimakopoulos, F., Kim, J., Denu, R.A., et al. (2013). Macrophages in multiple myeloma: emerging concepts and therapeutic implications. *Leuk. Lymphoma* 54, 2112–2121.
- Beyar-Katz, O., Magidey, K., Ben-Tsedek, N., et al. (2016). Bortezomib-induced pro-inflammatory macrophages as a potential factor limiting anti-tumour efficacy: Bortezomib-induced MM aggressiveness. *J. Pathol.* 239, 262–273.
- Browne, A., Sriraksa, R., Guney, T., et al. (2013). Differential expression of IL-8 and IL-8 receptors in benign, borderline and malignant ovarian epithelial tumours. *Cytokine* 64, 413–421.
- Castells, M., Milhas, D., Gandy, C., et al. (2013). Microenvironment mesenchymal cells protect ovarian cancer cell lines from apoptosis by inhibiting XIAP inactivation. *Cell Death Dis.* 4, e887.
- Castells, M., Thibault, B., Mery, E., et al. (2012). Ovarian ascites-derived Hospicells promote angiogenesis via activation of macrophages. *Cancer Lett.* 326, 59–68.
- Cesano, A. (2015). nCounter® PanCancer immune profiling panel (NanoString Technologies, Inc., Seattle, WA). *J. Immunother. Cancer* 3, 42.
- Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., et al. (2007). Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 25, 2739–2749.
- Coffman, L.G., Pearson, A.T., Frisbie, L.G., et al. (2019). Ovarian carcinoma-associated mesenchymal stem cells arise from tissue-specific normal stroma. *Stem Cells* 37, 257–269.
- Dalton, W.S., Hazlehurst, L., Shain, K., et al. (2004). Targeting the bone marrow microenvironment in hematologic malignancies. *Semin. Hematol.* 41, 1–5.
- De Palma, M., and Lewis, C.E. (2013). Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies. *Cancer Cell* 23, 277–286.
- Dijkgraaf, E.M., Heusinkveld, M., Tummers, B., et al. (2013). Chemotherapy alters monocyte differentiation to favor generation of cancer-supporting M2 macrophages in the tumor microenvironment. *Cancer Res.* 73, 2480–2492.
- Duluc, D., Delneste, Y., Tan, F., et al. (2007). Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood* 110, 4319–4330.
- Gerszten, R.E., Garcia-Zepeda, E.A., Lim, Y.-C., et al. (1999). MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature* 398, 718–723.
- Gutierrez-Gonzalez, A., Martinez-Moreno, M., Samaniego, R., et al. (2016). Evaluation of the potential therapeutic benefits of macrophage reprogramming in multiple myeloma. *Blood* 128, 2241–2252.
- Ha, H., Debnath, B., and Neamati, N. (2017). Role of the CXCL8–CXCR1/2 axis in cancer and inflammatory diseases. *Theranostics* 7, 1543–1588.
- Hass, R., Kasper, C., Böhm, S., et al. (2011). Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): a comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun. Signal.* 9, 12.
- Hayashi, S., Kurdowska, A., Miller, E.J., et al. (1995). Synthetic hexa- and heptapeptides that inhibit IL-8 from binding to and activating human blood neutrophils. *J. Immunol.* 1950, 814–824.
- Hillyer, P., Mordelet, E., Flynn, G., et al. (2003). Chemokines, chemokine receptors and adhesion molecules on different human endothelia: discriminating the tissue-specific functions that affect leucocyte migration. *Clin. Exp. Immunol.* 134, 431–441.
- Hofer, H.R., and Tuan, R.S. (2016). Secreted trophic factors of mesenchymal stem cells support neurovascular and musculoskeletal therapies. *Stem Cell Res. Ther.* 7, 131.

- Ijichi, H., Chytil, A., Gorska, A.E., et al. (2011). Inhibiting *Cxcr 2* disrupts tumor-stromal interactions and improves survival in a mouse model of pancreatic ductal adenocarcinoma. *J. Clin. Invest.* *121*, 4106–4117.
- Kim, H.Y., Choi, J.H., Kang, Y.J., et al. (2011). Reparixin, an inhibitor of CXCR1 and CXCR2 receptor activation, attenuates blood pressure and hypertension-related mediators expression in spontaneously hypertensive rats. *Biol. Pharm. Bull.* *34*, 120–127.
- Kim, J., Denu, R.A., Dollar, B.A., et al. (2012). Macrophages and mesenchymal stromal cells support survival and proliferation of multiple myeloma cells. *Br. J. Haematol.* *158*, 336–346.
- Le Naour, A., and Couderc, B. (2017). Role of MSCs in antitumor drug resistance. In: Bolontrade, M.F., and García, M.G. (eds). *Mesenchymal Stromal Cells as Tumor Stromal Modulators*. New York & London: Academic Press, 295–333.
- Lo, C.-W., Chen, M.-W., Hsiao, M., et al. (2011). IL-6 trans-signaling in formation and progression of malignant ascites in ovarian cancer. *Cancer Res.* *71*, 424–434.
- Lønning, P.E., and Knappskog, S. (2013). Mapping genetic alterations causing chemoresistance in cancer: identifying the roads by tracking the drivers. *Oncogene* *32*, 5315–5330.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., et al. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* *25*, 677–686.
- McMillin, D.W., Delmore, J., Weisberg, E., et al. (2010). Tumor cell-specific bioluminescence platform to identify stroma-induced changes to anticancer drug activity. *Nat. Med.* *16*, 483–489.
- Pasquet, M., Golzio, M., Mery, E., et al. (2010). Hospicells (ascites-derived stromal cells) promote tumorigenicity and angiogenesis. *Int. J. Cancer* *126*, 2090–2101.
- Phinney, D.G., and Prockop, D.J. (2007). Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair—current views. *Stem Cells* *25*, 2896–2902.
- Picaud, L., Thibault, B., Mery, E., et al. (2014). Evaluation of the effects of hyaluronic acid-carboxymethyl cellulose barrier on ovarian tumor progression. *J. Ovarian Res.* *7*, 40.
- Qiao, Y., Zhang, C., Li, A., et al. (2018). IL6 derived from cancer-associated fibroblasts promotes chemoresistance via CXCR7 in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncogene* *37*, 873–883.
- Rafii, A., Mirshahi, P., Poupot, M., et al. (2008). Oncologic trogocytosis of an original stromal cells induces chemoresistance of ovarian tumours. *PLoS One* *3*, e3894.
- Reinartz, S., Schumann, T., Finkernagel, F., et al. (2014). Mixed-polarization phenotype of ascites-associated macrophages in human ovarian carcinoma: correlation of CD163 expression, cytokine levels and early relapse: macrophages in human ovarian carcinoma. *Int. J. Cancer* *134*, 32–42.
- Schott, A.F., Goldstein, L.J., Cristofanilli, M., et al. (2017). Phase Ib pilot study to evaluate reparixin in combination with weekly paclitaxel in patients with HER-2-negative metastatic breast cancer. *Clin. Cancer Res.* *23*, 5358–5365.
- Shi, Y., Du, L., Lin, L., et al. (2016). Tumour-associated mesenchymal stem/stromal cells: emerging therapeutic targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* *16*, 35.
- Shree, T., Olson, O.C., Elie, B.T., et al. (2011). Macrophages and cathepsin proteases blunt chemotherapeutic response in breast cancer. *Genes Dev.* *25*, 2465–2479.
- Skov, L., Beurskens, F.J., Zachariae, C.O.C., et al. (2008). IL-8 as antibody therapeutic target in inflammatory diseases: reduction of clinical activity in palmoplantar pustulosis. *J. Immunol.* *181*, 669–679.
- Stimpfel, M., Cerkovnik, P., Novakovic, S., et al. (2014). Putative mesenchymal stem cells isolated from adult human ovaries. *J. Assist. Reprod. Genet.* *31*, 959–974.
- Tan, H.-Y., Wang, N., Li, S., et al. (2016). The reactive oxygen species in macrophage polarization: reflecting its dual role in progression and treatment of human diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* *2016*, 2795090.
- Thomson, A.W. (1998). *The Cytokine Handbook* (3rd edn). San Diego, California: Academic Press.
- Tomao, F., D'Incalci, M., Biagioli, E., et al. (2017). Restoring platinum sensitivity in recurrent ovarian cancer by extending the platinum-free interval: myth or reality? *Cancer* *123*, 3450–3459.
- Vasandan, A.B., Jahnavi, S., Shashank, C., et al. (2016). Human mesenchymal stem cells program macrophage plasticity by altering their metabolic status via a PGE2-dependent mechanism. *Sci. Rep.* *6*, 38308.
- Voloshin, T., Voest, E.E., and Shaked, Y. (2013). The host immunological response to cancer therapy: an emerging concept in tumor biology. *Exp. Cell Res.* *319*, 1687–1695.
- Wang, J., Wang, Y., Wang, S., et al. (2015). Bone marrow-derived mesenchymal stem cell-secreted IL-8 promotes the angiogenesis and growth of colorectal cancer. *Oncotarget* *6*, 42825–42837.
- Wang, Y., Niu, X.L., Qu, Y., et al. (2010). Autocrine production of interleukin-6 confers cisplatin and paclitaxel resistance in ovarian cancer cells. *Cancer Lett.* *295*, 110–123.
- Wang, Y., Qu, Y., Niu, X.L., et al. (2011). Autocrine production of interleukin-8 confers cisplatin and paclitaxel resistance in ovarian cancer cells. *Cytokine* *56*, 365–375.
- Zheng, X., Turkowski, K., Mora, J., et al. (2017). Redirecting tumor-associated macrophages to become tumoricidal effectors as a novel strategy for cancer therapy. *Oncotarget* *8*, 48436–48452.
- Zheng, Y., Cai, Z., Wang, S., et al. (2009). Macrophages are an abundant component of myeloma microenvironment and protect myeloma cells from chemotherapy drug-induced apoptosis. *Blood* *114*, 3625–3628.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Attal, M.; Lauwers-Cances, V.; Hulin, C.; Leleu, X.; Caillot, D.; Escoffre, M.; Arnulf, B.; Macro, M.; Belhadj, K.; Garderet, L.; Roussel, M.; Payen, C.; Mathiot, C.; Fermand, J. P.; Meuleman, N.; Rollet, S.; Maglio, M. E.; Zeytoonjian, A. A.; Weller, E. A.; Munshi, N.; Anderson, K. C.; Richardson, P. G.; Facon, T.; Avet-Loiseau, H.; Harousseau, J.-L.; Moreau, P. Lenalidomide, Bortezomib, and Dexamethasone with Transplantation for Myeloma. *The New England Journal of Medicine* **2017**, *376* (14), 1311–1320. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1611750>.
- (2) Kyle, R. A. Multiple Myeloma. *The New England Journal of Medicine* **2004**, *14*.
- (3) Antonio, P.; Kenneth, A. Multiple Myeloma. *The New England Journal of Medicine* **2011**, *15*.
- (4) Kristinsson, S. Y.; Landgren, O.; Dickman, P. W.; Derolf, Å. R.; Björkholm, M. Patterns of Survival in Multiple Myeloma: A Population-Based Study of Patients Diagnosed in Sweden From 1973 to 2003. *Journal of Clinical Oncology* **2007**, *25* (15), 1993–1999. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.09.0100>.
- (5) Howlader, N.; Noone, A.; Krapcho, M.; Miller, D.; Brest, A.; Yu, M.; et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016, National Cancer Institute. Bethesda, MD, https://seer.cancer.gov/csr/1975_2016/.
- (6) Monnereau, A.; Remontet, L.; Maynadié, M.; Binder-Foucard, F.; Belot, A.; Troussard, X.; Bossard, N. *Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012: étude à partir des registres des cancers du réseau Francim*; Institut de veille sanitaire: Saint-Maurice, 2013.
- (7) Greipp, P. R.; Miguel, J. S.; Durie, B. G. M.; Crowley, J. J.; Barlogie, B.; Bladé, J.; Boccadoro, M.; Child, J. A.; Avet-Loiseau, H.; Kyle, R. A.; Lahuerta, J. J.; Ludwig, H.; Morgan, G.; Powles, R.; Shimizu, K.; Shustik, C.; Sonneveld, P.; Tosi, P.; Turesson, I.; Westin, J. International Staging System for Multiple Myeloma. *Journal of Clinical Oncology* **2005**, *23* (15), 3412–3420. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.04.242>.
- (8) Rajkumar, S. V.; Dimopoulos, M. A.; Palumbo, A.; Blade, J.; Merlini, G.; Mateos, M.-V.; Kumar, S.; Hillengass, J.; Kastritis, E.; Richardson, P.; Landgren, O.; Paiva, B.; Dispenzieri, A.; Weiss, B.; LeLeu, X.; Zweegman, S.; Lonial, S.; Rosinol, L.; Zamagni, E.; Jagannath, S.; Sezer, O.; Kristinsson, S. Y.; Caers, J.; Usmani, S. Z.; Lahuerta, J. J.; Johnsen, H. E.; Beksac, M.; Cavo, M.; Goldschmidt, H.; Terpos, E.; Kyle, R. A.; Anderson, K. C.; Durie, B. G. M.; Miguel, J. F. S. International Myeloma Working Group Updated Criteria for the Diagnosis of Multiple Myeloma. *The Lancet Oncology* **2014**, *15* (12), e538–e548. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70442-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70442-5).
- (9) Campo, E.; Swerdlow, S. H.; Harris, N. L.; Pileri, S.; Stein, H.; Jaffe, E. S. The 2008 WHO Classification of Lymphoid Neoplasms and beyond: Evolving Concepts and Practical Applications. *Blood* **2011**, *117* (19), 5019–5032. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-293050>.
- (10) The International Myeloma Working Group. Criteria for the Classification of Monoclonal Gammopathies, Multiple Myeloma and Related Disorders: A Report of the

- International Myeloma Working Group. *British Journal of Haematology* **2003**, *121* (5), 749–757. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2003.04355.x>.
- (11) Palumbo, A.; Avet-Loiseau, H.; Oliva, S.; Lokhorst, H. M.; Goldschmidt, H.; Rosinol, L.; Richardson, P.; Caltagirone, S.; Lahuerta, J. J.; Facon, T.; Bringhen, S.; Gay, F.; Attal, M.; Passera, R.; Spencer, A.; Offidani, M.; Kumar, S.; Musto, P.; Lonial, S.; Petrucci, M. T.; Orłowski, R. Z.; Zamagni, E.; Morgan, G.; Dimopoulos, M. A.; Durie, B. G. M.; Anderson, K. C.; Sonneveld, P.; San Miguel, J.; Cavo, M.; Rajkumar, S. V.; Moreau, P. Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *JCO* **2015**, *33* (26), 2863–2869. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.61.2267>.
- (12) Chretien, M.-L.; Corre, J.; Lauwers-Cances, V.; Magrangeas, F.; Cleyne, A.; Yon, E.; Hulin, C.; Leleu, X.; Orsini-Piocelle, F.; Blade, J.-S.; Sohn, C.; Karlin, L.; Delbrel, X.; Hebraud, B.; Roussel, M.; Marit, G.; Garderet, L.; Mohty, M.; Rodon, P.; Voillat, L.; Royer, B.; Jaccard, A.; Belhadj, K.; Fontan, J.; Caillot, D.; Stoppa, A.-M.; Attal, M.; Facon, T.; Moreau, P.; Minvielle, S.; Avet-Loiseau, H. Understanding the Role of Hyperdiploidy in Myeloma Prognosis: Which Trisomies Really Matter? *Blood* **2015**, *126* (25), 2713–2719. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-06-650242>.
- (13) Hebraud, B.; Leleu, X.; Lauwers-Cances, V.; Roussel, M.; Caillot, D.; Marit, G.; Karlin, L.; Hulin, C.; Gentil, C.; Guilhot, F.; Garderet, L.; Lamy, T.; Brechignac, S.; Pegourie, B.; Jaubert, J.; Dib, M.; Stoppa, A.-M.; Sebban, C.; Fohrer, C.; Fontan, J.; Fruchart, C.; Macro, M.; Orsini-Piocelle, F.; Lepeu, G.; Sohn, C.; Corre, J.; Facon, T.; Moreau, P.; Attal, M.; Avet-Loiseau, H. Deletion of the 1p32 Region Is a Major Independent Prognostic Factor in Young Patients with Myeloma: The IFM Experience on 1195 Patients. *Leukemia* **2014**, *28* (3), 675–679. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.225>.
- (14) Avet-Loiseau, H.; Attal, M.; Campion, L.; Caillot, D.; Hulin, C.; Marit, G.; Stoppa, A.-M.; Voillat, L.; Wetterwald, M.; Pegourie, B.; Voog, E.; Tiab, M.; Banos, A.; Jaubert, J.; Bouscary, D.; Macro, M.; Kolb, B.; Traulle, C.; Mathiot, C.; Magrangeas, F.; Minvielle, S.; Facon, T.; Moreau, P. Long-Term Analysis of the IFM 99 Trials for Myeloma: Cytogenetic Abnormalities [t(4;14), Del(17p), 1q Gains] Play a Major Role in Defining Long-Term Survival. *JCO* **2012**, *30* (16), 1949–1952. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.36.5726>.
- (15) Rajkumar, S. V.; Dimopoulos, M. A.; Palumbo, A.; Blade, J.; Merlini, G.; Mateos, M.-V.; Kumar, S.; Hillengass, J.; Kastiris, E.; Richardson, P.; Landgren, O.; Paiva, B.; Dispenzieri, A.; Weiss, B.; Leleu, X.; Zweegman, S.; Lonial, S.; Rosinol, L.; Zamagni, E.; Jagannath, S.; Sezer, O.; Kristinsson, S. Y.; Caers, J.; Usmani, S. Z.; Lahuerta, J. J.; Johnsen, H. E.; Beksac, M.; Cavo, M.; Goldschmidt, H.; Terpos, E.; Kyle, R. A.; Anderson, K. C.; Durie, B. G. M.; Miguel, J. F. S. International Myeloma Working Group Updated Criteria for the Diagnosis of Multiple Myeloma. *The Lancet Oncology* **2014**, *15* (12), e538–e548. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70442-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70442-5).
- (16) Kyle, R. A.; Therneau, T. M.; Rajkumar, S. V.; Offord, J. R.; Larson, D. R.; Plevak, M. F.; Melton, L. J. A Long-Term Study of Prognosis in Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *The New England Journal of Medicine* **2002**, *346* (8), 564–569. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa01133202>.

- (17) Landgren, O.; Weiss, B. M. Patterns of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance and Multiple Myeloma in Various Ethnic/Racial Groups: Support for Genetic Factors in Pathogenesis. *Leukemia* **2009**, *23* (10), 1691–1697. <https://doi.org/10.1038/leu.2009.134>.
- (18) Weiss, B. M.; Abadie, J.; Verma, P.; Howard, R. S.; Kuehl, W. M. A Monoclonal Gammopathy Precedes Multiple Myeloma in Most Patients. *Blood* **2009**, *113* (22), 5418–5422. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-195008>.
- (19) Landgren, O.; Graubard, B. I.; Katzmann, J. A.; Kyle, R. A.; Ahmadizadeh, I.; Clark, R.; Kumar, S. K.; Dispenzieri, A.; Greenberg, A. J.; Therneau, T. M.; Melton, L. J.; Caporaso, N.; Korde, N.; Roschewski, M.; Costello, R.; McQuillan, G. M.; Rajkumar, S. V. Racial Disparities in the Prevalence of Monoclonal Gammopathies: A Population-Based Study of 12 482 Persons from the National Health and Nutritional Examination Survey. *Leukemia* **2014**, *28* (7), 1537–1542. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.34>.
- (20) Smith, A.; Wisloff, F.; Samson, D.; the UK Myeloma Forum, Nordic Myeloma Study Group and British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on the Diagnosis and Management of Multiple Myeloma 2005. *British Journal of Haematology* **2006**, *132* (4), 410–451. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05867.x>.
- (21) Kyle, R. A.; Rajkumar, S. V. Criteria for Diagnosis, Staging, Risk Stratification and Response Assessment of Multiple Myeloma. *Leukemia* **2009**, *23* (1), 3–9. <https://doi.org/10.1038/leu.2008.291>.
- (22) Dispenzieri, A.; Katzmann, J. A.; Kyle, R. A.; Larson, D. R.; Melton, L. J.; Colby, C. L.; Therneau, T. M.; Clark, R.; Kumar, S. K.; Bradwell, A.; Fonseca, R.; Jelinek, D.; Rajkumar, S. V. Prevalence and Risk of Progression of Light-Chain Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance: A Retrospective Population-Based Cohort Study. *The Lancet* **2010**, *375* (9727), 1721–1728. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60482-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60482-5).
- (23) Jelinek, T.; Kryukov, F.; Rihova, L.; Hajek, R. Plasma Cell Leukemia: From Biology to Treatment. *European Journal of Haematology* **2015**, *95* (1), 16–26. <https://doi.org/10.1111/ejh.12533>.
- (24) Mina, R.; D’Agostino, M.; Cerrato, C.; Gay, F.; Palumbo, A. Plasma Cell Leukemia: Update on Biology and Therapy. *Leukemia & Lymphoma* **2017**, *58* (7), 1538–1547. <https://doi.org/10.1080/10428194.2016.1250263>.
- (25) Dispenzieri, A. POEMS Syndrome: 2017 Update on Diagnosis, Risk Stratification, and Management: DISPENZIERI. *American Journal of Hematology* **2017**, *92* (8), 814–829. <https://doi.org/10.1002/ajh.24802>.
- (26) Paiva, B.; Chandia, M.; Vidriales, M.-B.; Colado, E.; Caballero-Velazquez, T.; Escalante, F.; Garcia de Coca, A.; Montes, M.-C.; Garcia-Sanz, R.; Ocio, E. M.; Mateos, M.-V.; San Miguel, J. F. Multiparameter Flow Cytometry for Staging of Solitary Bone Plasmacytoma: New Criteria for Risk of Progression to Myeloma. *Blood* **2014**, *124* (8), 1300–1303. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-04-567909>.
- (27) Sant, M.; Minicozzi, P.; Mounier, M.; Anderson, L. A.; Brenner, H.; Holleccek, B.; Marcos-Gragera, R.; Maynadié, M.; Monnereau, A.; Osca-Gelis, G.; Visser, O.; De

- Angelis, R. Survival for Haematological Malignancies in Europe between 1997 and 2008 by Region and Age: Results of EURO CARE-5, a Population-Based Study. *The Lancet Oncology* **2014**, *15* (9), 931–942. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70282-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70282-7).
- (28) Kyle, R. A.; Rajkumar, S. V.; Landgren, O.; Blade, J.; Merlini, G.; Kröger, N.; Einsele, H.; Vesole, D. H.; Dimopoulos, M.; San Miguel, J.; Avet-Loiseau, H.; Hajek, R.; Chen, W. M.; Anderson, K. C.; Ludwig, H.; Sonneveld, P.; Pavlovsky, S.; Palumbo, A.; Richardson, P. G.; Barlogie, B.; Greipp, P.; Vescio, R.; Turesson, I.; Westin, J.; Boccadoro, M. Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance (MGUS) and Smoldering (Asymptomatic) Multiple Myeloma: IMWG Consensus Perspectives Risk Factors for Progression and Guidelines for Monitoring and Management. *Leukemia* **2010**, *24* (6), 1121–1127. <https://doi.org/10.1038/leu.2010.60>.
- (29) Wood, A. J. J.; Alexanian, R.; Dimopoulos, M. The Treatment of Multiple Myeloma. *The New England Journal of Medicine* **1994**, *330* (7), 484–489. <https://doi.org/10.1056/NEJM199402173300709>.
- (30) HAS. Commission de La Transparence, LEVACT. June 29, 2016.
- (31) Pönisch, W.; Mitrou, P. S.; Merkle, K.; Herold, M.; Assmann, M.; Wilhelm, G.; Dachsel, K.; Richter, P.; Schirmer, V.; Schulze, A.; Šubert, R.; Harksel, B.; Grobe, N.; Stelzer, E.; Schulze, M.; Bittrich, A.; Freund, M.; Pasold, R.; Friedrich, Th.; Helbig, W.; Niederwieser, D. Treatment of Bendamustine and Prednisone in Patients with Newly Diagnosed Multiple Myeloma Results in Superior Complete Response Rate, Prolonged Time to Treatment Failure and Improved Quality of Life Compared to Treatment with Melphalan and Prednisone—a Randomized Phase III Study of the East German Study Group of Hematology and Oncology (OSHO). *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* **2006**, *132* (4), 205–212. <https://doi.org/10.1007/s00432-005-0074-4>.
- (32) Alexanian, R.; Dimopoulos, M. A.; Delasalle, K.; Barlogie, B. Primary Dexamethasone Treatment of Multiple Myeloma. *Blood* **1992**, *5*.
- (33) Attal, M.; Harousseau, J.-L.; Stoppa, A.-M.; Sotto, J.-J.; Fuzibet, J.-G.; Rossi, J.-F.; Casassus, P.; Maisonneuve, H.; Facon, T.; Ifrah, N.; Payen, C.; Bataille, R. A Prospective, Randomized Trial of Autologous Bone Marrow Transplantation and Chemotherapy in Multiple Myeloma. *The New England Journal of Medicine* **1996**, *335* (2), 91–97. <https://doi.org/10.1056/NEJM199607113350204>.
- (34) Kotla, V.; Goel, S.; Nischal, S.; Heuck, C.; Vivek, K.; Das, B.; Verma, A. Mechanism of Action of Lenalidomide in Hematological Malignancies. *J Hematol Oncol* **2009**, *2* (1), 36. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-2-36>.
- (35) Köhler, G.; Milstein, C. Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity. *Nature* **1975**, *256* (5517), 495–497. <https://doi.org/10.1038/256495a0>.
- (36) HAS. Commission de La Transparence, DARZALEX,. April 17, 2019.
- (37) Palumbo, A.; Chanan-Khan, A.; Weisel, K.; Nooka, A. K.; Masszi, T.; Beksac, M.; Spicka, I.; Hungria, V.; Munder, M.; Mateos, M. V.; Mark, T. M.; Qi, M.; Schecter, J.; Amin, H.; Qin, X.; Deraedt, W.; Ahmadi, T.; Spencer, A.; Sonneveld, P. Daratumumab, Bortezomib, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *The New England Journal of Medicine* **2016**, *375* (8), 754–766. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1606038>.

- (38) Dimopoulos, M. A.; Oriol, A.; Nahi, H.; San-Miguel, J.; Bahlis, N. J.; Usmani, S. Z.; Rabin, N.; Orłowski, R. Z.; Komarnicki, M.; Suzuki, K.; Plesner, T.; Yoon, S.-S.; Ben Yehuda, D.; Richardson, P. G.; Goldschmidt, H.; Reece, D.; Lisby, S.; Khokhar, N. Z.; O'Rourke, L.; Chiu, C.; Qin, X.; Guckert, M.; Ahmadi, T.; Moreau, P. Daratumumab, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *The New England Journal of Medicine* **2016**, *375* (14), 1319–1331. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1607751>.
- (39) Richardson, P. G.; Attal, M.; Campana, F.; Le-Guenec, S.; Hui, A.-M.; Risse, M.-L.; Corzo, K.; Anderson, K. C. Isatuximab plus Pomalidomide/Dexamethasone versus Pomalidomide/Dexamethasone in Relapsed/Refractory Multiple Myeloma: ICARIA Phase III Study Design. *Future Oncology* **2018**, *14* (11), 1035–1047. <https://doi.org/10.2217/fon-2017-0616>.
- (40) Jakubowiak, A.; Offidani, M.; Pegourie, B.; De La Rubia, J.; Garderet, L.; Laribi, K.; Bosi, A.; Marasca, R.; Laubach, J.; Mohrbacher, A.; Carella, A. M.; Singhal, A. K.; Tsao, L. C.; Lynch, M.; Bleickardt, E.; Jou, Y.-M.; Robbins, M.; Palumbo, A. Randomized Phase 2 Study: Elotuzumab plus Bortezomib/Dexamethasone vs Bortezomib/Dexamethasone for Relapsed/Refractory MM. *Blood* **2016**, *127* (23), 2833–2840. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-694604>.
- (41) Sadelain, M.; Brentjens, R.; Rivière, I. The Basic Principles of Chimeric Antigen Receptor Design. *Cancer Discovery* **2013**, *3* (4), 388–398. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0548>.
- (42) Kochenderfer, J. N.; Rosenberg, S. A. Treating B-Cell Cancer with T Cells Expressing Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptors. *Nat Rev Clin Oncol* **2013**, *10* (5), 267–276. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2013.46>.
- (43) Cohen, A. D.; Garfall, A. L.; Stadtmauer, E. A.; Melenhorst, J. J.; Lacey, S. F.; Lancaster, E.; Vogl, D. T.; Weiss, B. M.; Dengel, K.; Nelson, A.; Plesa, G.; Chen, F.; Davis, M. M.; Hwang, W.-T.; Young, R. M.; Brogdon, J. L.; Isaacs, R.; Pruteanu-Malinici, I.; Siegel, D. L.; Levine, B. L.; June, C. H.; Milone, M. C. B Cell Maturation Antigen-Specific CAR T Cells Are Clinically Active in Multiple Myeloma. *Journal of Clinical Investigation* **2019**, *129* (6), 2210–2221. <https://doi.org/10.1172/JCI126397>.
- (44) Leleu, X.; Micol, J. B.; Guieze, R.; Berthon, C.; Kuhnovsky, F.; Terriou, L.; Moreau, A. S.; Yakoub-Agha, I.; Bauters, F.; Facon, T. Thalidomide : mécanismes d'action et indications en hématologie. *La Revue de Médecine Interne* **2005**, *26* (2), 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2004.06.017>.
- (45) Fouquet, G.; Macro, M.; Decaux, O.; Fohrer, C.; Guidez, S.; Demarquette, H.; Le Grand, C.; Prodhomme, C.; Renaud, L.; Bories, C.; Herbaux, C.; Karlin, L.; Roussel, M.; Benboubker, L.; Hulin, C.; Arnulf, B.; Leleu, X. [Pomalidomide for multiple myeloma]. *Rev Med Interne* **2015**, *36* (9), 613–618. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2015.04.007>.
- (46) Ma, M. H.; Yang, H. H.; Parker, K.; Manyak, S.; Friedman, J. M.; Altamirano, C.; Wu, Z.; Borad, M. J.; Frantzen, M.; Roussos, E.; Neeser, J.; Mikail, A.; Adams, J.; Sjak-Shie, N.; Vescio, R. A.; Berenson, J. R. The Proteasome Inhibitor PS-341 Markedly Enhances Sensitivity of Multiple Myeloma Tumor Cells to Chemotherapeutic Agents. *Clinical Cancer Research* **2003**, *10*.

- (47) Richardson, P. G.; Irwin, D.; Harousseau, J.-L.; Goldschmidt, H.; Bladé, J.; Dalton, W. S.; Porter, J. B. Bortezomib or High-Dose Dexamethasone for Relapsed Multiple Myeloma. *The New England Journal of Medicine* **2005**, *12*.
- (48) Orlowski, R. Z.; Zeger, E. L. Targeting the Proteasome as a Therapeutic Strategy against Haematological Malignancies. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **2006**, *15* (2), 117–130. <https://doi.org/10.1517/13543784.15.2.117>.
- (49) HAS. Commission de La Transparence, KYPROLIS. fevrier 2018.
- (50) Stewart, A. K.; Rajkumar, S. V.; Dimopoulos, M. A.; Masszi, T.; Špička, I.; Oriol, A.; Hájek, R.; Rosiñol, L.; Siegel, D. S.; Mihaylov, G. G.; Goranova-Marinova, V.; Rajnics, P.; Suvorov, A.; Niesvizky, R.; Jakubowiak, A. J.; San-Miguel, J. F.; Ludwig, H.; Wang, M.; Maisnar, V.; Minarik, J.; Bensinger, W. I.; Mateos, M.-V.; Ben-Yehuda, D.; Kukreti, V.; Zojwalla, N.; Tonda, M. E.; Yang, X.; Xing, B.; Moreau, P.; Palumbo, A. Carfilzomib, Lenalidomide, and Dexamethasone for Relapsed Multiple Myeloma. *The New England Journal of Medicine* **2015**, *372* (2), 142–152. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1411321>.
- (51) HAS. Commission de La Transparence, NINLARO,. July 5, 2017.
- (52) Moreau, P.; Masszi, T.; Grzasko, N.; Bahlis, N. J.; Hansson, M.; Pour, L.; Sandhu, I.; Ganly, P.; Baker, B. W.; Jackson, S. R.; Stoppa, A.-M.; Simpson, D. R.; Gimsing, P.; Palumbo, A.; Garderet, L.; Cavo, M.; Kumar, S.; Touzeau, C.; Buadi, F. K.; Laubach, J. P.; Berg, D. T.; Lin, J.; Di Bacco, A.; Hui, A.-M.; van de Velde, H.; Richardson, P. G. Oral Ixazomib, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *The New England Journal of Medicine* **2016**, *374* (17), 1621–1634. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1516282>.
- (53) Richon, V. M. Cancer Biology: Mechanism of Antitumour Action of Vorinostat (Suberoylanilide Hydroxamic Acid), a Novel Histone Deacetylase Inhibitor. *British Journal of Cancer* **2006**, *95* (S1), S2–S6. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603463>.
- (54) Dimopoulos, M.; Siegel, D. S.; Lonial, S.; Qi, J.; Hajek, R.; Facon, T.; Rosinol, L.; Williams, C.; Blacklock, H.; Goldschmidt, H.; Hungria, V.; Spencer, A.; Palumbo, A.; Graef, T.; Eid, J. E.; Hou, J.; Sun, L.; Vuocolo, S.; Anderson, K. C. Vorinostat or Placebo in Combination with Bortezomib in Patients with Multiple Myeloma (VANTAGE 088): A Multicentre, Randomised, Double-Blind Study. *The Lancet Oncology* **2013**, *14* (11), 1129–1140. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70398-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70398-X).
- (55) HAS. Commission de La Transparence, FARYDAK,. April 13, 2016.
- (56) San-Miguel, J. F.; Hungria, V. T. M.; Yoon, S.-S.; Beksac, M.; Dimopoulos, M. A.; Elghandour, A.; Jedrzejczak, W. W.; Günther, A.; Nakorn, T. N.; Siritanaratkul, N.; Corradini, P.; Chuncharunee, S.; Lee, J.-J.; Schlossman, R. L.; Shelekhova, T.; Yong, K.; Tan, D.; Numbenjapon, T.; Cavenagh, J. D.; Hou, J.; LeBlanc, R.; Nahi, H.; Qiu, L.; Salwender, H.; Pulini, S.; Moreau, P.; Warzocha, K.; White, D.; Bladé, J.; Chen, W.; de la Rubia, J.; Gimsing, P.; Lonial, S.; Kaufman, J. L.; Ocio, E. M.; Veskovski, L.; Sohn, S. K.; Wang, M.-C.; Lee, J. H.; Einsele, H.; Sopala, M.; Corrado, C.; Bengoudifa, B.-R.; Binlich, F.; Richardson, P. G. Panobinostat plus Bortezomib and Dexamethasone versus Placebo plus Bortezomib and Dexamethasone in Patients with Relapsed or Relapsed and Refractory Multiple Myeloma: A Multicentre, Randomised, Double-Blind Phase 3

- Trial. *The Lancet Oncology* **2014**, *15* (11), 1195–1206. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70440-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70440-1).
- (57) Richardson, P. G.; Schlossman, R. L.; Alsina, M.; Weber, D. M.; Coutre, S. E.; Gasparetto, C.; Mukhopadhyay, S.; Ondovik, M. S.; Khan, M.; Paley, C. S.; Lonial, S. PANORAMA 2: Panobinostat in Combination with Bortezomib and Dexamethasone in Patients with Relapsed and Bortezomib-Refractory Myeloma. *Blood* **2013**, *122* (14), 2331–2337. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-01-481325>.
- (58) Ghobrial, I. M.; Weller, E.; Vij, R.; Munshi, N. C.; Banwait, R.; Bagshaw, M.; Schlossman, R.; Leduc, R.; Chuma, S.; Kunsman, J.; Laubach, J.; Jakubowiak, A. J.; Maiso, P.; Roccaro, A.; Armand, P.; Dollard, A.; Warren, D.; Harris, B.; Poon, T.; Sam, A.; Rodig, S.; Anderson, K. C.; Richardson, P. G. Weekly Bortezomib in Combination with Temsirolimus in Relapsed or Relapsed and Refractory Multiple Myeloma: A Multicentre, Phase 1/2, Open-Label, Dose-Escalation Study. *The Lancet Oncology* **2011**, *12* (3), 263–272. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70028-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70028-6).
- (59) Morgan, G. J.; Davies, F. E.; Gregory, W. M.; Cocks, K.; Bell, S. E.; Szubert, A. J.; Navarro-Coy, N.; Drayson, M. T.; Owen, R. G.; Feyler, S.; Ashcroft, A. J.; Ross, F.; Byrne, J.; Roddie, H.; Rudin, C.; Cook, G.; Jackson, G. H.; Child, J. A. First-Line Treatment with Zoledronic Acid as Compared with Clodronic Acid in Multiple Myeloma (MRC Myeloma IX): A Randomised Controlled Trial. *The Lancet* **2010**, *376* (9757), 1989–1999. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)62051-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62051-X).
- (60) Henry, D. H.; Costa, L.; Goldwasser, F.; Hirsh, V.; Hungria, V.; Prausova, J.; Scagliotti, G. V.; Sleeboom, H.; Spencer, A.; Vadhan-Raj, S.; von Moos, R.; Willenbacher, W.; Woll, P. J.; Wang, J.; Jiang, Q.; Jun, S.; Dansey, R.; Yeh, H. Randomized, Double-Blind Study of Denosumab Versus Zoledronic Acid in the Treatment of Bone Metastases in Patients With Advanced Cancer (Excluding Breast and Prostate Cancer) or Multiple Myeloma. *JCO* **2011**, *29* (9), 1125–1132. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.31.3304>.
- (61) ONCOMIP. Référentiel de traitement du Myélome Multiple [https://www.onco-occitanie.fr/pro/referentiels-recommandations?field_specialites_target_id\[\]=26&title=myélome](https://www.onco-occitanie.fr/pro/referentiels-recommandations?field_specialites_target_id[]=26&title=myélome).
- (62) Mateos, M.-V.; Hernandez, J. M.; Hernandez, M. T.; Gutierrez, N. C.; Palomera, L.; Fuertes, M.; Garcia-Sanchez, P.; Lahuerta, J. J.; de la Rubia, J.; Terol, M.-J.; Sureda, A.; Bargay, J.; Ribas, P.; Alegre, A.; de Arriba, F.; Oriol, A.; Carrera, D.; Garcia-Larana, J.; Garcia-Sanz, R.; Blade, J.; Prosper, F.; Mateo, G.; Esseltine, D.-L.; van de Velde, H.; San Miguel, J. F. Bortezomib plus Melphalan and Prednisone in Elderly Untreated Patients with Multiple Myeloma: Updated Time-to-Events Results and Prognostic Factors for Time to Progression. *Haematologica* **2008**, *93* (4), 560–565. <https://doi.org/10.3324/haematol.12106>.
- (63) Durie, B.; Harousseau, J.-L.; Miguel, J. S.; Bladé, J.; Barlogie, B.; Anderson, K.; Gertz, M.; Dimopoulos, M.; Westin, J.; Sonneveld, P.; Ludwig, H.; Gahrton, G.; Beksac, M.; Crowley, J.; Belch, A.; Boccadaro, M.; Turesson, I.; Joshua, D.; Vesole, D.; Kyle, R.; Alexanian, R.; Tricot, G.; Attal, M.; Merlini, G.; Powles, R.; Richardson, P.; Shimizu, K.; Tosi, P.; Morgan, G.; Rajkumar, S. V. International Uniform Response Criteria for Multiple Myeloma. *Leukemia* **2006**, *20* (9), 1467–1473. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404284>.

- (64) Kumar, S.; Paiva, B.; Anderson, K. C.; Durie, B.; Landgren, O.; Moreau, P.; Munshi, N.; Lonial, S.; Bladé, J.; Mateos, M.-V.; Dimopoulos, M.; Kastritis, E.; Boccadoro, M.; Orłowski, R.; Goldschmidt, H.; Spencer, A.; Hou, J.; Chng, W. J.; Usmani, S. Z.; Zamagni, E.; Shimizu, K.; Jagannath, S.; Johnsen, H. E.; Terpos, E.; Reiman, A.; Kyle, R. A.; Sonneveld, P.; Richardson, P. G.; McCarthy, P.; Ludwig, H.; Chen, W.; Cavo, M.; Harousseau, J.-L.; Lentzsch, S.; Hillengass, J.; Palumbo, A.; Orfao, A.; Rajkumar, S. V.; Miguel, J. S.; Avet-Loiseau, H. International Myeloma Working Group Consensus Criteria for Response and Minimal Residual Disease Assessment in Multiple Myeloma. *The Lancet Oncology* **2016**, *17* (8), e328–e346. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30206-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30206-6).
- (65) Paiva, B.; Vidriales, M.-B.; Cerveró, J.; Mateo, G.; Pérez, J. J.; Montalbán, M. A.; Sureda, A.; Montejano, L.; Gutiérrez, N. C.; de Coca, A. G.; de las Heras, N.; Mateos, M. V.; López-Berges, M. C.; García-Boyeró, R.; Galende, J.; Hernández, J.; Palomera, L.; Carrera, D.; Martínez, R.; de la Rubia, J.; Martín, A.; Bladé, J.; Lahuerta, J. J.; Orfao, A.; San Miguel, J. F. Multiparameter Flow Cytometric Remission Is the Most Relevant Prognostic Factor for Multiple Myeloma Patients Who Undergo Autologous Stem Cell Transplantation. *Blood* **2008**, *112* (10), 4017–4023. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-05-159624>.
- (66) Perrot, A.; Lauwers-Cances, V.; Corre, J.; Robillard, N.; Hulin, C.; Chretien, M.-L.; Dejoie, T.; Maheo, S.; Stoppa, A.-M.; Pegourie, B.; Karlin, L.; Garderet, L.; Arnulf, B.; Doyen, C.; Meuleman, N.; Royer, B.; Eveillard, J.-R.; Benboubker, L.; Dib, M.; Decaux, O.; Jaccard, A.; Belhadj, K.; Brechignac, S.; Kolb, B.; Fohrer, C.; Mohty, M.; Macro, M.; Richardson, P. G.; Carlton, V.; Moorhead, M.; Willis, T.; Faham, M.; Anderson, K. C.; Harousseau, J.-L.; Leleu, X.; Facon, T.; Moreau, P.; Attal, M.; Avet-Loiseau, H.; Munshi, N. Minimal Residual Disease Negativity Using Deep Sequencing Is a Major Prognostic Factor in Multiple Myeloma. *Blood* **2018**, *132* (23), 2456–2464. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-06-858613>.
- (67) Yin, T. The Stem Cell Niches in Bone. *Journal of Clinical Investigation* **2006**, *116* (5), 1195–1201. <https://doi.org/10.1172/JCI28568>.
- (68) Kumar, S. K.; Rajkumar, V.; Kyle, R. A.; van Duin, M.; Sonneveld, P.; Mateos, M.-V.; Gay, F.; Anderson, K. C. Multiple Myeloma. *Nat Rev Dis Primers* **2017**, *3* (1), 17046. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.46>.
- (69) Guillerey, C.; Nakamura, K.; Vuckovic, S.; Hill, G. R.; Smyth, M. J. Immune Responses in Multiple Myeloma: Role of the Natural Immune Surveillance and Potential of Immunotherapies. *Cell. Mol. Life Sci.* **2016**, *73* (8), 1569–1589. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2135-z>.
- (70) Zheng, Y.; Cai, Z.; Wang, S.; Zhang, X.; Qian, J.; Hong, S.; Li, H.; Wang, M.; Yang, J.; Yi, Q. Macrophages Are an Abundant Component of Myeloma Microenvironment and Protect Myeloma Cells from Chemotherapy Drug-Induced Apoptosis. *Blood* **2009**, *114* (17), 3625–3628. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-05-220285>.
- (71) Nakamura, K.; Kassem, S.; Cleynen, A.; Chrétien, M.-L.; Guillerey, C.; Putz, E. M.; Bald, T.; Förster, I.; Vuckovic, S.; Hill, G. R.; Masters, S. L.; Chesi, M.; Bergsagel, P. L.; Avet-Loiseau, H.; Martinet, L.; Smyth, M. J. Dysregulated IL-18 Is a Key Driver of Immunosuppression and a Possible Therapeutic Target in the Multiple Myeloma

- Microenvironment. *Cancer Cell* **2018**, 33 (4), 634-648.e5. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.02.007>.
- (72) Banchereau, J.; Steinman, R. M. Dendritic Cells and the Control of Immunity. *Nature* **1998**, 392 (6673), 245–252. <https://doi.org/10.1038/32588>.
- (73) Brimnes, M. K.; Svane, I. M.; Johnsen, H. E. Impaired Functionality and Phenotypic Profile of Dendritic Cells from Patients with Multiple Myeloma. *Clin Exp Immunol* **2006**, 144 (1), 76–84. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03037.x>.
- (74) Leone, P.; Berardi, S.; Frassanito, M. A.; Ria, R.; De Re, V.; Cicco, S.; Battaglia, S.; Ditunno, P.; Dammacco, F.; Vacca, A.; Racanelli, V. Dendritic Cells Accumulate in the Bone Marrow of Myeloma Patients Where They Protect Tumor Plasma Cells from CD8+ T-Cell Killing. *Blood* **2015**, 126 (12), 1443–1451. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-01-623975>.
- (75) Dhodapkar, M. V.; Krasovsky, J.; Olson, K. T Cells from the Tumor Microenvironment of Patients with Progressive Myeloma Can Generate Strong, Tumor-Specific Cytolytic Responses to Autologous, Tumor-Loaded Dendritic Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, 99 (20), 13009–13013. <https://doi.org/10.1073/pnas.202491499>.
- (76) Guillerey, C.; Ferrari de Andrade, L.; Vuckovic, S.; Miles, K.; Ngiow, S. F.; Yong, M. C. R.; Teng, M. W. L.; Colonna, M.; Ritchie, D. S.; Chesi, M.; Bergsagel, P. L.; Hill, G. R.; Smyth, M. J.; Martinet, L. Immunosurveillance and Therapy of Multiple Myeloma Are CD226 Dependent. *J. Clin. Invest.* **2015**, 125 (5), 2077–2089. <https://doi.org/10.1172/JCI77181>.
- (77) Armand, P. Immune Checkpoint Blockade in Hematologic Malignancies. *Blood* **2015**, 125 (22), 8.
- (78) Gormley, N. J.; Pazdur, R. Immunotherapy Combinations in Multiple Myeloma — Known Unknowns. *N Engl J Med* **2018**, 379 (19), 1791–1795. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1803602>.
- (79) Mosmann, T. R.; Cherwinski, H.; Bond, M. W.; Giedlin, M. A.; Coffman, L. Two Types of Murine Helper T Cell Clone. I. Definition According to Profiles of Lymphokine Activities and Secreted Proteins. *The Journal of Immunology* **11**.
- (80) Bettelli, E.; Oukka, M.; Kuchroo, V. K. TH-17 Cells in the Circle of Immunity and Autoimmunity. *Nat Immunol* **2007**, 8 (4), 345–350. <https://doi.org/10.1038/ni0407-345>.
- (81) Sakaguchi, S.; Ono, M.; Setoguchi, R.; Yagi, H.; Hori, S.; Fehervari, Z.; Shimizu, J.; Takahashi, T.; Nomura, T. Foxp3+CD25+CD4+ Natural Regulatory T Cells in Dominant Self-Tolerance and Autoimmune Disease. *Immunol Rev* **2006**, 212 (1), 8–27. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2006.00427.x>.
- (82) Sharma, A.; Khan, R.; Joshi, S.; Kumar, L.; Sharma, M. Dysregulation in T Helper 1/T Helper 2 Cytokine Ratios in Patients with Multiple Myeloma. *Leukemia & Lymphoma* **2010**, 51 (5), 920–927. <https://doi.org/10.3109/10428191003699563>.

- (83) Feng, P.; Yan, R.; Dai, X.; Xie, X.; Wen, H.; Yang, S. The Alteration and Clinical Significance of Th1/Th2/Th17/Treg Cells in Patients with Multiple Myeloma. *Inflammation* **2015**, *38* (2), 705–709. <https://doi.org/10.1007/s10753-014-9980-4>.
- (84) Prabhala, R. H.; Pelluru, D.; Fulciniti, M.; Prabhala, H. K.; Nanjappa, P.; Song, W.; Pai, C.; Amin, S.; Tai, Y.-T.; Richardson, P. G.; Ghobrial, I. M.; Treon, S. P.; Daley, J. F.; Anderson, K. C.; Kutok, J. L.; Munshi, N. C. Elevated IL-17 Produced by Th17 Cells Promotes Myeloma Cell Growth and Inhibits Immune Function in Multiple Myeloma. *Blood* **2010**, *115* (26), 5385–5392. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-10-246660>.
- (85) Lacey, D. L.; Timms, E.; Tan, H.-L.; Kelley, M. J.; Dunstan, C. R.; Burgess, T.; Elliott, R.; Colombero, A.; Elliott, G.; Scully, S.; Hsu, H.; Sullivan, J.; Hawkins, N.; Davy, E.; Capparelli, C.; Eli, A.; Qian, Y.-X.; Kaufman, S.; Sarosi, I.; Shalhoub, V.; Senaldi, G.; Guo, J.; Delaney, J.; Boyle, W. J. Osteoprotegerin Ligand Is a Cytokine That Regulates Osteoclast Differentiation and Activation. *Cell* **1998**, *93* (2), 165–176. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81569-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81569-X).
- (86) Yasuda, H.; Shima, N.; Nakagawa, N.; Yamaguchi, K.; Kinosaki, M.; Mochizuki, S. -i.; Tomoyasu, A.; Yano, K.; Goto, M.; Murakami, A.; Tsuda, E.; Morinaga, T.; Higashio, K.; Udagawa, N.; Takahashi, N.; Suda, T. Osteoclast Differentiation Factor Is a Ligand for Osteoprotegerin/Osteoclastogenesis-Inhibitory Factor and Is Identical to TRANCE/RANKL. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1998**, *95* (7), 3597–3602. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.7.3597>.
- (87) Simonet, W. S.; Lacey, D. L.; Dunstan, C. R.; Kelley, M.; Chang, M.-S.; Lüthy, R.; Nguyen, H. Q.; Wooden, S.; Bennett, L.; Boone, T.; Shimamoto, G.; DeRose, M.; Elliott, R.; Colombero, A.; Tan, H.-L.; Trail, G.; Sullivan, J.; Davy, E.; Bucay, N.; Renshaw-Gegg, L.; Hughes, T. M.; Hill, D.; Pattison, W.; Campbell, P.; Sander, S.; Van, G.; Tarpley, J.; Derby, P.; Lee, R.; Boyle, W. J. Osteoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density. *Cell* **1997**, *89* (2), 309–319. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80209-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80209-3).
- (88) Yao, G.-Q.; Sun, B. H.; Weir, E. C.; Insogna, K. L. A Role for Cell-Surface CSF-1 in Osteoblast-Mediated Osteoclastogenesis. *Calcified Tissue International* **2002**, *70* (4), 339–346. <https://doi.org/10.1007/s00223-001-1079-x>.
- (89) Arai, F.; Miyamoto, T.; Ohneda, O.; Inada, T.; Sudo, T.; Brasel, K.; Miyata, T.; Anderson, D. M.; Suda, T. Commitment and Differentiation of Osteoclast Precursor Cells by the Sequential Expression of C-Fms and Receptor Activator of Nuclear Factor Kb (Rank) Receptors. *The Journal of Experimental Medicine* **1999**, *190* (12), 1741–1754. <https://doi.org/10.1084/jem.190.12.1741>.
- (90) Boyle, W. J.; Simonet, W. S.; Lacey, D. L. Osteoclast Differentiation and Activation. *Nature* **2003**, *423* (6937), 337–342. <https://doi.org/10.1038/nature01658>.
- (91) Han, Y.; You, X.; Xing, W.; Zhang, Z.; Zou, W. Paracrine and Endocrine Actions of Bone—the Functions of Secretory Proteins from Osteoblasts, Osteocytes, and Osteoclasts. *Bone Res* **2018**, *6* (1), 16. <https://doi.org/10.1038/s41413-018-0019-6>.
- (92) Vallet, S.; Mukherjee, S.; Vaghela, N.; Hideshima, T.; Fulciniti, M.; Pozzi, S.; Santo, L.; Cirstea, D.; Patel, K.; Sohani, A. R.; Guimaraes, A.; Xie, W.; Chauhan, D.; Schoonmaker, J. A.; Attar, E.; Churchill, M.; Weller, E.; Munshi, N.; Seehra, J. S.; Weissleder, R.; Anderson, K. C.; Scadden, D. T.; Raje, N. Activin A Promotes Multiple Myeloma-Induced

- Osteolysis and Is a Promising Target for Myeloma Bone Disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2010**, *107* (11), 5124–5129. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911929107>.
- (93) Nagasawa, T. CXC Chemokine Ligand 12 (CXCL12) and Its Receptor CXCR4. *Journal of Molecular Medicine* **2014**, *92* (5), 433–439. <https://doi.org/10.1007/s00109-014-1123-8>.
- (94) Zannettino, A. C. W.; Farrugia, A. N.; Kortesis, A.; Manavis, J.; To, L. B.; Martin, S. K.; Diamond, P.; Tamamura, H.; Lapidot, T.; Fujii, N.; Gronthos, S. Elevated Serum Levels of Stromal-Derived Factor-1A Are Associated with Increased Osteoclast Activity and Osteolytic Bone Disease in Multiple Myeloma Patients. *Cancer Research* **2005**, *11*.
- (95) Saeki Mima, Y. T.; Ishii, T.; Ogata, A.; Kobayashi, H.; Ohshima, S.; Ishida, T.; Tabunoki, Y.; Kitayama, H.; Mizuki, M.; Katada, Y.; Asaoku, H.; Kitano, M.; Nishimoto, N.; Yoshizaki, K.; Maeda, M.; Kon, S.; Kinoshita, N.; Uede, T.; Kawase, I. Enhanced Production of Osteopontin in Multiple Myeloma: Clinical and Pathogenic Implications. *British Journal of Haematology* **2003**, *123* (2), 263–270. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2003.04589.x>.
- (96) Lee, J. W.; Chung, H. Y.; Ehrlich, L. A.; Jelinek, D. F.; Callander, N. S.; Roodman, G. D.; Choi, S. J. IL-3 Expression by Myeloma Cells Increases Both Osteoclast Formation and Growth of Myeloma Cells. *Blood* **2004**, *103* (6), 2308–2315. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-06-1992>.
- (97) Lentzsch, S.; Gries, M.; Janz, M.; Bargou, R.; Dörken, B.; Mapara, M. Y. Macrophage Inflammatory Protein 1-Alpha (MIP-1 α) Triggers Migration and Signaling Cascades Mediating Survival and Proliferation in Multiple Myeloma (MM) Cells. *Blood* **2003**, *101* (9), 3568–3573. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-08-2383>.
- (98) Uneda, S.; Hata, H.; Matsuno, F.; Harada, N.; Mitsuya, Y.; Kawano, F.; Mitsuya, H. Macrophage Inflammatory Protein-1 Alpha Is Produced by Human Multiple Myeloma (MM) Cells and Its Expression Correlates with Bone Lesions in Patients with MM. *British Journal of Haematology* **2003**, *120* (1), 53–55. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2003.04040.x>.
- (99) Terpos, E.; Dimopoulos, M.-A. Myeloma Bone Disease: Pathophysiology and Management. *Annals of Oncology* **2005**, *16* (8), 1223–1231. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdi235>.
- (100) Giuliani, N.; Bataille, R.; Mancini, C.; Lazzaretti, M.; Barillé, S. Myeloma Cells Induce Imbalance in the Osteoprotegerin/Osteoprotegerin Ligand System in the Human Bone Marrow Environment. *Blood* **2001**, *98* (13), 3527–3533. <https://doi.org/10.1182/blood.V98.13.3527>.
- (101) Standal, T.; Hjorth-Hansen, H.; Rasmussen, T.; Dahl, I. M. S.; Lenhoff, S.; Brenne, A.-T.; Seidel, C.; Baykov, V.; Waage, A.; Børset, M.; Sundan, A. Osteopontin Is an Adhesive Factor for Myeloma Cells and Is Found in Increased Levels in Plasma from Patients with Multiple Myeloma. *Haematologica* **2004**, *9*.
- (102) Croucher, P. I. Osteoprotegerin Inhibits the Development of Osteolytic Bone Disease in Multiple Myeloma. *Blood* **2001**, *98* (13), 3534–3540. <https://doi.org/10.1182/blood.V98.13.3534>.

- (103) Farrugia, A. N.; Atkins, G. J.; To, L. B.; Pan, B.; Horvath, N.; Kostakis, P.; Findlay, D. M.; Bardy, P.; Zannettino, A. C. W. Receptor Activator of Nuclear Factor-KappaB Ligand Expression by Human Myeloma Cells Mediates Osteoclast Formation in Vitro and Correlates with Bone Destruction in Vivo. *Cancer Res.* **2003**, *63* (17), 5438–5445.
- (104) Terpos, E.; Politou, M.; Szydlo, R.; Goldman, J. M.; Apperley, J. F.; Rahemtulla, A. Serum Levels of Macrophage Inflammatory Protein-1 Alpha (MIP-1a) Correlate with the Extent of Bone Disease and Survival in Patients with Multiple Myeloma. *British Journal of Haematology* **2003**, *4*.
- (105) Terpos, E.; Szydlo, R.; Apperley, J. F.; Hatjiharissi, E.; Politou, M.; Meletis, J.; Viniou, N.; Yataganas, X.; Goldman, J. M.; Rahemtulla, A. Soluble Receptor Activator of Nuclear Factor KB Ligand–Osteoprotegerin Ratio Predicts Survival in Multiple Myeloma: Proposal for a Novel Prognostic Index. *Blood* **2003**, *102* (3), 1064–1069. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-02-0380>.
- (106) Pearce, R. N.; Sordillo, E. M.; Yaccoby, S.; Wong, B. R.; Liau, D. F.; Colman, N.; Michaeli, J.; Epstein, J.; Choi, Y. Multiple Myeloma Disrupts the TRANCE/ Osteoprotegerin Cytokine Axis to Trigger Bone Destruction and Promote Tumor Progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2001**, *98* (20), 11581–11586. <https://doi.org/10.1073/pnas.201394498>.
- (107) Giuliani, N.; Colla, S.; Sala, R.; Moroni, M.; Lazzaretti, M.; La Monica, S.; Bonomini, S.; Hojden, M.; Sammarelli, G.; Barillè, S.; Bataille, R.; Rizzoli, V. Human Myeloma Cells Stimulate the Receptor Activator of Nuclear Factor-KB Ligand (RANKL) in T Lymphocytes: A Potential Role in Multiple Myeloma Bone Disease. *Blood* **2002**, *100* (13), 4615–4621. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-04-1121>.
- (108) Raje, N.; Terpos, E.; Willenbacher, W.; Shimizu, K.; García-Sanz, R.; Durie, B.; Legieć, W.; Krejčí, M.; Laribi, K.; Zhu, L.; Cheng, P.; Warner, D.; Roodman, G. D. Denosumab versus Zoledronic Acid in Bone Disease Treatment of Newly Diagnosed Multiple Myeloma: An International, Double-Blind, Double-Dummy, Randomised, Controlled, Phase 3 Study. *The Lancet Oncology* **2018**, *19* (3), 370–381. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30072-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30072-X).
- (109) Vallet, S.; Raje, N.; Ishitsuka, K.; Hideshima, T.; Podar, K.; Chhetri, S.; Pozzi, S.; Breitzkreutz, I.; Kiziltepe, T.; Yasui, H.; Ocio, E. M.; Shiraishi, N.; Jin, J.; Okawa, Y.; Ikeda, H.; Mukherjee, S.; Vaghela, N.; Cirstea, D.; Ladetto, M.; Boccadoro, M.; Anderson, K. C. MLN3897, a Novel CCR1 Inhibitor, Impairs Osteoclastogenesis and Inhibits the Interaction of Multiple Myeloma Cells and Osteoclasts. *Blood* **2007**, *110* (10), 3744–3752. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-05-093294>.
- (110) Dairaghi, D. J.; Oyajobi, B. O.; Gupta, A.; McCluskey, B.; Miao, S.; Powers, J. P.; Seitz, L. C.; Wang, Y.; Zeng, Y.; Zhang, P.; Schall, T. J.; Jaen, J. C. CCR1 Blockade Reduces Tumor Burden and Osteolysis in Vivo in a Mouse Model of Myeloma Bone Disease. *Blood* **2012**, *120* (7), 1449–1457. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-10-384784>.
- (111) Corre, J.; Mahtouk, K.; Attal, M.; Gadelorge, M.; Huynh, A.; Fleury-Cappellesso, S.; Danho, C.; Laharrague, P.; Klein, B.; Rème, T.; Bourin, P. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Are Abnormal in Multiple Myeloma. *Leukemia* **2007**, *21* (5), 1079–1088. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404621>.

- (112) Fulciniti, M.; Hideshima, T.; Vermot-Desroches, C.; Pozzi, S.; Nanjappa, P.; Shen, Z.; Patel, N.; Smith, E. S.; Wang, W.; Prabhala, R.; Tai, Y. -t.; Tassone, P.; Anderson, K. C.; Munshi, N. C. A High-Affinity Fully Human Anti-IL-6 MAb, 1339, for the Treatment of Multiple Myeloma. *Clinical Cancer Research* **2009**, *15* (23), 7144–7152. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1483>.
- (113) Prabhala, R. H.; Fulciniti, M.; Pelluru, D.; Rashid, N.; Nigroiu, A.; Nanjappa, P.; Pai, C.; Lee, S.; Prabhala, N. S.; Bandi, R. L.; Smith, R.; Lazo-Kallanian, S. B.; Valet, S.; Raje, N.; Gold, J. S.; Richardson, P. G.; Daley, J. F.; Anderson, K. C.; Ettenberg, S. A.; Di Padova, F.; Munshi, N. C. Targeting IL-17A in Multiple Myeloma: A Potential Novel Therapeutic Approach in Myeloma. *Leukemia* **2016**, *30* (2), 379–389. <https://doi.org/10.1038/leu.2015.228>.
- (114) Tanaka, Y.; Abe, M.; Hiasa, M.; Oda, A.; Amou, H.; Nakano, A.; Takeuchi, K.; Kitazoe, K.; Kido, S.; Inoue, D.; Moriyama, K.; Hashimoto, T.; Ozaki, S.; Matsumoto, T. Myeloma Cell-Osteoclast Interaction Enhances Angiogenesis Together with Bone Resorption: A Role for Vascular Endothelial Cell Growth Factor and Osteopontin. *Clinical Cancer Research* **2007**, *13* (3), 816–823. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-2258>.
- (115) Beider, K.; Begin, M.; Abraham, M.; Wald, H.; Weiss, I. D.; Wald, O.; Pikarsky, E.; Zeira, E.; Eizenberg, O.; Galun, E.; Hardan, I.; Engelhard, D.; Nagler, A.; Peled, A. CXCR4 Antagonist 4F-Benzoyl-TN14003 Inhibits Leukemia and Multiple Myeloma Tumor Growth. *Experimental Hematology* **2011**, *39* (3), 282–292. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2010.11.010>.
- (116) Ducy, P.; Zhang, R.; Geoffroy, V.; Ridall, A. L.; Karsenty, G. Osf2/Cbfa1: A Transcriptional Activator of Osteoblast Differentiation. *Cell* **1997**, *89* (5), 747–754. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80257-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80257-3).
- (117) Nakashima, K.; Zhou, X.; Kunkel, G.; Zhang, Z.; Deng, J. M.; Behringer, R. R.; de Crombrughe, B. The Novel Zinc Finger-Containing Transcription Factor Osterix Is Required for Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Cell* **2002**, *108* (1), 17–29. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00622-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00622-5).
- (118) Long, F. Building Strong Bones: Molecular Regulation of the Osteoblast Lineage. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2012**, *13* (1), 27–38. <https://doi.org/10.1038/nrm3254>.
- (119) Evans, C. E.; Galasko, C. S.; Ward, C. Does Myeloma Secrete an Osteoblast Inhibiting Factor? *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume* **1989**, *71* (2), 288–290.
- (120) Evans, C. E.; Ward, C.; Rathour, L.; Galasko, C. B. Myeloma Affects Both the Growth and Function of Human Osteoblast-like Cells. *Clin Exp Metast* **1992**, *10* (1), 33–38. <https://doi.org/10.1007/BF00163574>.
- (121) Spaan, I.; Raymakers, R. A.; van de Stolpe, A.; Peperzak, V. Wnt Signaling in Multiple Myeloma: A Central Player in Disease with Therapeutic Potential. *J Hematol Oncol* **2018**, *11* (1), 67. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0615-3>.
- (122) Westendorf, J. J.; Kahler, R. A.; Schroeder, T. M. Wnt Signaling in Osteoblasts and Bone Diseases. *Gene* **2004**, *341*, 19–39. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.06.044>.
- (123) Kawano, Y. Secreted Antagonists of the Wnt Signalling Pathway. *Journal of Cell Science* **2003**, *116* (13), 2627–2634. <https://doi.org/10.1242/jcs.00623>.

- (124) Tian, E.; Zhan, F.; Walker, R.; Rasmussen, E.; Ma, Y.; Barlogie, B.; Shaughnessy, J. D. The Role of the Wnt-Signaling Antagonist DKK1 in the Development of Osteolytic Lesions in Multiple Myeloma. *N Engl J Med* **2003**, *349* (26), 2483–2494. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa030847>.
- (125) Yaccoby, S.; Ling, W.; Zhan, F.; Walker, R.; Barlogie, B.; Shaughnessy, J. D. Antibody-Based Inhibition of DKK1 Suppresses Tumor-Induced Bone Resorption and Multiple Myeloma Growth in Vivo. *Blood* **2007**, *109* (5), 2106–2111. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-09-047712>.
- (126) Iyer, S. P.; Beck, J. T.; Stewart, A. K.; Shah, J.; Kelly, K. R.; Isaacs, R.; Bilic, S.; Sen, S.; Munshi, N. C. A Phase IB Multicentre Dose-Determination Study of BHQ880 in Combination with Anti-Myeloma Therapy and Zoledronic Acid in Patients with Relapsed or Refractory Multiple Myeloma and Prior Skeletal-Related Events. *British Journal of Haematology* **2014**, *167* (3), 366–375. <https://doi.org/10.1111/bjh.13056>.
- (127) Munshi, N. C.; Abonour, R.; Beck, J. T.; Bensinger, W.; Facon, T.; Stockerl-Goldstein, K.; Baz, R.; Siegel, D. S.; Neben, K.; Lonial, S.; Suvannasankha, A.; Bilic, S.; Chica, S.; Mukhopadhyay, S.; Isaacs, R.; Jagannath, S. Early Evidence of Anabolic Bone Activity of BHQ880, a Fully Human Anti-DKK1 Neutralizing Antibody: Results of a Phase 2 Study in Previously Untreated Patients with Smoldering Multiple Myeloma At Risk for Progression. *Blood* **2012**, *120* (21), 331–331. <https://doi.org/10.1182/blood.V120.21.331.331>.
- (128) Oshima, T.; Abe, M.; Asano, J.; Hara, T.; Kitazoe, K.; Sekimoto, E.; Tanaka, Y.; Shibata, H.; Hashimoto, T.; Ozaki, S.; Kido, S.; Inoue, D.; Matsumoto, T. Myeloma Cells Suppress Bone Formation by Secreting a Soluble Wnt Inhibitor, SFRP-2. *Blood* **2005**, *106* (9), 3160–3165. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-12-4940>.
- (129) Zhang, Y.; Morris, J. P.; Yan, W.; Schofield, H. K.; Gurney, A.; Simeone, D. M.; Millar, S. E.; Hoey, T.; Hebrok, M.; Pasca di Magliano, M. Canonical Wnt Signaling Is Required for Pancreatic Carcinogenesis. *Cancer Research* **2013**, *73* (15), 4909–4922. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4384>.
- (130) Kovacs, D.; Migliano, E.; Muscardin, L.; Silipo, V.; Catricalà, C.; Picardo, M.; Bellei, B. The Role of Wnt/Beta-Catenin Signaling Pathway in Melanoma Epithelial-to-Mesenchymal-like Switching: Evidences from Patients-Derived Cell Lines. *Oncotarget* **2016**, *7* (28). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9232>.
- (131) Murillo-Garzón, V.; Kypka, R. WNT Signalling in Prostate Cancer. *Nat Rev Urol* **2017**, *14* (11), 683–696. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2017.144>.
- (132) Giuliani, N.; Colla, S.; Morandi, F.; Lazzaretti, M.; Sala, R.; Bonomini, S.; Grano, M.; Colucci, S.; Svaldi, M.; Rizzoli, V. Myeloma Cells Block RUNX2/CBFA1 Activity in Human Bone Marrow Osteoblast Progenitors and Inhibit Osteoblast Formation and Differentiation. *Blood* **2005**, *106* (7), 2472–2483. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-12-4986>.
- (133) Trotter, T. N.; Li, M.; Pan, Q.; Pekar, D.; Rowan, P. D.; Li, J.; Zhan, F.; Suva, L. J.; Javed, A.; Yang, Y. Myeloma Cell-Derived Runx2 Promotes Myeloma Progression in Bone. *Blood* **2015**, *125* (23), 3598–3608. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-12-613968>.

- (134) D'Souza, S.; del Prete, D.; Jin, S.; Sun, Q.; Huston, A. J.; Kostov, F. E.; Sammut, B.; Hong, C.-S.; Anderson, J. L.; Patrene, K. D.; Yu, S.; Velu, C. S.; Xiao, G.; Grimes, H. L.; Roodman, G. D.; Galson, D. L. Gfi1 Expressed in Bone Marrow Stromal Cells Is a Novel Osteoblast Suppressor in Patients with Multiple Myeloma Bone Disease. *Blood* **2011**, *118* (26), 6871–6880. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-04-346775>.
- (135) Manolagas, S. C. Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis*. *Endocrine Reviews* **2000**, *21* (2), 115–137. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.2.0395>.
- (136) Suda, T.; Takahashi, N.; Udagawa, N.; Jimi, E.; Gillespie, M. T.; Martin, T. J. Modulation of Osteoclast Differentiation and Function by the New Members of the Tumor Necrosis Factor Receptor and Ligand Families. *Endocrine Reviews* **1999**, *20* (3), 345–357. <https://doi.org/10.1210/edrv.20.3.0367>.
- (137) Elford, P. R.; Lamberts, S. W. J. Contrasting Modulation by Transforming Growth Factor- β -1 of Insulin-Like Growth Factor-I Production in Osteoblasts and Chondrocytes. *Endocrinology* **1990**, *127* (4), 1635–1639. <https://doi.org/10.1210/endo-127-4-1635>.
- (138) Sobue, T.; Gravely, T.; Hand, A.; Min, Y. K.; Pilbeam, C.; Raisz, L. G.; Zhang, X.; Larocca, D.; Florkiewicz, R.; Hurley, M. M. Regulation of Fibroblast Growth Factor 2 and Fibroblast Growth Factor Receptors by Transforming Growth Factor β in Human Osteoblastic MG-63 Cells. *J Bone Miner Res* **2002**, *17* (3), 502–512. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2002.17.3.502>.
- (139) Franchimont, N.; Rydziel, S.; Canalis, E. Transforming Growth Factor- β Increases Interleukin-6 Transcripts in Osteoblasts. *Bone* **2000**, *26* (3), 249–253. [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(99\)00275-6](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(99)00275-6).
- (140) Mohammad, K. S.; Chen, C. G.; Balooch, G.; Stebbins, E.; McKenna, C. R.; Davis, H.; Niewolna, M.; Peng, X. H.; Nguyen, D. H. N.; Ionova-Martin, S. S.; Bracey, J. W.; Hogue, W. R.; Wong, D. H.; Ritchie, R. O.; Suva, L. J.; Derynck, R.; Guise, T. A.; Alliston, T. Pharmacologic Inhibition of the TGF- β Type I Receptor Kinase Has Anabolic and Anti-Catabolic Effects on Bone. *PLoS ONE* **2009**, *4* (4), e5275. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005275>.
- (141) Takeuchi, K.; Abe, M.; Hiasa, M.; Oda, A.; Amou, H.; Kido, S.; Harada, T.; Tanaka, O.; Miki, H.; Nakamura, S.; Nakano, A.; Kagawa, K.; Yata, K.; Ozaki, S.; Matsumoto, T. TGF- β Inhibition Restores Terminal Osteoblast Differentiation to Suppress Myeloma Growth. *PLoS ONE* **2010**, *5* (3), e9870. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009870>.
- (142) Frayn, K. N.; Karpe, F.; Fielding, B. A.; Macdonald, I. A.; Coppack, S. W. Integrative Physiology of Human Adipose Tissue. *Int J Obes* **2003**, *27* (8), 875–888. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802326>.
- (143) Cawthorn, W. P.; Scheller, E. L.; Parlee, S. D.; Pham, H. A.; Learman, B. S.; Redshaw, C. M. H.; Sulston, R. J.; Burr, A. A.; Das, A. K.; Simon, B. R.; Mori, H.; Bree, A. J.; Schell, B.; Krishnan, V.; MacDougald, O. A. Expansion of Bone Marrow Adipose Tissue During Caloric Restriction Is Associated With Increased Circulating Glucocorticoids and Not With Hypoleptinemia. *Endocrinology* **2016**, *157* (2), 508–521. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1477>.

- (144) Meunier, P.; Aaron, J.; Edouard, C.; VIGNON, G. Osteoporosis and the Replacement of Cell Populations of the Marrow by Adipose Tissue: A Quantitative Study of 84 Iliac Bone Biopsies. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **1971**, *80*, 147–154. <https://doi.org/10.1097/00003086-197110000-00021>.
- (145) Liu, L.-F.; Shen, W.-J.; Ueno, M.; Patel, S.; Kraemer, F. B. Characterization of Age-Related Gene Expression Profiling in Bone Marrow and Epididymal Adipocytes. *BMC Genomics* **2011**, *12* (1), 212. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-212>.
- (146) Poloni, A.; Maurizi, G.; Serrani, F.; Mancini, S.; Zingaretti, M. C.; Frontini, A.; Cinti, S.; Olivieri, A.; Leoni, P. Molecular and Functional Characterization of Human Bone Marrow Adipocytes. *Experimental Hematology* **2013**, *41* (6), 558–566.e2. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2013.02.005>.
- (147) Lecka-Czernik, B. Marrow Fat Metabolism Is Linked to the Systemic Energy Metabolism. *Bone* **2012**, *50* (2), 534–539. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2011.06.032>.
- (148) Sadie-Van Gijzen, H.; Hough, F. S.; Ferris, W. F. Determinants of Bone Marrow Adiposity: The Modulation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Activity as a Central Mechanism. *Bone* **2013**, *56* (2), 255–265. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2013.06.016>.
- (149) Almeida, M.; Ambrogini, E.; Han, L.; Manolagas, S. C.; Jilka, R. L. Increased Lipid Oxidation Causes Oxidative Stress, Increased Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Expression, and Diminished Pro-Osteogenic Wnt Signaling in the Skeleton. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (40), 27438–27448. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.023572>.
- (150) Goto, H.; Osaki, M.; Fukushima, T.; Sakamoto, K.; Hozumi, A.; Baba, H.; Shindo, H. Human Bone Marrow Adipocytes Support Dexamethasone-Induced Osteoclast Differentiation and Function through RANKL Expression. *Biomed. Res.* **2011**, *32* (1), 37–44. <https://doi.org/10.2220/biomedres.32.37>.
- (151) Justesen, J.; Stenderup, K.; Ebbesen, E. N.; Mosekilde, L.; Steiniche, T.; Kassem, M. Adipocyte Tissue Volume in Bone Marrow Is Increased with Aging and in Patients with Osteoporosis. *Biogerontology* **8**.
- (152) Abella, E.; Feliu, E.; Granada, I.; Millá, F.; Oriol, A.; Ribera, J. M.; Sánchez-Planell, L.; Berga, Ll.; Reverter, J. C.; Rozman, C. Bone Marrow Changes in Anorexia Nervosa Are Correlated With the Amount of Weight Loss and Not With Other Clinical Findings. *American Journal of Clinical Pathology* **2002**, *118* (4), 582–588. <https://doi.org/10.1309/2Y7X-YDXK-006B-XLT2>.
- (153) Ecklund, K.; Vajapeyam, S.; Feldman, H. A.; Buzney, C. D.; Mulkern, R. V.; Kleinman, P. K.; Rosen, C. J.; Gordon, C. M. Bone Marrow Changes in Adolescent Girls with Anorexia Nervosa. *Journal of Bone and Mineral Research* **2010**, *25* (2), 298–304. <https://doi.org/10.1359/jbmr.090805>.
- (154) Trotter, T. N.; Gibson, J. T.; Sherpa, T. L.; Gowda, P. S.; Peker, D.; Yang, Y. Adipocyte-Lineage Cells Support Growth and Dissemination of Multiple Myeloma in Bone. *The American Journal of Pathology* **2016**, *186* (11), 3054–3063. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.07.012>.

- (155) Reseland, J. E.; Reppe, S.; Olstad, O. K.; Hjorth-Hansen, H.; Brenne, A. T.; Syversen, U.; Waage, A.; Iversen, P. O. Abnormal Adipokine Levels and Leptin-Induced Changes in Gene Expression Profiles in Multiple Myeloma. *European Journal of Haematology* **2009**, *83* (5), 460–470. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.2009.01311.x>.
- (156) Liu, Z.; Xu, J.; He, J.; Liu, H.; Lin, P.; Wan, X.; Navone, N. M.; Tong, Q.; Kwak, L. W.; Orłowski, R. Z.; Yang, J. Mature Adipocytes in Bone Marrow Protect Myeloma Cells against Chemotherapy through Autophagy Activation. *Oncotarget* **2015**, *6* (33). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6020>.
- (157) Dalamaga, M.; Karmaniolas, K.; Panagiotou, A.; Hsi, A.; Chamberland, J.; Dimas, C.; Lekka, A.; Mantzoros, C. S. Low Circulating Adiponectin and Resistin, but Not Leptin, Levels Are Associated with Multiple Myeloma Risk: A Case–Control Study. *Cancer Causes Control* **2009**, *20* (2), 193–199. <https://doi.org/10.1007/s10552-008-9233-7>.
- (158) Hofmann, J. N.; Liao, L. M.; Pollak, M. N.; Wang, Y.; Pfeiffer, R. M.; Baris, D.; Andreotti, G.; Lan, Q.; Landgren, O.; Rothman, N.; Purdue, M. P. A Prospective Study of Circulating Adipokine Levels and Risk of Multiple Myeloma. *Lymphoid Neoplasia* **3**.
- (159) Friedenstein, A. J.; Piatetzky-Shapiro, I.; Petrakova, K. V. Osteogenesis in Transplants of Bone Marrow Cells. *Journal of embryology and experimental morphology* **15**.
- (160) Friedenstein, A. J.; Chailakhyan, R. K.; Latsinik, N. V.; Panasyuk, A. F.; Keiliss-Borok, I. V. Stromal Cells Responsible for Transferring the Microenvironment of the Hemopoietic Tissues: Cloning In Vitro and Replantation In Vivo. *Transplantation* **1974**, *17* (4), 331–340. <https://doi.org/10.1097/00007890-197404000-00001>.
- (161) Caplan, A. I. Mesenchymal Stem Cells. *J. Orthop. Res.* **1991**, *9* (5), 641–650. <https://doi.org/10.1002/jor.1100090504>.
- (162) Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F. C.; Krause, D. S.; Deans, R. J.; Keating, A.; Prockop, D. J.; Horwitz, E. M. Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement. *Cytotherapy* **2006**, *8* (4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>.
- (163) Fraser, J. K.; Wulur, I.; Alfonso, Z.; Hedrick, M. H. Fat Tissue: An Underappreciated Source of Stem Cells for Biotechnology. *Trends in Biotechnology* **2006**, *24* (4), 150–154. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.01.010>.
- (164) Li, S.; Huang, K.-J.; Wu, J.-C.; Hu, M. S.; Sanyal, M.; Hu, M.; Longaker, M. T.; Lorenz, H. P. Peripheral Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells: Candidate Cells Responsible for Healing Critical-Sized Calvarial Bone Defects: Blood-Derived MSCs in Calvarial Bone Healing. *STEM CELLS Translational Medicine* **2015**, *4* (4), 359–368. <https://doi.org/10.5966/sctm.2014-0150>.
- (165) Hass, R.; Kasper, C.; Böhm, S.; Jacobs, R. Different Populations and Sources of Human Mesenchymal Stem Cells (MSC): A Comparison of Adult and Neonatal Tissue-Derived MSC. *Cell Communication and Signaling* **2011**, *9* (1), 12. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-9-12>.
- (166) Wu, M.; Zhang, R.; Zou, Q.; Chen, Y.; Zhou, M.; Li, X.; Ran, R.; Chen, Q. Comparison of the Biological Characteristics of Mesenchymal Stem Cells Derived from the Human

- Placenta and Umbilical Cord. *Scientific Reports* **2018**, *8* (1), 5014. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23396-1>.
- (167) Wilson, A.; Trumpp, A. Bone-Marrow Haematopoietic-Stem-Cell Niches. *Nature Reviews Immunology* **2006**, *6* (2), 93–106. <https://doi.org/10.1038/nri1779>.
- (168) Spaggiari, G. M.; Abdelrazik, H.; Becchetti, F.; Moretta, L. MSCs Inhibit Monocyte-Derived DC Maturation and Function by Selectively Interfering with the Generation of Immature DCs: Central Role of MSC-Derived Prostaglandin E2. *Blood* **2009**, *113* (26), 6576–6583. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-02-203943>.
- (169) Bernardo, M. E.; Fibbe, W. E. Mesenchymal Stromal Cells: Sensors and Switchers of Inflammation. *Cell Stem Cell* **2013**, *13* (4), 392–402. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.09.006>.
- (170) Ren, G.; Zhang, L.; Zhao, X.; Xu, G.; Zhang, Y.; Roberts, A. I.; Zhao, R. C.; Shi, Y. Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression Occurs via Concerted Action of Chemokines and Nitric Oxide. *Cell Stem Cell* **2008**, *2* (2), 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.11.014>.
- (171) Castells, M.; Thibault, B.; Mery, E.; Golzio, M.; Pasquet, M.; Hennebelle, I.; Bourin, P.; Mirshahi, M.; Delord, J. P.; Querleu, D.; Couderc, B. Ovarian Ascites-Derived Hospicells Promote Angiogenesis via Activation of Macrophages. *Cancer Letters* **2012**, *326* (1), 59–68. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.07.020>.
- (172) Naour, A. L.; Prat, M.; Thibault, B.; Mével, R.; Lemaitre, L.; Leray, H.; Joubert, M.-V.; Coulson, K.; Golzio, M.; Lefevre, L.; Mery, E.; Martinez, A.; Ferron, G.; Delord, J.-P.; Coste, A.; Couderc, B. Tumor Cells Educate Mesenchymal Stromal Cells to Release Chemoprotective and Immunomodulatory Factors. *Journal of Molecular Cell Biology* **2019**, mjj090. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjj090>.
- (173) Espagnolle, N.; Balguerie, A.; Arnaud, E.; Sensebé, L.; Varin, A. CD54-Mediated Interaction with Pro-Inflammatory Macrophages Increases the Immunosuppressive Function of Human Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cell Reports* **2017**, *8* (4), 961–976. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.02.008>.
- (174) Tomchuck, S. L.; Zvezdaryk, K. J.; Coffelt, S. B.; Waterman, R. S.; Danka, E. S.; Scandurro, A. B. Toll-Like Receptors on Human Mesenchymal Stem Cells Drive Their Migration and Immunomodulating Responses. *Stem Cells* **2008**, *26* (1), 99–107. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0563>.
- (175) Lim, K.-H.; Staudt, L. M. Toll-Like Receptor Signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2013**, *5* (1), a011247–a011247. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011247>.
- (176) Chiron, D.; Jego, G.; Pellat-Deuceunynck, C. Toll-like Receptors: Expression and Involvement in Multiple Myeloma. *Leukemia Research* **2010**, *34* (12), 1545–1550. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2010.06.002>.
- (177) Thakur, K. K.; Bolshette, N. B.; Trandafir, C.; Jamdade, V. S.; Istrate, A.; Gogoi, R.; Cucuianu, A. Role of Toll-like Receptors in Multiple Myeloma and Recent Advances. *Experimental Hematology* **2015**, *43* (3), 158–167. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2014.11.003>.

- (178) van den Akker, F.; de Jager, S. C. A.; Sluijter, J. P. G. Mesenchymal Stem Cell Therapy for Cardiac Inflammation: Immunomodulatory Properties and the Influence of Toll-Like Receptors. *Mediators of Inflammation* **2013**, *2013*, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2013/181020>.
- (179) Lu, Y.; Liu, J.; Liu, Y.; Qin, Y.; Luo, Q.; Wang, Q.; Duan, H. TLR4 Plays a Crucial Role in MSC-Induced Inhibition of NK Cell Function. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2015**, *464* (2), 541–547. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.07.002>.
- (180) J. Centeno, C.; R. Schultz, J.; Cheever, M.; Freeman, M.; Faulkner, S.; Robinson, B.; Hanson, R. Safety and Complications Reporting Update on the Re-Implantation of Culture-Expanded Mesenchymal Stem Cells Using Autologous Platelet Lysate Technique. *CSCR* **2011**, *6* (4), 368–378. <https://doi.org/10.2174/157488811797904371>.
- (181) Gangji, V.; Hauzeur, J.-P.; Matos, C.; De Maertelaer, V.; Toungouz, M.; Lambermont, M. Treatment of Osteonecrosis of the Femoral Head with Implantation of Autologous Bone-Marrow Cells: A Pilot Study. *The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume* **2004**, *86A* (6), 1153–1160. <https://doi.org/10.2106/00004623-200406000-00006>.
- (182) Peeters, C. M. M.; Leijts, M. J. C.; Reijman, M.; van Osch, G. J. V. M.; Bos, P. K. Safety of Intra-Articular Cell-Therapy with Culture-Expanded Stem Cells in Humans: A Systematic Literature Review. *Osteoarthritis and Cartilage* **2013**, *21* (10), 1465–1473. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2013.06.025>.
- (183) Vega, A.; Martín-Ferrero, M. A.; Del Canto, F.; Alberca, M.; García, V.; Munar, A.; Orozco, L.; Soler, R.; Fuertes, J. J.; Huguet, M.; Sánchez, A.; García-Sancho, J. Treatment of Knee Osteoarthritis With Allogeneic Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: A Randomized Controlled Trial. *Transplantation* **2015**, *99* (8), 1681–1690. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000000678>.
- (184) Pers, Y.-M.; Rackwitz, L.; Ferreira, R.; Pullig, O.; Delfour, C.; Barry, F.; Sensebe, L.; Casteilla, L.; Fleury, S.; Bourin, P.; Noël, D.; Canovas, F.; Cyteval, C.; Lisignoli, G.; Schrauth, J.; Haddad, D.; Domergue, S.; Noeth, U.; Jorgensen, C.; on behalf of the ADIPOA Consortium. Adipose Mesenchymal Stromal Cell-Based Therapy for Severe Osteoarthritis of the Knee: A Phase I Dose-Escalation Trial: ASCs for Severe OA of the Knee. *STEM CELLS Translational Medicine* **2016**, *5* (7), 847–856. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0245>.
- (185) Pers, Y.-M.; Quentin, J.; Feirreira, R.; Espinoza, F.; Abdellaoui, N.; Erkilic, N.; Cren, M.; Dufourcq-Lopez, E.; Pullig, O.; Nöth, U.; Jorgensen, C.; Louis-Plence, P. Injection of Adipose-Derived Stromal Cells in the Knee of Patients with Severe Osteoarthritis Has a Systemic Effect and Promotes an Anti-Inflammatory Phenotype of Circulating Immune Cells. *Theranostics* **2018**, *8* (20), 5519–5528. <https://doi.org/10.7150/thno.27674>.
- (186) Hare, J. M.; Fishman, J. E.; Gerstenblith, G.; DiFede Velazquez, D. L.; Zambrano, J. P.; Suncion, V. Y.; Tracy, M.; Ghersin, E.; Johnston, P. V.; Brinker, J. A.; Breton, E.; Davis-Sproul, J.; Byrnes, J.; George, R.; Lardo, A.; Schulman, I. H.; Mendizabal, A. M.; Lowery, M. H.; Rouy, D.; Altman, P.; Wong Po Foo, C.; Ruiz, P.; Amador, A.; Da Silva, J.; McNiece, I. K.; Heldman, A. W. Comparison of Allogeneic vs Autologous Bone Marrow-Derived

Mesenchymal Stem Cells Delivered by Transendocardial Injection in Patients With Ischemic Cardiomyopathy: The POSEIDON Randomized Trial. *JAMA* **2012**, *308* (22), 2369. <https://doi.org/10.1001/jama.2012.25321>.

- (187) Guijarro, D.; Lebrin, M.; Lairez, O.; Bourin, P.; Piriou, N.; Pozzo, J.; Lande, G.; Berry, M.; Le Tourneau, T.; Cussac, D.; Sensebe, L.; Gross, F.; Lamirault, G.; Huynh, A.; Manrique, A.; Ruidavet, J. B.; Elbaz, M.; Trochu, J. N.; Parini, A.; Kramer, S.; Galinier, M.; Lemarchand, P.; Roncalli, J. Intramyocardial Transplantation of Mesenchymal Stromal Cells for Chronic Myocardial Ischemia and Impaired Left Ventricular Function: Results of the MESAMI 1 Pilot Trial. *International Journal of Cardiology* **2016**, *209*, 258–265. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.02.016>.
- (188) Magne, B.; Lataillade, J.-J.; Trouillas, M. Mesenchymal Stromal Cell Preconditioning: The Next Step Toward a Customized Treatment For Severe Burn. *Stem Cells and Development* **2018**, *27* (20), 1385–1405. <https://doi.org/10.1089/scd.2018.0094>.
- (189) Shpichka, A.; Butnaru, D.; Bezrukov, E. A.; Sukhanov, R. B.; Atala, A.; Burdukovskii, V.; Zhang, Y.; Timashev, P. Skin Tissue Regeneration for Burn Injury. *Stem Cell Res Ther* **2019**, *10* (1), 94. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1203-3>.
- (190) Venkataramana, N. K.; Pal, R.; Rao, S. A. V.; Naik, A. L.; Jan, M.; Nair, R.; Sanjeev, C. C.; Kamble, R. B.; Murthy, D. P.; Chaitanya, K. Bilateral Transplantation of Allogenic Adult Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells into the Subventricular Zone of Parkinson's Disease: A Pilot Clinical Study. *Stem Cells International* **2012**, *2012*, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2012/931902>.
- (191) Kebriaei, P.; Isola, L.; Bahceci, E.; Holland, K.; Rowley, S.; McGuirk, J.; Devetten, M.; Jansen, J.; Herzig, R.; Schuster, M.; Monroy, R.; Uberti, J. Adult Human Mesenchymal Stem Cells Added to Corticosteroid Therapy for the Treatment of Acute Graft-versus-Host Disease. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* **2009**, *15* (7), 804–811. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2008.03.012>.
- (192) Kidd, S.; Spaeth, E.; Dembinski, J. L.; Dietrich, M.; Watson, K.; Klopp, A.; Battula, V. L.; Weil, M.; Andreeff, M.; Marini, F. C. Direct Evidence of Mesenchymal Stem Cell Tropism for Tumor and Wounding Microenvironments Using In Vivo Bioluminescent Imaging. *Stem Cells* **2009**, *27* (10), 2614–2623. <https://doi.org/10.1002/stem.187>.
- (193) Ren, G.; Zhao, X.; Wang, Y.; Zhang, X.; Chen, X.; Xu, C.; Yuan, Z.; Roberts, A. I.; Zhang, L.; Zheng, B.; Wen, T.; Han, Y.; Rabson, A. B.; Tischfield, J. A.; Shao, C.; Shi, Y. CCR2-Dependent Recruitment of Macrophages by Tumor-Educated Mesenchymal Stromal Cells Promotes Tumor Development and Is Mimicked by TNF α . *Cell Stem Cell* **2012**, *11* (6), 812–824. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.08.013>.
- (194) Spaeth, E.; Klopp, A.; Dembinski, J.; Andreeff, M.; Marini, F. Inflammation and Tumor Microenvironments: Defining the Migratory Itinerary of Mesenchymal Stem Cells. *Gene Ther* **2008**, *15* (10), 730–738. <https://doi.org/10.1038/gt.2008.39>.
- (195) Mandel, K.; Yang, Y.; Schambach, A.; Glage, S.; Otte, A.; Hass, R. Mesenchymal Stem Cells Directly Interact with Breast Cancer Cells and Promote Tumor Cell Growth In Vitro and In Vivo. *Stem Cells and Development* **2013**, *22* (23), 3114–3127. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0249>.

- (196) Waite, K. A.; Eng, C. From Developmental Disorder to Heritable Cancer: It's All in the BMP/TGF- β Family. *Nat Rev Genet* **2003**, *4* (10), 763–773. <https://doi.org/10.1038/nrg1178>.
- (197) Hekmatshoar, Y.; Nakhle, J.; Galloni, M.; Vignais, M.-L. The Role of Metabolism and Tunneling Nanotube-Mediated Intercellular Mitochondria Exchange in Cancer Drug Resistance. *Biochemical Journal* **2018**, *475* (14), 2305–2328. <https://doi.org/10.1042/BCJ20170712>.
- (198) Wallace, S. R.; Oken, M. M.; Lunetta, K. L.; Panoskaltsis-Mortari, A.; Masellis, A. M. Abnormalities of Bone Marrow Mesenchymal Cells in Multiple Myeloma Patients. *Cancer* **12**.
- (199) Arnulf, B.; Lecourt, S.; Soulier, J.; Ternaux, B.; Lacassagne, M.-N.; Crinquette, A.; Dessoly, J.; Sciaïni, A.-K.; Benbunan, M.; Chomienne, C.; Fermand, J.-P.; Marolleau, J.-P.; Larghero, J. Phenotypic and Functional Characterization of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Derived from Patients with Multiple Myeloma. *Leukemia* **2007**, *21* (1), 158–163. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404466>.
- (200) Garderet, L.; Mazurier, C.; Chapel, A.; Ernou, I.; Boutin, L.; Holy, X.; Gorin, N. C.; Lopez, M.; Doucet, C.; Lataillade, J.-J. Mesenchymal Stem Cell Abnormalities in Patients with Multiple Myeloma. *Leukemia & Lymphoma* **2007**, *48* (10), 2032–2041. <https://doi.org/10.1080/10428190701593644>.
- (201) Gunn, W. G.; Conley, A.; Deininger, L.; Olson, S. D.; Prockop, D. J.; Gregory, C. A. A Crosstalk Between Myeloma Cells and Marrow Stromal Cells Stimulates Production of DKK1 and Interleukin-6: A Potential Role in the Development of Lytic Bone Disease and Tumor Progression in Multiple Myeloma. *STEM CELLS* **2006**, *24* (4), 986–991. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0220>.
- (202) Garcia-Gomez, A.; Rivas, J. D. L.; Ocio, E. M.; Díaz-Rodríguez, E.; Montero, J. C.; Martín, M.; Blanco, J. F.; Sanchez-Guijo, F. M.; Pandiella, A.; San Miguel, J. F.; Garayoa, M. Transcriptomic Profile Induced in Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells after Interaction with Multiple Myeloma Cells: Implications in Myeloma Progression and Myeloma Bone Disease. *Oncotarget* **2014**, *5* (18). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2058>.
- (203) Corre, J.; Labat, E.; Espagnolle, N.; Hebraud, B.; Avet-Loiseau, H.; Roussel, M.; Huynh, A.; Gadelorge, M.; Cordelier, P.; Klein, B.; Moreau, P.; Facon, T.; Fournie, J.-J.; Attal, M.; Bourin, P. Bioactivity and Prognostic Significance of Growth Differentiation Factor GDF15 Secreted by Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Multiple Myeloma. *Cancer Research* **2012**, *72* (6), 1395–1406. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0188>.
- (204) André, T.; Meuleman, N.; Stamatopoulos, B.; De Bruyn, C.; Pieters, K.; Bron, D.; Lagneaux, L. Evidences of Early Senescence in Multiple Myeloma Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells. *PLoS ONE* **2013**, *8* (3), e59756. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059756>.
- (205) Giallongo, C.; Tibullo, D.; Parrinello, N. L.; La Cava, P.; Di Rosa, M.; Bramanti, V.; Di Raimondo, C.; Conticello, C.; Chiarenza, A.; Palumbo, G. A.; Avola, R.; Romano, A.; Di Raimondo, F. Granulocyte-like Myeloid Derived Suppressor Cells (G-MDSC) Are

- Increased in Multiple Myeloma and Are Driven by Dysfunctional Mesenchymal Stem Cells (MSC). *Oncotarget* **2016**, *7* (52). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7969>.
- (206) Zdzisińska, B.; Bojarska-Junak, A.; Dmoszyńska, A.; Kandefer-Szerszeń, M. Abnormal Cytokine Production by Bone Marrow Stromal Cells of Multiple Myeloma Patients in Response to RPMI8226 Myeloma Cells. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* **2008**, *56* (3), 207–221. <https://doi.org/10.1007/s00005-008-0022-5>.
- (207) McNee, G.; Eales, K. L.; Wei, W.; Williams, D. S.; Barkhuizen, A.; Bartlett, D. B.; Essex, S.; Anandram, S.; Filer, A.; Moss, P. A. H.; Pratt, G.; Basu, S.; Davies, C. C.; Tennant, D. A. Citrullination of Histone H3 Drives IL-6 Production by Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in MGUS and Multiple Myeloma. *Leukemia* **2017**, *31* (2), 373–381. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.187>.
- (208) Wang, X.; Zhang, Z.; Yao, C. Survivin Is Upregulated in Myeloma Cell Lines Cocultured with Mesenchymal Stem Cells. *Leukemia Research* **2010**, *34* (10), 1325–1329. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2010.05.006>.
- (209) Roccaro, A. M.; Sacco, A.; Maiso, P.; Azab, A. K.; Tai, Y.-T.; Reagan, M.; Azab, F.; Flores, L. M.; Campigotto, F.; Weller, E.; Anderson, K. C.; Scadden, D. T.; Ghobrial, I. M. BM Mesenchymal Stromal Cell-Derived Exosomes Facilitate Multiple Myeloma Progression. *Journal of Clinical Investigation* **2013**, *123* (4), 1542–1555. <https://doi.org/10.1172/JCI66517>.
- (210) Mori, Y.; Shimizu, N.; Dallas, M.; Niewolna, M.; Story, B.; Williams, P. J.; Mundy, G. R.; Yoneda, T. Anti-A4 Integrin Antibody Suppresses the Development of Multiple Myeloma and Associated Osteoclastic Osteolysis. *Blood* **2004**, *104* (7), 2149–2154. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-01-0236>.
- (211) Li, B.; Fu, J.; Chen, P.; Zhuang, W. Impairment in Immunomodulatory Function of Mesenchymal Stem Cells from Multiple Myeloma Patients. *Archives of Medical Research* **2010**, *41* (8), 623–633. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2010.11.008>.
- (212) Lemaitre, L.; Do Souto Ferreira, L.; Joubert, M.-V.; Avet-Loiseau, H.; Martinet, L.; Corre, J.; Couderc, B. Imprinting of Mesenchymal Stromal Cell Transcriptome Persists Even after Treatment in Patients with Multiple Myeloma. *IJMS* **2020**, *21* (11), 3854. <https://doi.org/10.3390/ijms21113854>.
- (213) Ciavarella, S.; Caselli, A.; Tamma, A. V.; Savonarola, A.; Loverro, G.; Paganelli, R.; Tucci, M.; Silvestris, F. A Peculiar Molecular Profile of Umbilical Cord-Mesenchymal Stromal Cells Drives Their Inhibitory Effects on Multiple Myeloma Cell Growth and Tumor Progression. *Stem Cells and Development* **2015**, *24* (12), 1457–1470. <https://doi.org/10.1089/scd.2014.0254>.
- (214) Ganguly, P.; El-Jawhari, J. J.; Burska, A. N.; Ponchel, F.; Giannoudis, P. V.; Jones, E. A. The Analysis of in Vivo Aging in Human Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells Using Colony-Forming Unit-Fibroblast Assay and the CD45 Low CD271+ Phenotype. *Stem Cells International* **2019**, *2019*, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2019/5197983>.
- (215) Beane, O. S.; Fonseca, V. C.; Cooper, L. L.; Koren, G.; Darling, E. M. Impact of Aging on the Regenerative Properties of Bone Marrow-, Muscle-, and Adipose-Derived Mesenchymal Stem/Stromal Cells. *PLoS ONE* **2014**, *9* (12), e115963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115963>.

- (216) Wilkins, M. R.; Sanchez, J.-C.; Gooley, A. A.; Appel, R. D.; Humphery-Smith, I.; Hochstrasser, D. F.; Williams, K. L. Progress with Proteome Projects: Why All Proteins Expressed by a Genome Should Be Identified and How To Do It. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* **1996**, *13* (1), 19–50. <https://doi.org/10.1080/02648725.1996.10647923>.
- (217) Pandey, A.; Mann, M. Proteomics to Study Genes and Genomes. *Nature* **2000**, *405* (6788), 837–846. <https://doi.org/10.1038/35015709>.
- (218) Aslam, B.; Basit, M.; Nisar, M. A.; Khurshid, M.; Rasool, M. H. Proteomics: Technologies and Their Applications. *J Chromatogr Sci* **2017**, *55* (2), 182–196. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw167>.
- (219) Kaiser, M.; Mieth, M.; Liebisch, P.; Oberländer, R.; Rademacher, J.; Jakob, C.; Kleeberg, L.; Fleissner, C.; Braendle, E.; Peters, M.; Stover, D.; Sezer, O.; Heider, U. Serum Concentrations of DKK-1 Correlate with the Extent of Bone Disease in Patients with Multiple Myeloma: Serum DKK-1 Correlates with Myeloma Bone Disease. *European Journal of Haematology* **2008**, *80* (6), 490–494. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.2008.01065.x>.
- (220) Clines, G. A.; Mohammad, K. S.; Bao, Y.; Stephens, O. W.; Suva, L. J.; Shaughnessy, J. D.; Fox, J. W.; Chirgwin, J. M.; Guise, T. A. Dickkopf Homolog 1 Mediates Endothelin-1-Stimulated New Bone Formation. *Molecular Endocrinology* **2007**, *21* (2), 486–498. <https://doi.org/10.1210/me.2006-0346>.
- (221) Pinzone, J. J.; Hall, B. M.; Thudi, N. K.; Vonau, M.; Qiang, Y.-W.; Rosol, T. J.; Shaughnessy, J. D. The Role of Dickkopf-1 in Bone Development, Homeostasis, and Disease. *Blood* **2009**, *113* (3), 517–525. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-03-145169>.
- (222) Christodoulides, C. The Wnt Antagonist Dickkopf-1 and Its Receptors Are Coordinately Regulated during Early Human Adipogenesis. *Journal of Cell Science* **2006**, *119* (12), 2613–2620. <https://doi.org/10.1242/jcs.02975>.
- (223) Gaur, T.; Lengner, C. J.; Hovhannisyann, H.; Bhat, R. A.; Bodine, P. V. N.; Komm, B. S.; Javed, A.; van Wijnen, A. J.; Stein, J. L.; Stein, G. S.; Lian, J. B. Canonical WNT Signaling Promotes Osteogenesis by Directly Stimulating *Runx2* Gene Expression. *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280* (39), 33132–33140. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500608200>.
- (224) Qiang, Y.-W.; Chen, Y.; Stephens, O.; Brown, N.; Chen, B.; Epstein, J.; Barlogie, B.; Shaughnessy, J. D. Myeloma-Derived Dickkopf-1 Disrupts Wnt-Regulated Osteoprotegerin and RANKL Production by Osteoblasts: A Potential Mechanism Underlying Osteolytic Bone Lesions in Multiple Myeloma. *Blood* **2008**, *112* (1), 196–207. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-01-132134>.
- (225) Standal, T.; Seidel, C.; Hjertner, Ø.; Plesner, T.; Sanderson, R. D.; Waage, A.; Borset, M.; Sundan, A. Osteoprotegerin Is Bound, Internalized, and Degraded by Multiple Myeloma Cells. *Blood* **2002**, *100* (8), 3002–3007. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-04-1190>.
- (226) Yaccoby, S.; Wezeman, M. J.; Zangari, M.; Walker, R.; Cottler, M.; Gaddy, D.; Ling, W.; Saha, R.; Barlogie, B.; Tricot, G.; Epstein, J. Inhibitory Effects of Osteoblasts and

Increased Bone Formation on Myeloma in Novel Culture Systems and a Myelomatous Mouse Model. *Haematologica* **2006**, *19*.

- (227) Siefert, S. A.; Chabasse, C.; Mukhopadhyay, S.; Hoofnagle, M. H.; Strickland, D. K.; Sarkar, R.; Antalis, T. M. Enhanced Venous Thrombus Resolution in Plasminogen Activator Inhibitor Type-2 Deficient Mice. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2014**, *12* (10), 1706–1716. <https://doi.org/10.1111/jth.12657>.
- (228) Croucher, D. R.; Saunders, D. N.; Lobov, S.; Ranson, M. Revisiting the Biological Roles of PAI2 (SERPINB2) in Cancer. *Nature Reviews Cancer* **2008**, *8* (7), 535–545. <https://doi.org/10.1038/nrc2400>.
- (229) Yagci, M.; Sucak, G. T.; Haznedar, R. Fibrinolytic Activity in Multiple Myeloma. *Am. J. Hematol.* **2003**, *74* (4), 231–237. <https://doi.org/10.1002/ajh.10433>.
- (230) Coppin, L.; Sokal, E.; Stéphenne, X. Thrombogenic Risk Induced by Intravascular Mesenchymal Stem Cell Therapy: Current Status and Future Perspectives. *Cells* **2019**, *8* (10), 1160. <https://doi.org/10.3390/cells8101160>.
- (231) Seeger, F. H.; Rasper, T.; Fischer, A.; Muhly-Reinholz, M.; Hergenreider, E.; Leistner, D. M.; Sommer, K.; Manavski, Y.; Henschler, R.; Chavakis, E.; Assmus, B.; Zeiher, A. M.; Dimmeler, S. Heparin Disrupts the CXCR4/SDF-1 Axis and Impairs the Functional Capacity of Bone Marrow–Derived Mononuclear Cells Used for Cardiovascular Repair. *Circ Res* **2012**, *111* (7), 854–862. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.265678>.
- (232) Moschetta, M.; Mishima, Y.; Sahin, I.; Manier, S.; Glavey, S.; Vacca, A.; Roccaro, A. M.; Ghobrial, I. M. Role of Endothelial Progenitor Cells in Cancer Progression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **2014**, *1846* (1), 26–39. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2014.03.005>.
- (233) Rajkumar, S. V.; Mesa, R. A.; Fonseca, R.; Schroeder, G.; Plevak, M. F.; Dispenzieri, A.; Lacy, M. Q.; Lust, J. A.; Witzig, T. E.; Gertz, M. A.; Kyle, R. A.; Russell, S. J.; Greipp, P. R. Bone Marrow Angiogenesis in 400 Patients with Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance, Multiple Myeloma, and Primary Amyloidosis. *Clinical Cancer Research* **8**.
- (234) Bhaskar, A.; Gupta, R.; Kumar, L.; Sharma, A.; Sharma, M. C.; Kalaivani, M.; Thakur, S. C. Circulating Endothelial Progenitor Cells as Potential Prognostic Biomarker in Multiple Myeloma. *Leukemia & Lymphoma* **2012**, *53* (4), 635–640. <https://doi.org/10.3109/10428194.2011.628880>.
- (235) Raimondo, F. D.; Azzaro, M. P.; Palumbo, G. A.; Bagnato, S.; Giustolisi, G.; Florida, P. M.; Sortino, G.; Giustolisi, R. Angiogenic Factors in Multiple Myeloma: Higher Levels in Bone Marrow than in Peripheral Blood. *Haematologica* **2000**, *85*, 6.
- (236) Moschetta, M.; Mishima, Y.; Kawano, Y.; Manier, S.; Paiva, B.; Palomera, L.; Aljawai, Y.; Calcinotto, A.; Unitt, C.; Sahin, I.; Sacco, A.; Glavey, S.; Shi, J.; Reagan, M. R.; Prosper, F.; Bellone, M.; Chesi, M.; Bergsagel, L. P.; Vacca, A.; Roccaro, A. M.; Ghobrial, I. M. Targeting Vasculogenesis to Prevent Progression in Multiple Myeloma. *Leukemia* **2016**, *30* (5), 1103–1115. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.3>.
- (237) Oswald, J.; Boxberger, S.; Jørgensen, B.; Feldmann, S.; Ehninger, G.; Bornhäuser, M.; Werner, C. Mesenchymal Stem Cells Can Be Differentiated Into Endothelial Cells In

- Vitro: Mesenchymal Stem Cells Can Be Differentiated Into Endothelial Cells In Vitro. *STEM CELLS* **2004**, 22 (3), 377–384. <https://doi.org/10.1634/stemcells.22-3-377>.
- (238) Wang, X.; Zhang, Z.; Yao, C. Angiogenic Activity of Mesenchymal Stem Cells in Multiple Myeloma. *Cancer Investigation* **2011**, 29 (1), 37–41. <https://doi.org/10.3109/07357907.2010.496758>.
- (239) Hamrick, M. W.; Pennington, C.; Newton, D.; Xie, D.; Isales, C. Leptin Deficiency Produces Contrasting Phenotypes in Bones of the Limb and Spine. *Bone* **2004**, 34 (3), 376–383. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2003.11.020>.
- (240) Hamrick, M. W.; Della-Fera, M. A.; Choi, Y.-H.; Pennington, C.; Hartzell, D.; Baile, C. A. Leptin Treatment Induces Loss of Bone Marrow Adipocytes and Increases Bone Formation in Leptin-Deficient Ob/Ob Mice. *J Bone Miner Res* **2005**, 20 (6), 994–1001. <https://doi.org/10.1359/JBMR.050103>.
- (241) Miggitsch, C.; Meryk, A.; Naismith, E.; Pangrazzi, L.; Ejaz, A.; Jenewein, B.; Wagner, S.; Nägele, F.; Fenkart, G.; Trieb, K.; Zwerschke, W.; Grubeck-Loebenstien, B. Human Bone Marrow Adipocytes Display Distinct Immune Regulatory Properties. *EBioMedicine* **2019**, 46, 387–398. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.07.023>.
- (242) Martinet, L.; Fleury-Cappellesso, S.; Gadelorge, M.; Dietrich, G.; Bourin, P.; Fournié, J.-J.; Poupot, R. A Regulatory Cross-Talk between V γ 9V δ 2 T Lymphocytes and Mesenchymal Stem Cells: Immunomodulation. *European Journal of Immunology* **2009**, 39 (3), 752–762. <https://doi.org/10.1002/eji.200838812>.
- (243) Kim, C.; Bhatta, S.; Cyprien, L.; Fonseca, R.; Hernandez, R. K. Incidence of Skeletal-Related Events among Multiple Myeloma Patients in the United States at Oncology Clinics: Observations from Real-World Data. *Journal of Bone Oncology* **2019**, 14, 100215. <https://doi.org/10.1016/j.jbo.2018.100215>.
- (244) Rajkumar, S. V.; Kumar, S. Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings* **2016**, 91 (1), 101–119. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2015.11.007>.
- (245) Zhang, L.; Fok, J. H. L.; Davies, F. E. Heat Shock Proteins in Multiple Myeloma. *Oncotarget* **2014**, 5 (5). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1584>.
- (246) Bailey, C. K.; Budina-Kolomets, A.; Murphy, M. E.; Nefedova, Y. Efficacy of the HSP70 Inhibitor PET-16 in Multiple Myeloma. *Cancer Biology & Therapy* **2015**, 16 (9), 1422–1426. <https://doi.org/10.1080/15384047.2015.1071743>.
- (247) Nimmanapalli, R.; Gerbino, E.; Dalton, W. S.; Gandhi, V.; Alsina, M. HSP70 Inhibition Reverses Cell Adhesion Mediated and Acquired Drug Resistance in Multiple Myeloma: HSP70 Inhibition Reverses Drug Resistance in Multiple Myeloma. *British Journal of Haematology* **2008**, 142 (4), 551–561. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07217.x>.
- (248) Asea, A.; Rehli, M.; Kabingu, E.; Boch, J. A.; Baré, O.; Auron, P. E.; Stevenson, M. A.; Calderwood, S. K. Novel Signal Transduction Pathway Utilized by Extracellular HSP70: ROLE OF Toll-LIKE RECEPTOR (TLR) 2 AND TLR4. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277 (17), 15028–15034. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200497200>.

- (249) Johnson, G. B.; Brunn, G. J.; Kodaira, Y.; Platt, J. L. Receptor-Mediated Monitoring of Tissue Well-Being Via Detection of Soluble Heparan Sulfate by Toll-Like Receptor 4. *J Immunol* **2002**, *168* (10), 5233–5239. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.10.5233>.
- (250) Hideshima, T.; Mitsiades, C.; Tonon, G.; Richardson, P. G.; Anderson, K. C. Understanding Multiple Myeloma Pathogenesis in the Bone Marrow to Identify New Therapeutic Targets. *Nat Rev Cancer* **2007**, *7* (8), 585–598. <https://doi.org/10.1038/nrc2189>.
- (251) Morgan, J. J.; McAvera, R. M.; Crawford, L. J. TRAF6 Silencing Attenuates Multiple Myeloma Cell Adhesion to Bone Marrow Stromal Cells. *IJMS* **2019**, *20* (3), 702. <https://doi.org/10.3390/ijms20030702>.
- (252) André, T.; Najjar, M.; Stamatopoulos, B.; Pieters, K.; Pradier, O.; Bron, D.; Meuleman, N.; Lagneaux, L. Immune Impairments in Multiple Myeloma Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells. *Cancer Immunol Immunother* **2015**, *64* (2), 213–224. <https://doi.org/10.1007/s00262-014-1623-y>.
- (253) Takatsu, K. Cytokines Involved in B-Cell Differentiation and Their Sites of Action. *Experimental Biology and Medicine* **1997**, *215* (2), 121–133. <https://doi.org/10.3181/00379727-215-44119>.
- (254) Gupta, D.; Treon, S.; Shima, Y.; Hideshima, T.; Podar, K.; Tai, Y.; Lin, B.; Lentzsch, S.; Davies, F.; Chauhan, D.; Schlossman, R.; Richardson, P.; Ralph, P.; Wu, L.; Payvandi, F.; Muller, G.; Stirling, D.; Anderson, K. Adherence of Multiple Myeloma Cells to Bone Marrow Stromal Cells Upregulates Vascular Endothelial Growth Factor Secretion: Therapeutic Applications. *Leukemia* **2001**, *15* (12), 1950–1961. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402295>.
- (255) Rosean, T. R.; Tompkins, V. S.; Tricot, G.; Holman, C. J.; Olivier, A. K.; Zhan, F.; Janz, S. Preclinical Validation of Interleukin 6 as a Therapeutic Target in Multiple Myeloma. *Immunol Res* **2014**, *59* (1–3), 188–202. <https://doi.org/10.1007/s12026-014-8528-x>.
- (256) Frassanito, M. A.; Cusmai, A.; Iodice, G.; Dammacco, F. Autocrine Interleukin-6 Production and Highly Malignant Multiple Myeloma: Relation with Resistance to Drug-Induced Apoptosis. *Blood* **2001**, *97* (2), 483–489. <https://doi.org/10.1182/blood.V97.2.483>.
- (257) Chesi, M.; Matthews, G. M.; Garbitt, V. M.; Palmer, S. E.; Shortt, J.; Lefebure, M.; Stewart, A. K.; Johnstone, R. W.; Bergsagel, P. L. Drug Response in a Genetically Engineered Mouse Model of Multiple Myeloma Is Predictive of Clinical Efficacy. *Blood* **2012**, *120* (2), 376–385. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-02-412783>.
- (258) Chesi, M.; Robbiani, D. F.; Sebag, M.; Chng, W. J.; Affer, M.; Tiedemann, R.; Valdez, R.; Palmer, S. E.; Haas, S. S.; Stewart, A. K.; Fonseca, R.; Kremer, R.; Cattoretto, G.; Bergsagel, P. L. AID-Dependent Activation of a MYC Transgene Induces Multiple Myeloma in a Conditional Mouse Model of Post-Germinal Center Malignancies. *Cancer Cell* **2008**, *13* (2), 167–180. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.01.007>.
- (259) Rossi, M.; Botta, C.; Arbitrio, M.; Grembiale, R. D.; Tagliaferri, P.; Tassone, P. Mouse Models of Multiple Myeloma: Technologic Platforms and Perspectives. *Oncotarget* **2018**, *9* (28). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24614>.

- (260) Yan, H.; Wu, M.; Yuan, Y.; Wang, Z. Z.; Jiang, H.; Chen, T. Priming of Toll-like Receptor 4 Pathway in Mesenchymal Stem Cells Increases Expression of B Cell Activating Factor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2014**, *448* (2), 212–217. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.04.097>.
- (261) Giallongo, C.; Tibullo, D.; Camiolo, G.; Parrinello, N. L.; Romano, A.; Puglisi, F.; Barbato, A.; Conticello, C.; Lupo, G.; Anfuso, C. D.; Lazzarino, G.; Li Volti, G.; Palumbo, G. A.; Di Raimondo, F. TLR4 Signaling Drives Mesenchymal Stromal Cells Commitment to Promote Tumor Microenvironment Transformation in Multiple Myeloma. *Cell Death Dis* **2019**, *10* (10), 704. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1959-5>.
- (262) Vaure, C.; Liu, Y. A Comparative Review of Toll-Like Receptor 4 Expression and Functionality in Different Animal Species. *Frontiers in Immunology* **2014**, *5*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00316>.
- (263) Jones, E.; English, A.; Churchman, S.; Kouroupis, D.; Boxall, S.; Kinsey, S.; Giannoudis, P.; Emery, P.; McGonagle, D. Large-Scale Extraction and Characterisation of CD271⁺ Multipotential Stromal Cells (MSCs) from Trabecular Bone in Health and Osteoarthritis: Implications for Bone Regeneration Strategies Based on Minimally-Cultured MSCs. *Arthritis Rheum* **2010**, NA-NA. <https://doi.org/10.1002/art.27451>.
- (264) McGonagle, D.; Baboolal, T. G.; Jones, E. Native Joint-Resident Mesenchymal Stem Cells for Cartilage Repair in Osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* **2017**, *13* (12), 719–730. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2017.182>.
- (265) Rasche, L.; Chavan, S. S.; Stephens, O. W.; Patel, P. H.; Tytarenko, R.; Ashby, C.; Bauer, M.; Stein, C.; Deshpande, S.; Wardell, C.; Buzder, T.; Molnar, G.; Zangari, M.; van Rhee, F.; Thanendrarajan, S.; Schinke, C.; Epstein, J.; Davies, F. E.; Walker, B. A.; Meissner, T.; Barlogie, B.; Morgan, G. J.; Weinhold, N. Spatial Genomic Heterogeneity in Multiple Myeloma Revealed by Multi-Region Sequencing. *Nat Commun* **2017**, *8* (1), 268. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00296-y>.