

L'inhibition HDAC induite par le valproate améliore la cytotoxicité directe des monocytes contre les cellules de mésothéliome pleural malin

Clotilde Hoyos

Promoteur : Luc Willems

2022

COMMUNAUTÉ FRANÇAISE DE BELGIQUE
UNIVERSITÉ DE LIÈGE - GEMBLoux AGRO-BIO TECH

**L'inhibition HDAC induite par le valproate améliore la
cytotoxicité directe des monocytes contre les cellules de
mésothéliome pleural malin**

Hoyos Clotilde

Dissertation originale présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en sciences
agronomiques et ingénierie biologique.

Promoteur : Luc Willems

Année civile : 2022

© Hoyos Clotilde, March 2022
Toute reproduction du présent document, par quelque
procédé que ce soit, ne peut être réalisée qu'avec
l'autorisation de l'auteur et de l'autorité académique de
l'Université de Liège - Faculté Gembloux Agro-Bio Tech.
Le présent document n'engage que son auteur.

Résumé

Le mésothéliome pleural malin (MPM) est un cancer rare qui affecte les cellules mésothéliales de la plèvre. Actuellement, le MPM est incurable et les traitements ne permettent d'allonger la survie des patients que de quelques mois. Les monocytes sont des cellules de l'immunité innée qui constituent une première ligne de défense contre les cellules tumorales. Dans le MPM, les monocytes exercent des fonctions immunosuppressives par l'intermédiaire des macrophages associés aux tumeurs (TAMs) et des cellules myéloïdes suppressives monocytaires (M-MDSCs). Leur présence est associée à un mauvais pronostic chez les patients atteints de MPM. Malgré leurs fonctions immunosuppressives, les monocytes sont également capables d'exercer des fonctions antitumorales via la phagocytose, la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps et la production de cytokines et de substances réactives. Les objectifs de cette thèse consistent, d'une part, à étudier l'activité cytotoxique directe des monocytes envers les cellules de MPM et, d'autre part, à moduler cette activité cytotoxique par l'intermédiaire de régulateurs épigénétiques. Les résultats montrent que les monocytes exercent une activité cytotoxique directe envers les cellules de mésothéliome. De plus, le traitement au valproate (VPA), un inhibiteur d'histones déacétylases, augmente significativement la migration des monocytes, leur agrégation sur les cellules de MPM et leur activité cytotoxique contre les cellules tumorales. Finalement, les mécanismes moléculaires du VPA impliquent une sous-régulation des récepteurs membranaires associés au phénotype M2 des macrophages, incluant le CD163, CD206 et CD209. Le traitement des monocytes au VPA pourrait, dès lors, être exploité comme nouvelle approche en vue d'améliorer la thérapie du MPM.

Abstract

Malignant pleural mesothelioma (MPM) is a rare cancer affecting mesothelial cells in the pleura. MPM is incurable and treatments only prolong patient's survival by a few months. Monocytes are innate immunity cells that constitute the first line of defence against tumor cells. In MPM, monocytes exert immunosuppressive functions through the tumor-associated macrophages (TAMs) and the monocyte myeloid-derived suppressor cells (M-MDSCs). Their presence is associated to a bad prognosis in MPM patients. Despite their immunosuppressive functions, monocytes are also able to exert antitumor functions through phagocytosis, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, cytokine and reactive substance production. The objectives of the thesis consist, on one side, to study the cytotoxic activity of monocytes against MPM cells and, on the other side, to modulate this activity by means of epigenetic regulators. Results show that monocytes exert a cytotoxic activity against MPM cells. In addition, monocyte treatment with VPA, a histone deacetylase inhibitor, significantly increases monocyte migration, their aggregation to tumor cells and their cytotoxicity against MPM cells. Finally, the molecular mechanisms of VPA involve a downregulation of the membrane receptors associated with the M2 phenotype, including CD163, CD206 and CD209. Monocyte treatment with VPA may thus be explored as a novel approach to improve MPM therapy.

Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de cette thèse.

Tout d'abord, je tiens à remercier le Professeur Luc Willems de m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein de son laboratoire. Nous savons tous les deux à quel point j'ai dû mûrir ma décision avant de me lancer dans cette thèse. Je te remercie d'avoir cru en moi et de m'avoir conseillé à me lancer. Merci pour ton soutien, tes échanges, ta disponibilité et tes conseils tout au long de cette thèse.

Je remercie le Professeur Burny, la Professeure Vandebol et Michèle pour leur présence, leur bienveillance, leur écoute et leurs nombreux conseils. Merci à Monsieur Burny d'avoir relu ma thèse. Merci à Madame Vandebol d'avoir financé la réparation du cytomètre en flux, qui fut un véritable soulagement dans ma thèse.

Merci à la plateforme d'imagerie de m'avoir apporté le support technique nécessaire à l'élaboration de nombreuses expériences. Merci à Alexandre Hego pour tes conseils en Imagerie. Merci à Rafaat Stephan et Céline Vanwinge pour les nombreuses heures passées au tri cellulaire.

Je remercie le service du MIPI de m'avoir laissé utiliser leur microscope fluorescent et, plus particulièrement, merci à Mathéo de m'avoir aidée à l'utiliser.

Merci à Lorenzo Canti, Margaux Lejeune et Caroline Ritacco pour leur soutien et leurs nombreux conseils concernant des protocoles difficiles.

Merci à Malik Hamaidia pour ton support dans cette thèse et tes conseils expérimentaux. Thanks to Majeed Jamakhani for your management in the analysis of the RNA sequencing.

Je tiens également à remercier Rugi Safari, Hélène Gazon et Alix de Brogniez qui ont toujours été une source d'inspiration dans ma thèse et une écoute dans les moments difficiles.

Merci à Jean-Rock pour ces moments mémorables passés ensemble à Gembloux. Ton écoute et ton soutien m'ont également aidée à réaliser ma thèse.

Merci à tous les doctorants (Bernard, Florent, Hélène, Mégane, Thomas, Alexis, Aurélie et Mélanie) pour l'ambiance qu'ils ont amenée au sein du laboratoire. Merci pour leur écoute et leur soutien. Hélène et Mégane, j'aurais tellement voulu partir avec vous en Australie. Je ne doute pas que ce voyage aurait été extraordinaire. Hélène, je tiens à te remercier du fond du cœur pour ton écoute et tes encouragements au cours de cette

thèse. Alexis, je tiens également à te remercier pour ton support, ton esprit scientifique et ton assiduité qui m'ont énormément aidée ainsi qu'inspirée dans ma thèse.

Merci à Emily Claereboudt, Manon Genva et Chloë Maes qui m'ont apporté de l'aide dans l'écriture de ma thèse.

Merci à mes amis rencontrés à l'université (Emily, Mickey, Clément, Morgane, Davy, Mélanie, Pauline, Céline, Chloë, et bien d'autres) qui m'ont soutenue tout le long de mes études et sans qui mes années de doctorat n'auraient pas été les mêmes.

Merci à mes amis d'enfance (Hélène, Marine, Raluca, Timour, Romuald, Jean, Maryline, Charlie, Lynn, Juliette et bien d'autres) qui m'ont toujours soutenue et qui ont rendu cette aventure encore plus agréable.

Un tout grand merci à ma famille qui a toujours été là pour moi. Merci d'avoir cru en moi depuis le début et de m'avoir poussée à me surpasser. Merci pour vos précieux conseils.

Merci à Frank qui a enrichi ma vie. Merci pour tes nombreux conseils et ton soutien dans cette thèse.

Merci à Loïc, Lucas, Béatrice et Ghislain pour leur soutien, leur gentillesse et leur patience.

Table des matières

<i>Résumé</i>	3
<i>Abstract</i>	4
<i>Remerciements</i>	5
<i>Table des matières</i>	7
<i>Liste des figures</i>	9
<i>Liste des tableaux</i>	15
<i>Liste des abréviations</i>	16
Chapitre 1 – Introduction générale	29
1. Le mésothéliome pleural malin	31
1.1. Histologie de la plèvre	31
1.2. MPM et ses sous-types histologiques	32
1.3. Epidémiologie du MPM.....	33
1.4. Etiologie du MPM.....	35
1.5. Tumorigenèse du MPM.....	38
1.6. Profilage moléculaire du MPM	39
1.7. Microenvironnement du MPM.....	40
1.8. Diagnostic et traitements du MPM.....	45
2. Les monocytes	50
2.1. Développement des monocytes.....	50
2.2. Hétérogénéité phénotypique.....	52
2.3. Fonctions des monocytes.....	55
2.4. Monocytes dans le MPM.....	62
3. Epigénétique	64
3.1. Généralités	64
3.2. Méthylation de l'ADN	65
3.3. Méthylation des histones.....	68
3.4. Acétylation des histones.....	70
Chapitre 2 – Objectif de la thèse	77
Chapitre 3 - Résultats	83

- 1. Les thérapies du MPM affectent le nombre de monocytes circulants dans le sang 85
- 2. HDAC inhibition with valproate improves direct cytotoxicity of monocytes against mesothelioma tumor cells 86
 - 2.1. Préambule 86
 - 2.2. HDAC inhibition with valproate improves direct cytotoxicity of monocytes against mesothelioma tumor cells 87

Chapitre 4 – Discussion générale, perspectives et conclusion 117

- 1. Les monocytes exercent une activité cytotoxique contre les cellules de MPM 120
 - 1.1. Les monocytes sont capables d'exercer une activité antitumorale 123
 - 1.2. L'activité cytotoxique augmente avec le ratio (monocytes/cellules tumorales) 123
 - 1.3. L'influence des sous-populations de monocytes dans l'activité cytotoxique 124
 - 1.4. Une stimulation préalable des monocytes augmente l'activité cytotoxique 124
 - 1.5. Mécanismes impliqués dans l'activité cytotoxique des monocytes 124
- 2. La différenciation des monocytes THP-1 en macrophages augmente l'activité cytotoxique 126
- 3. L'EPZ n'influence pas l'activité cytotoxique des monocytes THP-1... 127
- 4. Le valproate augmente l'activité cytotoxique des monocytes 128
- 5. Conclusion 132

Liste des publications scientifiques 135

Chapitre 5 - Bibliographie 139

Liste des figures

- Figure 1. Illustration des différents types de mésothéliome. Le mésothéliome pleural malin (MPM) se développe au départ de la plèvre et représente 80 à 90% des cas de mésothéliome. Les mésothéliomes du péritoine, du péricarde et de la tunique vaginale sont plus rares (Janes et al., 2021). 31
- Figure 2. Représentation de la structure de la plèvre. La plèvre est une membrane séreuse qui recouvre la surface interne de la cavité thoracique et qui est formée par des cellules mésothéliales (m). La plèvre est constituée de deux feuillets : le feuillet viscéral (VP) et le feuillet pariétal (PP). Les deux feuillets sont séparés par un espace appelé espace pleural (PE). Du liquide pleural (pf) est constamment produit et renouvelé en sortant par les stomates (S) présents sur la plèvre pariétale. Des macrophages pleuraux (PM) sont présents dans l'espace pleural (Donaldson et al., 2010). 32
- Figure 3. Incidence du MPM à travers le monde selon le sexe. A. Taux d'incidence du MPM standardisé en fonction de l'âge chez les hommes. B. Taux d'incidence du MPM standardisé en fonction de l'âge chez les femmes (Globocan, 2020). 34
- Figure 4. Fibres d'amiante observées par microscope électronique. Les chrysotiles font partie de la famille des serpentines. Les fibres des chrysotiles sont courtes et frisées. Les crocidolites font partie de la famille des amphiboles avec l'amosite, la trémolite, l'actinolite et l'anthophyllite. Les fibres des amphiboles sont longues et droites (Toyokuni, 2014; Bignold, 2015). 36
- Figure 5. Schéma illustrant la voie prise par les particules d'amiante pour atteindre la plèvre. A. Après leur inhalation, les fibres d'amiante migrent le long de la cavité nasale, de la trachée et des poumons avant d'atteindre la plèvre. B. Phagocytose frustrée observée au microscope électronique. Les fibres d'amiante de grande taille (>20 µm) et de petit diamètre (<250 nm) ne peuvent pas être entièrement incorporées par les macrophages générant une phagocytose frustrée (Pass et al., 2005; Toyokuni, 2014). 39
- Figure 6. Illustration de l'infiltration immunitaire dans le microenvironnement du MPM. Le MPM est caractérisé par une hétérogénéité spatiale présentant un continuum de profils tumoraux dits « chaud » et « froid », défini par une infiltration lymphocytaire élevée ou faible. L'infiltration immunitaire du MPM inclut des macrophages, des lymphocytes T (épuisés ou non), des lymphocytes B, des cellules tueuses naturelles (NKs), des mastocytes, les cellules myéloïdes suppressives (MDSCs) et des cellules dendritiques (DCs) (Minnema-Luiting et al., 2018; Brossel et al., 2021). 41
- Figure 7. Lymphocytes T épuisés. Dans le MPM, les lymphocytes T deviennent « épuisés » en raison de la surstimulation du récepteur TCR avec le CMH-I ainsi que via l'interaction des récepteurs co-inhibiteurs dont le CTLA-4 et PD-1. Cet état d'épuisement est caractérisé par une perte progressive des fonctions effectrices des lymphocytes T (Brossel et al., 2021). 44
- Figure 8. Développement des monocytes. Les HSCs se différencient en une série de progéniteurs : CMP, GMP, MDP et cMoP pour finalement donner les monocytes (Kurotaki et al., 2017). 51
- Figure 9. Sous-populations des monocytes et plasticité phénotypique. Les monocytes classiques proviennent directement des cMoPs alors que les monocytes non-classiques proviennent des cMoPs ainsi que des monocytes classiques. Les monocytes classiques sont dépendants du CCL2 pour atteindre le sang. Les monocytes peuvent ensuite rejoindre les tissus et se différencier en macrophages et en cellules dendritiques (Ginhoux and Jung, 2014). 54
- Figure 10. Etapes de la phagocytose. La reconnaissance de l'antigène, de manière directe (phagocytose non opsonine) ou indirecte via des opsonines (phagocytose opsonine), induit la formation de pseudopode

qui internalise l'agent pathogène amenant à la formation d'un phagosome. Le phagosome se lie à un lysosome qui dégrade l'agent pathogène (Flannagan et al., 2012).....56

Figure 11. Présentation d'antigènes. Les monocytes présentent l'antigène aux lymphocytes T via CMH-I. Afin d'induire l'activation, l'expansion clonale et l'acquisition des fonctions effectrices des lymphocytes, la présentation d'antigènes doit se dérouler selon trois signaux. Le signal 1 implique l'interaction du TCR avec le complexe CMH-I-peptide, le signal 2 est basé sur l'interaction du CD80/CD86 avec le récepteur CD28 et finalement le signal 3 nécessite la production de médiateurs tels que l'IL-27 par la CPA. L'absence de signal 3 empêche l'acquisition des fonctions effectrices des lymphocytes T (Jakubzick et al., 2013, 2017).....58

Figure 12. Production de ROS et RNS par les monocytes. Les ROS sont produits via l'activité de la NADPH oxydase alors que la production de RNS est dépendante de iNOS. Le NO peut ultérieurement réagir avec l'anion superoxyde pour former le peroxydrite (Fang, 2004)..... 61

Figure 13. ADCC chez les monocytes. Au moyen des récepteurs de Fc, les monocytes reconnaissent les anticorps associés à un antigène présent sur la cellule cible et la lyse en sécrétant du TNF- α et des granzymes B (Stein et al., 2012; Elavazhagan et al., 2015; Yeap et al., 2016). 62

Figure 14. Monocytes dans le MPM et leur recrutement. Les monocytes classiques sont principalement recrutés via l'axe CCR2/CCL2 afin de rejoindre l'environnement tumoral. L'environnement tumoral induit leur différenciation en macrophages (TAMs), en DCs inflammatoires et en MDSCs (Olingy et al., 2019). 63

Figure 15. Organisation de la chromatine. La chromatine est enroulée autour d'un octamère d'histones formé par deux exemplaires des histones H2A, H2B, H3 et H4, le tout formant un nucléosome. Les histones sont des protéines qui possèdent un domaine globulaire carboxy-terminal, formant le nucléosome, et une queue amino-terminale présente à la surface du nucléosome (Gräff and Mansuy, 2008). 65

Figure 16. Implication de la méthylation de l'ADN dans la différenciation des cellules immunitaires. A. La différenciation des monocytes en macrophages et en DCs est majoritairement menée par une perte de méthylation de l'ADN. B. Les enzymes DNMT1 et DNMT3B sont également impliquées dans la polarisation en macrophages M1 (Álvarez-Errico et al., 2015; de Groot and Pienta, 2018). 66

Figure 17. Inhibiteurs nucléosidiques de DNMTs. L'azacytidine, la décitabine et la zébularine correspondent à des analogues de la cytidine (Gnyszka et al., 2013)..... 67

Figure 18. Implication de la méthylation des histones dans la différenciation des macrophages. JMJD3 est impliqué dans la polarisation des macrophages en M2. EZH2 limite la polarisation des macrophages en M1 (de Groot and Pienta, 2018). 69

Figure 19. Implication de l'acétylation des histones dans la polarisation des macrophages. La contribution des HDACs dans la polarisation des macrophages est complexe. Certaines HDACs sont aussi bien impliquées dans la polarisation M1 que M2. De plus, elles sont également impliquées dans la surrégulation que la sous-régulation du phénotype M1 (de Groot and Pienta, 2018). 71

Figure 20. Famille des inhibiteurs d'HDAC. Les inhibiteurs d'HDAC sont composés de quatre familles qui incluent, les hydroxamates, représentant la plus grosse famille, les peptides cycliques, les benzamides et les acides aliphatiques (Kim and Bae, 2011). 72

Figure 21. Effet de la thérapie sur la valeur absolue des monocytes avant et après chimiothérapie de première ligne ou immunothérapie. Les données cliniques ont été collectées à partir du registre de données des patients du Département of Pneumology and Thoracic Oncology au CHU de Lille, France. A. Le nombre absolu de monocytes ($10^9/L$ de sang) a été mesuré avant et après une chimiothérapie de première intention

(cisplatine/ carboplatine + pemetrexed). Les données sont présentées sous forme : moyenne + écart type. Les moyennes ont été comparées via un test de student pairé. B. Le nombre absolu de monocytes ($10^9/L$ de sang) a été mesuré avant et après une immunothérapie (nivolumab + ipilimumab). Les données sont présentées sous forme : moyenne + écart type. Les moyennes ont été comparées via un test de student pairé.

..... 85

Figure 22. Direct cytotoxicity of THP-1 monocytes in contact with mesothelioma M14K cells. (A) Experimental design. THP-1 monocytes were treated with 16.2 μ M of PMA, 2.5 mM of VPA, or 10 μ M of EPZ005687 (EPZ) for 48 h. After washing the medium, THP-1 monocytes were cocultured with CFSE-labeled M14K cells at 1/1 (Incucyte) and 10/1 (Flow cytometry) ratios during 24 or 48 h. Apoptosis of M14K cells was evaluated by Incucyte S3 time-lapse microscopy and flow cytometry. (B,C) Untreated monocytes (Mock) and M14K cells were cocultured in the presence of annexin V-APC (B) or propidium iodide (C) and recorded by time lapse microscopy (Incucyte) for 24 h. (D) The percentage of annexin V positive CFSE-labeled M14K cells was calculated based on Incucyte imaging data. (E) The percentage of propidium iodide positive CFSE-labeled M14K was deduced from Incucyte imaging data. Data (D,E) are means of eight independent experiments. Statistical significance was evaluated using a one-way ANOVA test with Tukey's multiple comparison test. (F) After 48 h of coculture, cells were labeled with annexin V-APC and analyzed by flow cytometry. Apoptosis of M14K cells (%) was determined based on the double positive CFSE and annexin V labeling. Data are expressed as means of four independent experiments \pm standard deviations. Statistical significance was evaluated using a one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test. (G,H) THP-1 monocytes were labeled with anti-acetylated lysine (G) or anti-H3K27me3 (H) primary antibodies followed by Alexa Fluor 488 conjugate. The cells were stained with DAPI and mounted on slides prior to fluorescent microscopy. The graphs of relative mean fluorescence intensities (rMFI) were obtained by flow cytometry after acetylated lysine and H3K27me3 labeling and Draq5 staining. (I) Representative Incucyte images are shown. (J) Motility of THP-1 monocytes was determined with the CellTracker software using Incucyte images. (K,L) Based on CellTracker data, total migration (K) and average speed (L) of the THP-1 monocytes were determined for 10 cells per condition in triplicate. Data are presented as the means (\pm standard deviations) of four independent experiments. The statistical significance was evaluated with non-parametric Kruskal-Wallis followed by a Dunn's multiple comparison test. 97

Figure 23. Cell-to-cell contact between blood-derived monocytes and M14K cells. (A) PBMCs were isolated from buffy coats of healthy donors by Ficoll gradient centrifugation. After labeling with CD3-PE, CD19-PECy5, and CD56-BV421 antibodies, monocytes were negatively sorted by flow cytometry. (B) Flow cytometry analysis of PBMCs and sorted monocytes labeled with CD3-PE, CD19-PECy5, and CD56-BV421 antibodies. The graph represents the percentages of labeled events before (PBMCs) and after cell sorting (Sorted Monocytes). (C) Isolated monocytes were labeled with anti-CD14-PE and anti-CD16-FITC. Representative plots are shown. (D) M14K cells were labeled with CFSE, incubated for 4 h, and then cocultured with freshly isolated monocytes at a ratio of 4/1. After 24 h of culture on coverslips, cells were labeled with an anti-CD33 primary antibody followed by an Alexa Fluor 647 conjugate. Cells were further fixed with PFA 4%, stained with DAPI, and analyzed with a HR confocal microscope. Images were computed with Imaris. Representative interactions between CFSE-positive M14K cells (in green) and CD33-labeled monocytes (in red) are shown. Nuclei fragmentation is revealed by DAPI staining (in blue). 99

Figure 24. Effect of VPA on primary monocyte migration and cytotoxicity. (A,B) Blood-derived monocytes (Mock) were cocultured with CFSE-labeled M14K cells at a 20/1 ratio. Representative Incucyte kinetics upon labeling with annexin V-APC (A) or propidium iodide (B). (C,D) Single-cell imaging data from nine independent experiments were recorded by Incucyte. The graphs represent the mean percentages of CFSE-labeled M14K cells staining for annexin V (C) or propidium iodide (D). Statistical significance was evaluated using a one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test. (E) After 24 h of coculture, cells were stained with annexin V-APC and analyzed by flow cytometry. Mean (\pm standard deviation) percentages of CFSE-positive M14K cells labeled with annexin V were deduced from seven independent experiments. Statistical significance was evaluated using one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test. (F) Based on Incucyte images, cell motility of 10 monocytes per condition performed in triplicate was determined with the CellTracker software. Total migration (G) and average speed (H) data are the means (\pm standard deviations) of four independent experiments. The statistical significance was evaluated with non-parametric Kruskal–Wallis followed by a Dunn's multiple comparison test. (I) Representative Incucyte images of clusters formed by monocytes and CFSE-labeled M14K cells in the presence of mock or VPA. (J) Using ImageJ, the mean area of 10 clusters formed by M14K cells alone or in interaction with one or several monocytes was measured in triplicate at 0, 12, and 24 h. Data are the means (\pm standard deviations) of seven independent experiments. The statistical significance was evaluated with a two-way ANOVA followed by a Tukey's multiple comparison test. 101

Figure 25. Transcriptomic profile of VPA-treated monocytes after cocultivation with MPM cells. (A) Experimental design. Blood-derived monocytes (D0) were cocultured with CFSE-labeled M14K cells in the absence (D1) or presence of VPA (2 mM) (D1+VPA) for 24 h. After coculture, monocytes were isolated using a flow cytometry cell sorter. The experiment was performed independently with monocytes isolated from 3 different healthy donors. After extraction of ribonucleic acids, mRNA was purified, converted to cDNA libraries, and sequenced with a Novaseq 6000 device. (B) Volcano plot of differentially expressed genes between D1 and D0 conditions with Log₂(Fold Change) threshold: 1, p-adj threshold: 0.05, shrinkage method: ash. (C) Volcano plot of differentially expressed genes between D1+VPA and D0 conditions with Log₂(Fold Change) threshold: 1 and p-adj threshold: 0.05, shrinkage method: ash. (D) Heatmap of the most significant DEGs deduced from 3 independent donors in the conditions D1+VPA and D0. The color key represents the Log₂(read count) (DEGs) from low (blue) to high (red). (E) Representative chord diagram of the 10 most significant pathways from GO: Molecular Functions (GO:MF) between the conditions D1+VPA and D0. The chords show a detailed relationship between Log₂(Fold Change) of DEGs (left semicircle) and their enriched GO:MF pathways (right semicircle). The color key represents the Log₂(Fold Change) from low (blue) to high (red). The GO enrichment analysis was performed by considering all significant genes (p-adj < 0.05). (F) Log₂(Fold Change) of selected membrane receptors between the conditions D1+VPA and D0. 104

Figures supplémentaires

Fig S 1. Dose-response of VPA and EPZ on metabolic activity of THP-1 and M14K cells. THP-1 (A) and M14K cells (B) were cultured with increasing concentrations of VPA (0, 0.31, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 and 20 mM). THP-1 (C) and M14K cells (D) were incubated with increasing concentrations of EPZ (0, 1, 5, 10, 50 and 100 μ M). After 48 hours, activity of NAD(P)H-dependent dehydrogenases was measured using the MTS assay. Treatment of cells with DMSO (10%) was used as positive control. Data are presented as the means of three independent experiments \pm standard deviations. Statistical significance was evaluated using a one-way ANOVA test with Dunnett's multiple comparison test. 109

Fig S 2. Direct cytotoxicity of THP-1 in contact with mesothelioma ZL34 cells measured by flow cytometry. THP-1 cells were cultured in presence of 16.2 μ M of PMA or 2.5 mM of VPA during 48 hours. After washing the medium, THP-1 were cocultured with CFSE-labeled ZL34 cells at a 10/1 ratio during 48 hours. Annexin V⁺ ZL34 cells were counted by flow cytometry. Data (%) are presented as the means of three independent experiments \pm standard deviations. Statistical significance was evaluated using a one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test. 110

Fig S 3. Direct cytotoxicity of THP-1 in contact with mesothelioma ZL34 cells analyzed by Incucyte. THP-1 cells were cultured in presence of 16.2 μ M of PMA, 2.5 mM of VPA or 10 μ M of EPZ during 48 hours. After washing the medium, THP-1 were cocultured with CFSE-labeled ZL34 cells at a 1/1 ratio during 24 hours. The percentage of annexin V positive CFSE-labeled ZL34 cells was calculated based on Incucyte imaging data. Data (%) are presented as the means of three independent experiments \pm standard deviations. Statistical significance was evaluated using a one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test. 110

Fig S 4. Effect of PMA and VPA on THP-1 cell size and granularity. THP-1 cells were cultured in presence of 16.2 μ M of PMA or 2.5 mM of VPA during 48 hours and analyzed by flow cytometry. Forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) profiles allow for the discrimination of cells by size and granularity, respectively. 111

Fig S 5. Effect of PMA and VPA on expression of CD14, CD16 and CD11b by THP-1 cells. THP-1 cells (1×10^6 cells in a 6 well plate) were cultured in absence (mock) or in presence of 16.2 μ M of PMA or 2.5 mM of VPA for 48 hours. Cells were labeled with antibodies directed against CD16 (*Immunotools*) or CD11b (*Immunotools*) followed by Alexa Fluor 647 conjugates (*Invitrogen*) and anti-CD14-PE (*Beckman Coulter*). After recording events by flow cytometry (BD FACSCanto, *BD Biosciences*), data were analyzed with FlowJo v10 software (*BD Biosciences*). Data were expressed in percentages of fluorescent cells (A-C) or in ratio of mean of fluorescence intensity (rMFI) (D-E). Data (%) are presented as the means of three independent experiments \pm standard deviations. Statistical significance was evaluated using a one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test. 112

Fig S 6. Dose-response of VPA on metabolic activity of primary monocytes. After isolation, primary monocytes were cultured in presence of increasing concentrations of VPA (0, 0.5, 1, 2, 4 and 8 mM) during 24 hours. Cell viability activity was measured using the MTS assay. Treatment of primary monocytes with DMSO (10 %) was used as positive control. Data (optical densities at 490 nm) are presented as the means of three independent experiments \pm standard deviations. Statistical significance was evaluated using a one-way ANOVA test with Dunnett's multiple comparison test. 113

Fig S 7. Direct cytotoxicity of blood-derived monocytes in contact with mesothelioma M14K cells at different ratios. After isolation, primary monocytes were cocultured with CFSE-labeled M14K at different monocyte/M14K cell ratios 1/1 ($3 \times 10^3/3 \times 10^3$), 2/1 ($6 \times 10^3/3 \times 10^3$), 3/1 ($9 \times 10^3/3 \times 10^3$), 6/1 ($18 \times 10^3/3 \times 10^3$) and 20/1 ($6 \times 10^4/3 \times 10^3$). Cell cultures were recorded by Incucyte in presence of annexin V (A) or propidium iodide (B) during 24 hours. The percentages of annexin V (A) or propidium iodide (B) positive CFSE-labeled M14K cells were retrieved after 24 hours from the Incucyte data sets. The means \pm standard deviations result from four independent experiments. Statistical significance was evaluated using a one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test. 113

Fig S 8. Effect of VPA on expression of CD14, CD16 and CD11b by primary monocytes. Primary monocytes (5×10^5 cells in a 6 well plate) were cultivated alone or cocultured with M14K cells (25×10^3) in absence or in presence of 2 mM of VPA during 24 hours. Cells were labeled with antibodies directed against CD16 (*Immunotools*) or CD11b (*Immunotools*) followed by Alexa Fluor 647 conjugates (*Invitrogen*) and anti-CD14-PE (*Beckman Coulter*). After recording events by flow cytometry (BD FACSCanto, *BD Biosciences*), data were analyzed with FlowJo v10 software (*BD Biosciences*). Data were expressed in percentages of fluorescent cells (A,C,E) or in ratios of mean of fluorescence intensity (rMFI) (B,D,F). Data are presented as the means of five independent experiments \pm standard deviations. Statistical significance was evaluated using a one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test..... 114

Liste des tableaux

Table 1. Classification TNM. Les lettres TNM symbolisent la propagation du cancer sur le site de la tumeur primitive (T), dans les ganglions lymphatiques (N) ou dans les sites métastatiques (M). Cette classification permet de déterminer la meilleure option de traitement pour les patients (Popat et al., 2022).	47
Table 2. Production de cytokines par les monocytes. Le tableau illustre la variabilité de résultats associés à la sécrétion des cytokines en réponse au LPS. Les cases vertes représentent la/les sous-population(s) observée(s) comme le(s) plus grand(s) producteur(s) de cytokines selon l'article.	60
Table 3. Observations associées à l'activité cytotoxique des monocytes en fonction des études.....	121
Table 4. Mécanismes impliqués dans l'activité cytotoxique des monocytes mis en évidence lors de travaux précédents.....	126

Liste des abréviations

%	Pourcentage
µL	Microlitre
µm	Micromètre
ADCC	Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity
ADPC	Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis
ADN	Acide désoxyribonucléique
ANG	Angiogenin
APAF-1	Apoptosis-protease activating factor-1
APC	Allophycocyanin
ARG	Arginase
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine Triphosphate
BAP-1	BRCA-Associated Protein-1
Bax	BCL2 Associated X
bFGF	Basic fibroblast growth factor
C/EBP	CCAAT/Enhancer-Binding Protein
CAF	Fibroblastes associés au cancer
CAR	Chimeric Antigen Receptor

CCL	C-C Motif Chemokine Ligand
CCR	C-C Chemokine Receptor
CD	Cluster of Differentiation
CD62L	L-Selectin
CDKN2	Cyclin dependent kinase inhibitor 2
CEACAM1	CEA Cell Adhesion Molecule 1
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester
CH3CO	Groupement acétyle
CMP	Common myeloid progenitor
cMoP	Common monocyte progenitor
CO ₂	Dioxyde de Carbone
COX	Cyclooxygenase
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigènes
CR	Complement Receptor
CSF	Colony Stimulating Factor
CSH	Cellule Souche Hématopoïétique
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4
CTSW	Cathepsin W
CX3CL1	C-X3-C motif chemokine ligand 1, fractalkine
Da	Dalton

DAMP	Danger-Associated Molecular Pattern
DC	Dendritic cell
DC-SIGN	CD209
DDR	DNA damage repair
DDT	DNA damage tolerance
DDX3X	Dead-box helicase 3 X-linked
DHFR	Dihydrofolate reductase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNMT	ADN Méthyltransférase
DNMTi	Inhibiteur d'ADN Méthyltransférase
dNTPS	Triphosphate deoxyribonucleotides
EDTA	Éthylènediaminetétraacétique
EGCG	Epigallocatechin-3-gallate
EGF	Epidermal growth factor
EZH2	Enhancer of zeste homolog 2
FAB	Franco-américain-britannique
FADD	Fas associated death domain
FBS	Sérum foetal bovin
FcγR	Fcγ receptors

FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
Flt3	Fm-related receptor tyrosine kinase 3
FSC	Forward Scatter Channel
g	Gramme
GABA	Acide γ -aminobutyrique
GARFT	Glycinamide ribonucleotide formyltransferase
G-CSF	Colony stimulating factor 3
GM-CSF	Colony stimulating factor 2
GMP	Granulocyte-Monocyte Progenitor
GPLY	Granulysin
GO	Gene ontology
h	Heure
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HAT	Histone acétyltransférase
HDAC	Histone déacétylase
HDACi	Inhibiteur d'histone déacétylase
HDM	Histone déméthylase
HGF	Hepatocyte growth factor
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen – DR isotype

HMGB1	High Mobility Group Box 1 Protein
HMT	Histone Méthyltransférase
HSP	Heat shock protein
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IARC	International Agency for Research on Cancer
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase
IRF	Interferon regulatory factor
ITGA	Integrin α
ITGB2	Integrin Subunit Beta 2
J	Jour
JMJD3	Lysine Demethylase 6B
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KIF4	Kinesin Family Member 4
KLF	Kruppel-Like Factor
L	Litre
LAG-3	Lymphocyte Activating 3

LB	Lymphocyte B
LFA-1	Integrin Subunit Beta 2
LPS	Lipopolysaccharide
LSEctin	C-Type Lectin Domain Family 4 Member G
LT	Lymphocyte T
M	Molarité
M14K	Lignée de mésothéliome pleural malin humain de sous-type épithélioïde
MAFB	MAF BZIP Transcription Factor B
M-CSF	Colony stimulating factor 1
M-CSFR	Colony stimulating factor 1 receptor
MDP	Monocyte-Macrophage/Dendritic Cell Precursor
MEIS3	Meis Homeobox 3
MEM	Non-essential amino acid solution
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute
mL	Millilitre
M-MDSC	Monocyte Myeloid-Derived Suppressor cell
MMP	Matrice métalloprotéase
MPM	Mésothéliome pleural malin
MyD88	Myeloid Differentiation Primary Response 88

NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotique Phosphate
NANOG	Nanog Homeobox
NF2	Neurofibromin 2
NF-κB	Nuclear Factor-kappa B
NK	Natural Killer
NO	Monoxyde d'azote
NOTCH	Notch Receptor
NR4A1	Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A Member 1
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
O ₂	Dioxygène
OMS	Organisation mondiale de la santé
p21	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A
p38	Mitogen-Activated Protein Kinase 14
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
PARP	Poly(ADP-Ribose) Polymerase
PBMC	Cellules mononucléées du sang périphérique
PBS	Tampon phosphate salin
PCR2	Polycomb Repressive Complex 2
PD-1	Programmed cell Death 1
PDGF	Platelet-derived growth factor

PD-L1	Programmed Death-Ligand 1
PDPK1	3-Phosphoinositide Dependent Protein Kinase 1
PFA	Paraformaldéhyde
PGAM5	Phosphoglycérate mutase
PGE	Prostaglandine E
PIGF	Phosphatidylinositol Glycan Anchor Biosynthesis Class F
PK	Protéine Kinase
PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
PMN-MDSC	Polymorphonuclear Myeloid-Derived Suppressor Cell
POU5F1	POU Class 5 Homeobox 1
PPAR γ 1	Peroxisome proliferator activated receptor
pRb	Protéine rétinoblastome
PRF1	Perforin 1
PRR	Pattern Recognition Receptor
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand
PU.1	Hematopoietic transcription factor
PUFA	Acide gras polyinsaturé
RAW264.7	Lignée murine de macrophage
Rb	RB Transcriptional Corepressor 1
RNS	Substances réactives azotées

RONS	Substances réactives oxygénées et azotées
ROS	Substances réactives oxygénées
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
SAHA	Vorinostat
SatM	Segregated nucleus Atypical Monocytes
SCF	Stem cell factor
SCN1B	Sodium Voltage-Gated Channel Beta Subunit 1
SETD2	SET-Domain Containing 2
SIRT	Sirtuine
Slan	6-sulfo LacNAc
SIX2	SIX Homeobox 2
SOD2	Superoxide dismutase-2
SSC	Side Scatter Channel
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
SV	Virus Simien
TAA	Tumor Associated Antigen
TAM	Tumor-Associated Macrophage
TCR	T-Cell Receptor
Tet2	Tet Methylcytosine Dioxygenase 2
TGF	Transforming growth factor

THP-1	Lignée de monocytes d'origine humaine
Tie-2	Tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains-2
TIGIT	T Cell Immunoreceptor With Ig And ITIM Domains
TIM-3	T-Cell Immunoglobulin And Mucin Domain-Containing Protein 3
TK	Tyrosine Kinase
TLR	Toll-Like Receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor
TP53	Tumor protein 53
TRADD	TNF receptor associated death domain
TRAIL	TNF Related Apoptosis Inducing Ligand
TS	Thymidylate synthase
TSA	Trichostatine A
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VPA	Valproate de Sodium
Wnt5a	Wnt Family Member 5A
ZL34	Lignée de MPM humain de sous-type sarcomatoïde

Introduction générale

1. Le mésothéliome pleural malin

Le mésothéliome malin est un cancer rare et agressif qui se développe à partir des cellules mésothéliales formant les membranes séreuses qui sont issues de la plèvre, du péritoine, du péricarde et de la tunique vaginale (Chew and Toyokuni, 2015; Janes et al., 2021). Le mésothéliome malin est une maladie à faible pronostic qui présente une médiane de survie de 12 mois (Chew and Toyokuni, 2015). Le mésothéliome est reconnu comme maladie professionnelle depuis 1982 en Belgique et 1976 en France (EUROGIP, 2006).

Le mésothéliome pleural malin (MPM) représente 80-90% des cas de mésothéliome (Janes et al., 2021). Les mésothéliomes affectant le péritoine (10-20%), le péricarde (6%) et la tunique vaginale (<5%) sont moins courants (Attanoos and Gibbs, 1997; Eren and Akar, 2002; Spiess et al., 2005) (**Figure 1**).

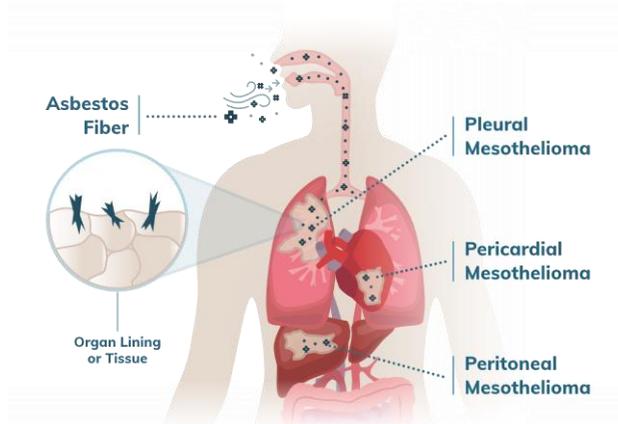


Figure 1. Illustration des différents types de mésothéliome. Le mésothéliome pleural malin (MPM) se développe au départ de la plèvre et représente 80 à 90% des cas de mésothéliome. Les mésothéliomes du péritoine, du péricarde et de la tunique vaginale sont plus rares (Janes et al., 2021).

1.1. Histologie de la plèvre

La plèvre est une membrane séreuse qui recouvre la surface interne de la cavité thoracique. Elle est constituée de deux feuillets : le feuillet pariétal et le feuillet viscéral. Le feuillet pariétal couvre la paroi thoracique, le médiastin, le cœur et le diaphragme, alors que le feuillet viscéral couvre les poumons (**Figure 2**). Les deux feuillets sont séparés par un espace fin d'approximativement 20 μm , appelé espace pleural, dans lequel se trouve du liquide pleural (Donaldson et al., 2010; Røe and Stella, 2015). Le liquide pleural est constamment produit par pression hydraulique à partir des capillaires sous-pleuraux, auxquels sont ajoutés des glycoprotéines sécrétées par les cellules mésothéliales. Ce liquide est renouvelé en sortant par les stomates présents sur la plèvre pariétale (4-10 μm). Il permet de faciliter la contraction et la relaxation du muscle diaphragmatique et donc de favoriser l'expansion des poumons lors de la

respiration. Le liquide pleural présente une activité immunitaire grâce aux leucocytes accumulés sur la plèvre pariétale formant des « milky spot » (Donaldson et al., 2010).

Le mésothélium, tissu qui forme la plèvre, est composé de 5 couches : une simple couche de cellules mésothéliales ; une fine couche de tissu conjonctif déposée sur une lame basale ; une fine couche superficielle élastique ; une couche de tissu conjonctif lâche contenant des tissus adipeux, des fibroblastes, des fibrocytes, des mastocytes et autres cellules mononucléées, des vaisseaux sanguins, des nerfs et des vaisseaux lymphatiques ; et finalement une couche fibro-élastique épaisse (Røe and Stella, 2015).

Les cellules mésothéliales sont dérivées du mésoderme et expriment des marqueurs mésenchymateux et épithéliaux (Yap et al., 2017). Elles sont plates et allongées mesurant approximativement 25 μm de diamètre. Elles sont polarisées présentant des microvilli et des cils sur leur surface laminaire ainsi qu'un pôle apical et basal (Mutsaers, 2004).

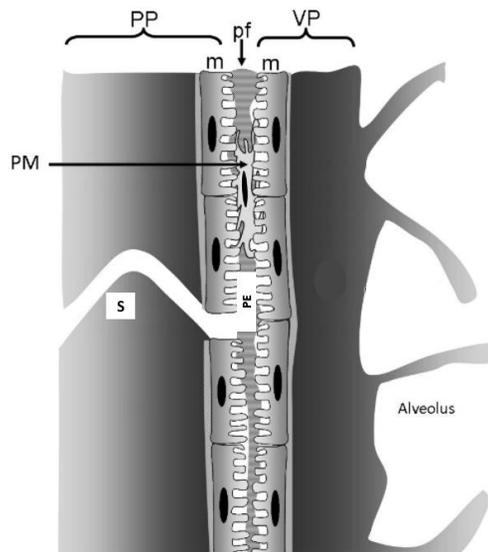


Figure 2. Représentation de la structure de la plèvre. La plèvre est une membrane séreuse qui recouvre la surface interne de la cavité thoracique et qui est formée par des cellules mésothéliales (m). La plèvre est constituée de deux feuillets : le feuillet viscéral (VP) et le feuillet pariétal (PP). Les deux feuillets sont séparés par un espace appelé espace pleural (PE). Du liquide pleural (pf) est constamment produit et renouvelé en sortant par les stomates (S) présents sur la plèvre pariétale. Des macrophages pleuraux (PM) sont présents dans l'espace pleural (Donaldson et al., 2010).

1.2. MPM et ses sous-types histologiques

Le MPM présente trois sous-types histologiques : les sous-types épithélioïde, biphasique et sarcomatoïde. Le sous-type épithélioïde est le plus commun (50 à 60% des cas) (Janes et al., 2021). Il est constitué de cellules de grande taille de forme cubique, et est associé au pronostic le plus favorable allant de 12 à 27 mois. Le sous-type sarcomatoïde (10% des cas) est le plus invasif et est observé à un stade avancé de la maladie. Il est formé de cellules fusiformes regroupées en faisceaux. Le temps de survie

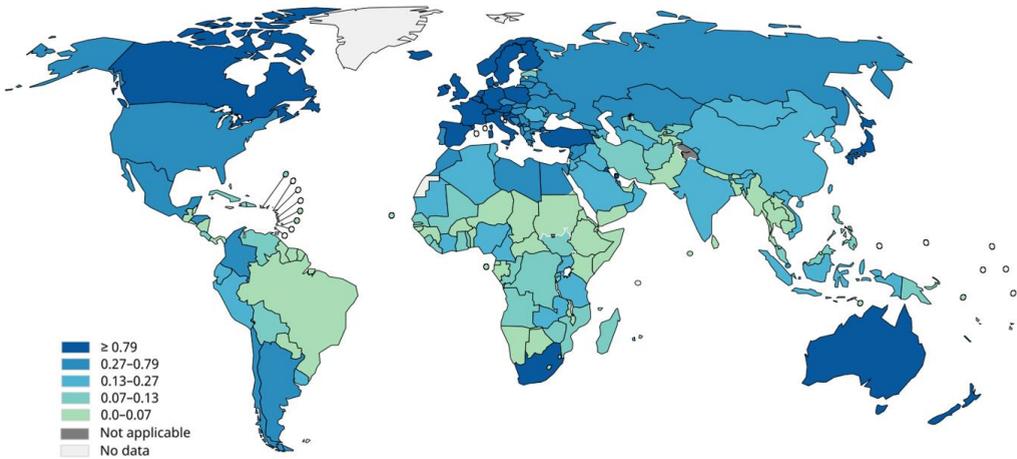
associé à ce sous-type va de 7 à 18 mois. Le sous-type biphasique (30 à 40% des cas) correspond à un mélange des deux premiers sous-types et présente un temps de survie allant de 8 à 21 mois (Bonelli et al., 2017; Yap et al., 2017). Le sous-type biphasique peut être nommé biphasique épithélioïde (biphasique-E) ou biphasique sarcomatoïde (biphasique-S) selon la proportion de cellules épithélioïdes et sarcomatoïdes qui le constitue (Yap et al., 2017). Bien que les sous-types histologiques ont souvent été caractérisés de manière distincte, le mésothéliome est maintenant décrit sous forme de continuum de sous-types épithélioïdes et sarcomatoïdes (Janes et al., 2021).

1.3. Epidémiologie du MPM

C'est en 1767 que le premier cas de tumeur pleurale a été recensé, et en 1947 qu'a été rapporté le premier cas de mésothéliome (Yang et al., 2008; Røe and Stella, 2015). Avant la deuxième moitié du 20^e siècle, le mésothéliome était très rare. L'incidence de la maladie a commencé à augmenter en raison de l'utilisation massive d'amiante dans les années ultérieures. Entre les années 1988 et 2002, plus de 120.000 cas avaient déjà été détectés selon l'Agence Internationale pour le Recherche sur le Cancer (IARC) (Yang et al., 2008; Remon et al., 2015). Des pics d'incidence et de mortalité de la maladie ont pu être estimés en fonction de l'usage de l'amiante. En Europe de l'Ouest, 500.000 morts liés à l'amiante seraient prédits d'ici 2030 (Cavone et al., 2019). Actuellement, en Europe, le taux d'incidence standardisé est supérieur à 0,79 cas par 100.000 habitants (Globocan, 2020). En 2020, 30.870 nouveaux cas ont été recensés à travers le monde et 26.278 décès. A titre d'exemple, le cancer du poumon a représenté 2,2 millions (1,8 millions) de nouveaux cas (de décès) en 2020 (Globocan, 2020). En Belgique, le mésothéliome représente le 32^e cancer le plus fréquent avec 288 cas recensés en 2019 (Fondation contre le cancer, 2020)

Pour des raisons d'exposition professionnelle, les hommes sont plus touchés par le mésothéliome que les femmes (en 2020, 21.560 hommes pour 9.310 femmes) (**Figure 3**) (Globocan, 2020). De plus, en raison du temps de latence associé au développement de la maladie, 2/3 des patients atteints du MPM ont entre 50 et 70 ans (Yang et al., 2008).

A



B

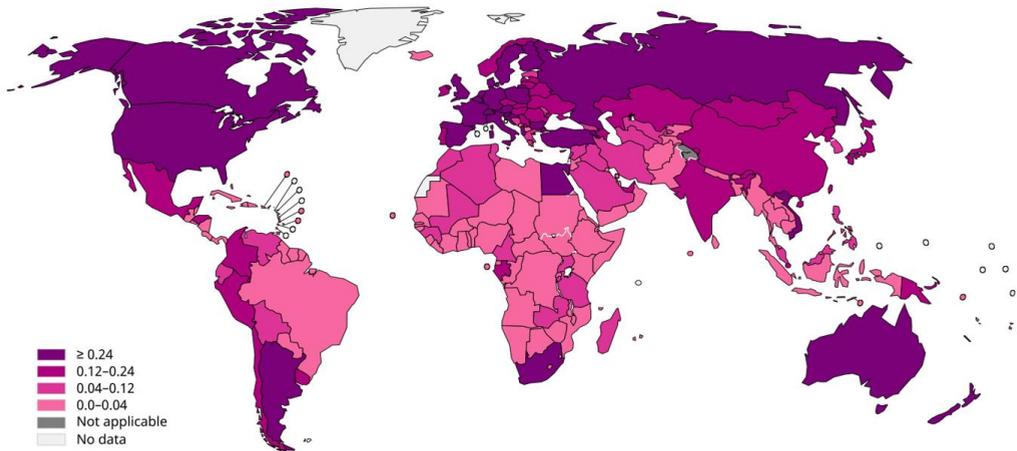


Figure 3. Incidence du MPM à travers le monde selon le sexe. A. Taux d'incidence du MPM standardisé en fonction de l'âge chez les hommes. B. Taux d'incidence du MPM standardisé en fonction de l'âge chez les femmes (Globocan, 2020).

1.4. Etiologie du MPM

L'incidence du MPM est majoritairement associée à l'exposition à l'amiante bien que d'autres facteurs tels que la prédisposition génétique, le virus simien 40, la radiation, l'érionite puissent également être liés à l'incidence de la maladie.

1.4.1. Amiante

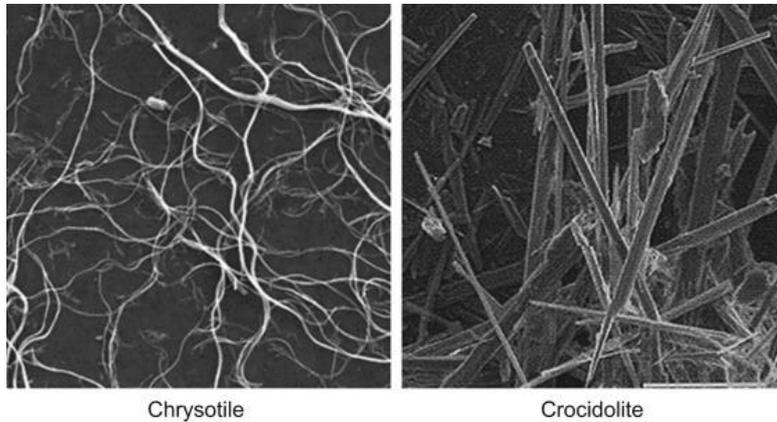
Le terme « amiante », également appelé « asbeste », est un nom commercial qui vient du grec signifiant « inextinguible » autrement dit « qu'il est impossible d'éteindre » (Yang et al., 2008; Sinn et al., 2021). L'amiante regroupe un ensemble de silicates hydratés classés en deux familles : les serpentines et les amphiboles. La famille des serpentines ne comprend que la chrysotile. La chrysotile, également appelée amiante blanc, représente 95% de l'amiante utilisé commercialement. Les fibres de chrysotile sont courtes et frisées (**Figure 4**). Les amphiboles incluent la crocidolite (amiante bleu) ; l'amosite (amiante brun), la trémolite, l'actinolite et l'anthophyllite (Toyokuni, 2014). Les fibres d'amphibole sont plus longues et droites. Le caractère carcinogène des amphiboles a été reconnu par la communauté scientifique. En revanche, celui des serpentines reste controversé. Effectivement, de par leur courte longueur, les fibres de chrysotile apparaissent moins cancérigènes que les fibres d'amphibole. Certains chercheurs soutiennent que la propension des fibres de chrysotile à générer le MPM n'est possible que si elles sont contaminées par des fibres d'amphibole (contamination à la trémolite). L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et l'IARC ont malgré tout classifié tous les types d'amiante en tant que carcinogène de type 1 (Røe and Stella, 2015).

Les fibres d'amiante ont fortement été utilisées lors de la révolution industrielle (de 1930 jusqu'en 1970) en raison de ses propriétés physicochimiques intéressantes et son faible coût. Effectivement, l'amiante présente d'excellentes propriétés en terme d'isolation thermique, sonore et ignifuge. De plus, elle est solide et stable. Ses différentes applications sont les matériaux de construction de maisons et de bateaux, les freins, les joints des voitures, les jouets, les bijoux ainsi que les filtres à cigarette. Il existe au moins 3000 produits dans lesquels l'amiante a été utilisé (EUROGIP, 2006; Yang et al., 2008; Røe and Stella, 2015).

La relation entre les fibres d'amiante et le MPM a été mise en évidence vers 1960 dans une région de la province du Cap en Afrique du sud. Dans cette région, des ouvriers travaillaient dans une mine à crocidolites où un nombre anormalement élevé de MPM (33 cas) a été recensé (EUROGIP, 2006; Yang et al., 2008; Røe and Stella, 2015; Janes et al., 2021).

En raison de sa nocivité suspecte, plusieurs directives ont été appliquées afin d'interdire l'utilisation de l'amiante en Europe telles que la directive 76/769/CEE relative à la limitation de mise sur le marché de certaines substances toxiques dont l'interdiction de l'utilisation des amphiboles, les chrysotiles restant néanmoins autorisées. Ce n'est que le 1^{er} janvier 2005 que l'utilisation de toutes les fibres d'amiante a été interdite dans toute l'Europe (directive 1999/77/CE) (EUROGIP, 2006). Malgré sa nocivité, les fibres d'amiante sont toujours utilisées ou produites en Chine, en Inde, en Russie, en Zambie, en Colombie et au Kazakhstan où une augmentation du pic

d'incidence est attendue (Røe and Stella, 2015). Actuellement, 125 millions de personnes sont toujours exposées quotidiennement à l'amiante (Vainio et al., 2016).



Chrysotile

Crocidolite

Figure 4. Fibres d'amiante observées par microscope électronique. Les chrysotiles font partie de la famille des serpentines. Les fibres des chrysotiles sont courtes et frisées. Les crocidolites font partie de la famille des amphiboles avec l'amosite, la trémolite, l'actinolite et l'anthophyllite. Les fibres des amphiboles sont longues et droites (Toyokuni, 2014; Bignold, 2015).

1.4.2. Erionite

L'érionite est un silicate d'aluminium et de potassium de forme fibreuse de la famille des zéolites et qui présente des caractéristiques physiques proches des amphibolites, amosites et crocidolites. L'érionite est retrouvée dans les régions volcaniques associées à des tufs rhyolitiques. Leurs dépôts ont notamment été situés dans la région de Cappadocia en Turquie mais également dans les régions montagneuses de l'ouest des Etats-Unis, de l'Orégon au Mexique, dans la région Sierra Madre occidentale ainsi qu'au nord de l'Italie (Attanoos et al., 2018). Le lien entre l'incidence du MPM et l'érionite a été démontré en Turquie dans un village dépourvu d'amiante de Cappadocia où un nombre anormalement élevé de MPM a été recensé (Carbone and Yang, 2012). Dans ce village, l'incidence correspond à 1 cas /100 habitants par année alors que ce nombre atteint normalement les 20 cas /million d'habitants par année (Yang et al., 2008). Le potentiel cancérigène de l'érionite semble plus puissant que l'amiante à induire le MPM. En effet, une étude a démontré sur des animaux ayant reçu une injection intrapleurale d'amiante, que 48 % ont développé le MPM alors que 100 % ont développé le MPM en présence d'érionite (Wagner et al., 1985; Carbone et al., 2012).

1.4.3. Prédispositions génétiques

L'hypothèse selon laquelle une prédisposition génétique soit également à l'origine du MM, a été soupçonnée dès lors que des cas de MPM étaient plus fréquents dans certaines familles que dans d'autres (Roushdy-Hammady et al., 2001). Le caractère héréditaire du MPM a été associé aux mutations de certains gènes dont les gènes BRC1A-

associated protein-1 (BAP-1), Neurofibromin 2 (NF2), Tumor protein 53 (TP53), SET-Domain Containing 2 (SETD2) et Dead-box helicase 3 X-linked (DDX3X) (Bueno et al., 2016). Cependant, le caractère héréditaire du MPM est principalement associé aux mutations génétiques du gène BAP-1. En effet, 1 à 7% (et 20 à 64%) des cas de mésothéliome peuvent être attribués à la mutation germinale (et somatique) du gène BAP-1 (Dudnik et al., 2021). Le gène BAP-1 est un gène suppresseur de tumeur qui code pour une enzyme hydrolase déubiquitinylée. BAP-1 joue un rôle dans la progression du cycle cellulaire, la réparation des dommages à l'ADN et la différenciation cellulaire. Son expression peut être perdue suite à une délétion ou à des mutations du gène, empêchant dès lors l'activité déubiquitinylase. Ces mutations se transmettent selon un modèle autosomique dominant (Attanoos et al., 2018). Bien que seule, la délétion de BAP-1 ne cause pas le MPM, elle accélère son développement lorsqu'elle est associée aux délétions des gènes NF2 et Cyclin dependent kinase inhibitor 2 A,B (CDKN2AB) (Badhai et al., 2020).

1.4.4. Virus simien 40

Certaines données expérimentales semblent également lier l'incidence du MPM avec le virus simien 40 (SV40). Le SV40, un virus à ADN, a été disséminé dans le monde à travers le vaccin contre la poliomyélite dans les années 1950-1960. Les premiers vaccins contre la poliomyélite ont été préparés à partir de cellules primaires de foie du singe Macaque Rhésus. Cependant, des études sur le vaccin ont montré que les cellules primaires exprimaient également le SV40, endémique aux singes Rhésus, et que le SV40 pouvait se transmettre horizontalement chez l'homme. De plus, le formaldéhyde, utilisé pour inactiver le poliovirus, a échoué à inactiver le SV40, laissant certains vaccins contaminés et transmettant ainsi le virus de 30 à 100 millions de personnes au Etats-Unis et encore plus dans le monde. Le lien entre l'infection au SV40 et le développement du MPM a pu être démontré en modèles murin et humain (*in vitro*). Cependant, la corrélation entre la vaccination contre la poliomyélite et le développement du MPM n'a pas pu être mise en évidence par des études épidémiologiques. C'est pourquoi, le rôle du SV40 dans le développement du MPM reste encore controversé (Cicala et al., 1993; Robinson et al., 2005; Røe and Stella, 2015; Attanoos et al., 2018; Carbone et al., 2020).

1.4.5. Radiation

L'effet à long terme de la radiation peut également être lié à l'incidence du MPM. Il a effectivement été démontré que le risque du développement du MPM est significativement plus élevé chez un individu préalablement exposé aux agents émettant des particules α tels que l'agent de contraste radioactif Thorotrast (Røe and Stella, 2015).

1.5. Tumorigenèse du MPM

Le temps de latence correspond au temps entre la première exposition aux fibres d'amiante et le développement du MPM. Dans le cas du MPM, il varie entre 20 à 50 ans. Bien que ce temps de latence soit long, il semblerait que la véritable croissance du MPM se produise endéans quelques mois, voire quelques années (Janes et al., 2021). De plus, certains chercheurs disent que cette longue période de latence s'explique par le temps que prennent les fibres d'amiante à atteindre la plèvre (Toyokuni, 2014).

L'exacte voie prise par les fibres d'amiante pour atteindre la plèvre n'est à ce jour pas encore complètement comprise (**Figure 5A**). Après leur inhalation, les fibres d'amiante migrent le long de la cavité nasale et de la trachée avant d'atteindre le parenchyme pulmonaire. Les fibres d'amiante peuvent ensuite progresser vers la plèvre viscérale, grâce à la pression négative exercée dans la cavité pleurale, avant de finalement rejoindre la plèvre pariétale. Il semblerait que la plupart des MPMs se produisent au niveau de la plèvre pariétale (Toyokuni, 2014; Hamaidia et al., 2016). Les fibres de petites tailles ($<5 \mu\text{m}$) peuvent sortir via les stomates situés sur la plèvre pariétale. Cependant, les fibres de plus grande taille restent coincées dans l'espace pleural où elles vont exercer un ensemble de stress amenant à une réaction inflammatoire, caractérisée par une accumulation excessive d'effusion pleurale dans l'espace pleural et au déclenchement de la tumorigenèse (Donaldson et al., 2010; Hamaidia et al., 2016).

La toxicité des fibres d'amiante est exercée de différentes manières. Dans un premier temps et en raison de leur forme, elles vont érafler les cellules mésothéliales, ce qui va être à l'origine d'une irritation causant des cycles répétés de dommages et de réparations cellulaires (Robinson et al., 2005). Elles peuvent également induire des dommages génotoxiques en générant des substances réactives oxygénées (ROS) via les ions ferreux présents à leur surface, par la réaction de Fenton (Izzi et al., 2012; Toyokuni, 2014). De plus, les fibres d'amiante, incorporées par les cellules mésothéliales peuvent s'attacher aux chromosomes, en raison de leur forte affinité pour les histones, lors de la division cellulaire, conduisant à des dommages à l'ADN (Toyokuni, 2014; Bibby et al., 2016). Les cellules mésothéliales exposées et/ou endommagées par les fibres vont déclencher une réaction inflammatoire en libérant des substances réactives azotées (RNS) et des ROS ainsi que des cytokines telles que le *Transforming growth factor beta* β (TGF- β), les *Platelet derived growth factors* (PDGFs) et les *Vascular endothelial growth factors* (VEGFs), qui favorisent la croissance tumorale (Bibby et al., 2016). L'ensemble de ces stress cytotoxiques vont induire la mort apoptotique (mort cellulaire programmée) et nécrotique (mort cellulaire non programmée) des cellules mésothéliales (Toyokuni, 2014).

Parallèlement, les facteurs tels que l'interleukine-8 (IL-8), le *C-C motif chemokine ligand 2* (CCL2), le CCL3, le *Tumor necrosis factor- β* (TNF- β) et le *C-X3-C motif chemokine ligand 1* (CX3CL1, fractalkine), sont sécrétés par les cellules mésothéliales. Cette sécrétion amène au recrutement des cellules immunitaires telles que les monocytes, les macrophages, les granulocytes et les lymphocytes afin qu'elles puissent exercer leurs fonctions immunitaires. Dès leur arrivée, les macrophages vont pouvoir phagocyter les fibres d'amiante. Cependant, ils échouent à phagocyter les fibres de grande taille ($>20 \mu\text{m}$) et de petit diamètre ($<250 \text{nm}$) générant une phagocytose dite

« frustrée » (**Figure 5B**). Cette phagocytose frustrée amène à la libération du contenu du phagosome riche en substances réactives dans le milieu extracellulaire causant un stress oxydatif supplémentaire au sein la plèvre. De plus, la libération de la protéine *High mobility group box 1* (HMGB-1) par les cellules mésothéliales nécrotiques induit la sécrétion du TNF- α par les macrophages amenant à l'activation de la voie *Nuclear factor-kappa B* (NF- κ B) qui favorise la survie des cellules mésothéliales et, dès lors, l'accumulation de dommages génétiques (Izzi et al., 2012; Hamaidia et al., 2016).

Contrairement à la réponse immunitaire associée aux agents pathogènes, l'inflammation liée à la présence de fibres d'amiante n'est jamais résolue et résulte en une inflammation chronique qui conduit à la transformation de cellules mésothéliales saines en cellules de mésothéliome (Izzi et al., 2012).

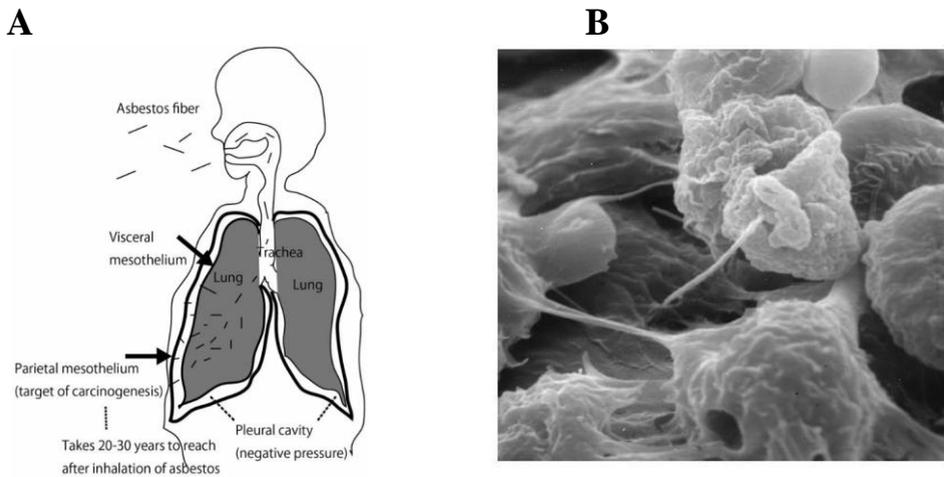


Figure 5. Schéma illustrant la voie prise par les particules d'amiante pour atteindre la plèvre. A. Après leur inhalation, les fibres d'amiante migrent le long de la cavité nasale, de la trachée et des poumons avant d'atteindre la plèvre. B. Phagocytose frustrée observée au microscope électronique. Les fibres d'amiante de grande taille ($>20 \mu\text{m}$) et de petit diamètre ($<250 \text{ nm}$) ne peuvent pas être entièrement incorporées par les macrophages générant une phagocytose frustrée (Pass et al., 2005; Toyokuni, 2014).

1.6. Profilage moléculaire du MPM

L'environnement génétique du MPM est caractérisé par de fréquentes pertes chromosomiques, bien que le nombre de mutations soit relativement faible par rapport à d'autres tumeurs solides (Brossel et al., 2021; Wadowski et al., 2021). Les tumeurs de sous-type épithélioïde semblent présenter un pourcentage d'aberrations chromosomiques significativement plus élevé que dans les sous-types non-épithélioïdes (Wadowski et al., 2021). Les délétions les plus fréquentes se situent sur les sites spécifiques au sein des bras chromosomiques 1p, 3p, 9p, 6q, 13q, 15q, et 22q (Røe and Stella, 2015). Le territoire mutationnel du MPM est dominé par l'inactivation de gènes suppresseurs, dont les plus fréquemment touchés, incluent les gènes BAP-1, CDKN2A, NF2 et TP53 (Sinn et al., 2021). Les altérations des gènes CDKN2A, NF2 et BAP-1

semblent être des facteurs majeurs conduisant à la malignité du mésothéliome (Cheung et al., 2017).

Le gène BAP-1, localisé sur le chromosome 3p21, est touché par des mutations germinales (1-7%) ainsi que des mutations somatiques (20 à 64%) incluant des mutations ponctuelles, des pertes de copies de gènes et des réarrangements (Røe and Stella, 2015; Yap et al., 2017; Dudnik et al., 2021).

Le gène CDKN2A, retrouvé sur la région 9p21, code pour deux protéines, la p16^{INK4} et la p14^{ARF} qui jouent toutes les deux un rôle de suppresseur de tumeur en régulant le *RB Transcriptional Corepressor 1* (Rb) et p53 impliqués dans le cycle cellulaire (Røe and Stella, 2015; Cheung et al., 2017). Ce gène est fréquemment muté de manière homozygote et sa délétion touche 46% des cas de MPM (Izzi et al., 2012; Sinn et al., 2021).

Le gène NF2, retrouvé sur la région 22q12, code pour une protéine appelée Merlin qui joue un rôle dans la régulation des voies de signalisation impliquées dans le contrôle de la croissance cellulaire (Røe and Stella, 2015). Merlin est connu pour inhiber l'expression de la cycline D1 et sa perte favorise la progression du cycle cellulaire. Merlin inhibe également les voies de signalisation Rac/Pak et FAK qui sont impliquées dans la migration et l'évasion cellulaire (Cheung et al., 2017). De plus, il est fréquemment délété ou muté par des mutations faux-sens et non-sens dans le MPM (Yap et al., 2017). Sa délétion homozygote concerne 50 à 70% des échantillons de MPM (Izzi et al., 2012).

Le gène TP53, situé sur la région 17p13, est plus commun dans le sous-type épithélioïde bien qu'il soit également présent dans les sous-types biphasique et sarcomatoïde. Sa mutation reste néanmoins moins fréquente (< 10%) (Yap et al., 2017). Le gène TP53 est un gène suppresseur de tumeur qui est impliqué dans le cycle cellulaire et l'apoptose (Hylebos et al., 2016).

1.7. Microenvironnement du MPM

Le microenvironnement du MPM est très hétérogène et complexe. Les cellules de mésothéliome sont, en effet, accompagnées d'un stroma tumoral comprenant des fibroblastes, des cellules endothéliales et immunitaires ainsi que d'une matrice extracellulaire, rassemblant l'ensemble des macromolécules sécrétées par les cellules qui composent le microenvironnement tumoral (Ramamonjisoa and Ackerstaff, 2017; Minnema-Luiting et al., 2018; Chu et al., 2019; Napoli et al., 2021).

1.7.1. Fibrocytes et fibroblastes

Le stroma tumoral est notamment composé de fibrocytes et de fibroblastes associés au cancer (CAFs) (Napoli et al., 2021). Les fibrocytes et les CAFs présentent des origines différentes. Les fibrocytes sont des cellules mésenchymateuses qui sont dérivées des macrophages et des cellules dendritiques (α -SMA⁻, HLA-DR⁺, CD68⁺), alors que les fibroblastes sont dérivés des tissus (α -SMA⁺) (Reilkoff et al., 2011; Murray et al., 2014; Ping et al., 2021). Les fibrocytes et les CAFs produisent des composants de la matrice extracellulaire tels que le collagène, le hyaluronane, la laminine et la

fibronectine et la remodelent via ses matrices métalloprotéases (MMPs) (Chu et al., 2019). Les fibrocytes et les CAFs peuvent également produire des facteurs de croissance tels que le TGF- β et le VEGF qui favorisent la prolifération, l'invasion et l'angiogenèse tumorale. De plus, ils sont capables de produire de l'IL-6 et du CCL2 qui participent au recrutement de cellules immunitaires immunosuppressives (Chu et al., 2019; Napoli et al., 2021).

1.7.2. Cellules immunitaires :

L'infiltration des cellules immunitaires varie entre patients, sous-types histologiques et change au cours de la progression tumorale et des traitements thérapeutiques (Minnema-Luiting et al., 2018; Salaroglio et al., 2019). Cette infiltration apporte une valeur prédictive quant à la survie des patients. En général, elle inclut les macrophages, les lymphocytes T et B, les cellules tueuses naturelles (NKs), les mastocytes, les cellules myéloïdes suppressives (MDSCs) et les cellules dendritiques (DCs) (**Figure 6**) (Minnema-Luiting et al., 2018). Cependant, il semblerait que le microenvironnement diffère fortement entre les sous-types épithélioïde et non-épithélioïdes. Dans le premier cas, le microenvironnement immunitaire est dit « activé ». Il est caractérisé par une plus grande proportion de DCs plasmacytoïdes, de cellules B CD20⁺, de lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires et de lymphocytes CD8⁺ infiltrant la tumeur. Les sous-types non-épithélioïdes, quant à eux, sont caractérisés par une plus grande infiltration de leucocytes que dans le sous-type épithélioïde. Néanmoins, cette infiltration est essentiellement composée de cellules immunosuppressives telles que les macrophages associés aux tumeurs (TAMs), les MDSCs et les cellules T régulatrices (Minnema-Luiting et al., 2018; Napoli et al., 2021; Wadowski et al., 2021).

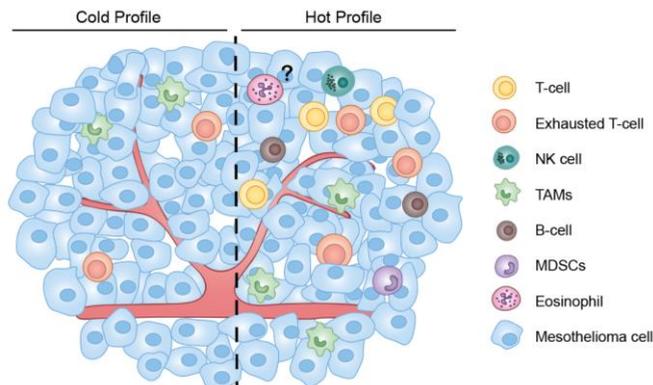


Figure 6. Illustration de l'infiltration immunitaire dans le microenvironnement du MPM. Le MPM est caractérisé par une hétérogénéité spatiale présentant un continuum de profils tumoraux dits « chaud » et « froid », défini par une infiltration lymphocytaire élevée ou faible. L'infiltration immunitaire du MPM inclut des macrophages, des lymphocytes T (épuisés ou non), des lymphocytes B, des cellules tueuses naturelles (NKs), des mastocytes, les cellules myéloïdes suppressives (MDSCs) et des cellules dendritiques (DCs) (Minnema-Luiting et al., 2018; Brossel et al., 2021).

TAMs

Les macrophages, incluant les TAMs, constituent les cellules immunitaires majoritaires du MPM (26 à 42%) (Minnema-Luiting et al., 2018). Les macrophages proviennent essentiellement de la différenciation des monocytes circulants. Ils sont connus pour présenter différents états d'activation en fonction du microenvironnement dans lequel ils se trouvent (Napoli et al., 2021). Ces états d'activation sont étroitement liés à la polarisation des lymphocytes T_{H1} et T_{H2} . Ils sont caractérisés par deux phénotypes extrêmes : les macrophages activés de manière classique (M1) et les macrophages activés de manière alternative (M2). Il est important de préciser que ces phénotypes extrêmes correspondent à des modèles théoriques utilisés en laboratoire afin d'étudier les réponses des macrophages dans un état d'activation particulier. En pratique, cette dichotomie M1/M2 correspond plutôt à un continuum de phénotypes qui se répartissent entre ces deux phénotypes extrêmes (Atri et al., 2018).

En présence d'interféron-gamma ($IFN-\gamma$), de TNF et de LPS, les macrophages se polarisent en M1. Les macrophages M1 sont caractérisés par l'expression des récepteurs CD68, CD80, CD86, complexes majeurs d'histocompatibilité de type II (MHC-II), ainsi qu'une expression élevée de iNOS qui métabolise la L-arginine en L-citrulline et monoxyde d'azote (NO). Les M1 sécrètent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-12, l'IL-23 et le TNF- α (Chen et al., 2019). Ils jouent un rôle dans l'inflammation précoce et dans l'activité antitumorale (Murray and Wynn, 2011).

En revanche, les macrophages sont polarisés en M2 en présence de IL-4, IL-13, IL-10, TGF- β , glucocorticoïdes et de complexes immunitaires (Ivashkiv, 2013). Les macrophages M2 sont caractérisés par l'expression des récepteurs CD163, CD206 et CD209. Ils présentent une activité arginase élevée qui métabolise la L-arginine en urée et L-ornithine, un précurseur de collagène et de polyamine. De plus, les M2 sécrètent des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et le TGF- β (Chen et al., 2019). Les macrophages M2, quant à eux, sont plutôt associés à l'arrêt de l'inflammation et à une activité protumorale (Murray and Wynn, 2011).

Dans le MPM, les TAMs sont retrouvés au sein de l'environnement tumoral. Les TAMs sont apparentés aux macrophages M2 (Mantovani et al., 2013). Une infiltration élevée de TAMs est associée à un faible pronostic de survie chez les patients atteints de MPM (Izzi et al., 2012). De plus, la combinaison d'un haut nombre de TAMs avec un faible nombre de lymphocytes CD8⁺ est associée à un pronostic défavorable (Napoli et al., 2021). Effectivement, comme pour les macrophages M2, les TAMs inhibent la réponse immunitaire en produisant des cytokines immunosuppressives (TGF- β , IL-10) qui favorisent la polarisation lymphocytaire en T_{H2} et en lymphocytes T régulateurs. De plus, les TAMs sécrètent du TGF- α , *Epidermal growth factor* (EGF), PDGF, *Hepatocyte growth factor* (HGF), et du *Basic fibroblast growth factor* (bFGF) qui induisent la croissance tumorale (Miselis et al., 2008; Mantovani et al., 2013; Duque and Descoteaux, 2014). Finalement, ils favorisent l'évasion tumorale en produisant des MMPs qui remodelent la matrice extracellulaire (Izzi et al., 2012).

Lymphocytes T et NKs

Les cellules CD3⁺ représentent les secondes cellules immunitaires les plus fréquentes (20 à 42%) du MPM (Minnema-Luiting et al., 2018). La majorité des patients de MPM présentent des lymphocytes T CD8⁺, CD4⁺ et immunosuppresseurs CD4⁺/FoxP3⁺. Les lymphocytes sont retrouvés aussi bien dans le liquide pleural que dans les tissus (Salaroglio et al., 2019). Il semblerait que la présence de lymphocytes CD8⁺ dans les effusions pleurales n'ait pas d'impact significatif sur le pronostic, contrairement à l'infiltration intratumorale. Dans ce cas, un faible nombre de lymphocytes CD8⁺ associé une proportion élevée de cellules T FoxP3⁺ est corrélé à un faible pronostic chez les patients présentant des tumeurs épithélioïde et sarcomatoïde. Parallèlement, des études ont montré que l'infiltration en lymphocytes CD4⁺ dans le MPM est associé à un meilleur pronostic dans le sous-type épithélioïde, bien que cela reste controversé dans le sous-type sarcomatoïde (Napoli et al., 2021).

Les lymphocytes T jouent un rôle essentiel dans la réponse antitumorale. Effectivement, en activant les cellules présentatrices d'antigènes (CPAs), les lymphocytes T CD4⁺ helper stimulent indirectement l'activation des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques et des NKs, les rendant, dès lors, capables d'exercer des fonctions cytotoxiques contre les cellules tumorales (Napoli et al., 2021). Cependant, au sein du MPM, les lymphocytes T deviennent « épuisés » (**Figure 7**) (Lee et al., 2018; Brossel et al., 2021). Cet état d'épuisement résulte de la stimulation excessive du récepteur des cellules T (TCR) avec le complexe majeur d'histocompatibilité 1 (MHC-1)-peptide, et suite à l'interaction de leurs récepteurs co-inhibiteurs dont le CTLA-4 (avec le CD80 et le CD86), le PD-1 (avec le PD-L1), le LAG-3 (avec le complexe MHC-2-peptide et le LSECtin), TIM-3 (avec le Ceacam-1, la galectine-9, le HMGB1 et la phosphatidylsérine) et finalement TIGIT (avec le CD112 et le CD155) (Anderson et al., 2016; Salaroglio et al., 2019; Brossel et al., 2021; Harber et al., 2021). Cet état d'épuisement est caractérisé par une perte progressive des fonctions effectrices, telles que la production de cytokines, la prolifération et l'activité cytotoxique (Anderson et al., 2016; Brossel et al., 2021).

Contrairement aux lymphocytes, les cellules NKs (CD3⁺CD56⁺ et les CD3⁺CD56⁺) sont présentes en très faibles quantités dans le MPM, bien qu'elles soient retrouvées dans la majorité des tissus. De plus, une grande proportion de cellules NKs expriment des récepteurs de co-inhibition tels que TIM-3 (Chu et al., 2019).

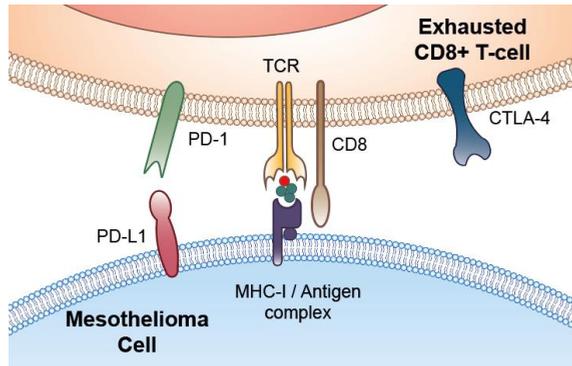


Figure 7. Lymphocytes T épuisés. Dans le MPM, les lymphocytes T deviennent « épuisés » en raison de la surstimulation du récepteur TCR avec le CMH-I ainsi que via l'interaction des récepteurs co-inhibiteurs dont le CTLA-4 et PD-1. Cet état d'épuisement est caractérisé par une perte progressive des fonctions effectrices des lymphocytes T (Brossel et al., 2021).

MDSCs

Les cellules myéloïdes CD33⁺ représentent 42% des leucocytes dans le MPM. Parmi ces cellules, 0,6 à 31% peuvent être corrélés à des MDSCs (Napoli et al., 2021).

Les MDSCs sont des cellules myéloïdes immatures qui présentent une activité immunosuppressive. Les MDSCs sont divisés en deux groupes : les MDSCs granulocytaires (PMN-MDSCs), qui expriment des marqueurs granulocytes tels que CD66b et le CD15, et les MDSCs monocytaires (M-MDSCs) qui expriment le récepteur CD14 (Veglia et al., 2019; Napoli et al., 2021). Les M-MDSCs sont majoritairement retrouvés au sein de la tumeur alors que les PMN-MDSCs sont retrouvés dans le sang, les organes lymphoïdes et le site tumoral (Cornelissen, 2015). La présence de PMN-MDSCs et de M-MDSCs est significativement plus élevée dans le liquide pleural et le tissu de patients de MPM par rapport à ceux de patients atteints de pleurésie (Salaroglio et al., 2019). De plus, l'infiltration de M-MDSCs est associée à un mauvais pronostic chez les patients atteints de MPM (Chéné et al., 2016).

Les M-MDSCs semblent être plus immunosuppresseurs que les PMN-MDSCs (Veglia et al., 2019). Les M-MDSCs sont connus pour inhiber la réponse antitumorale par plusieurs mécanismes. Ils produisent des ROS, des RNS et des peroxy-nitrites qui sont à l'origine de la nitration des récepteurs des cellules T, les rendant incapables d'interagir avec le complexe MHC-peptide présent sur les CPA et empêchant la stimulation spécifique des lymphocytes T. De plus, en exprimant fortement iNOS, ils bloquent les fonctions cellulaires, notamment en générant des dommages à l'ADN. Leur activité arginase-1 appauvrit l'environnement en arginine indispensable aux lymphocytes T qui sous-régulent l'expression de leurs récepteurs. Ils bloquent la disponibilité de la cystéine qui empêche l'activation des cellules T. Finalement, ils produisent des cytokines IL-6, IL-10 et TGF- β qui empêchent la prolifération des cellules T (Cornelissen, 2015; Canè et al., 2019; Veglia et al., 2019).

DCs :

Les DCs sont de puissantes CPAs qui jouent un rôle dans l'initiation et la régulation de la réponse immunitaire. Les DCs jouent également un rôle dans l'activation des lymphocytes T naïfs (Napoli et al., 2021). Les DCs ne sont pas fortement représentés dans le microenvironnement du MPM (Chu et al., 2019). Selon une étude, la présence de DCs plasmacytoïdes activés (CD40+ et CD86+) est corrélée à une bonne signature du microenvironnement immunitaire tumoral ainsi qu'à une réponse positive à la thérapie immunitaire basée sur les points de contrôle (Lee et al., 2018).

Lymphocytes B

Les cellules B sont également détectées au sein du MPM (Chu et al., 2019). Les lymphocytes B contribuent à l'immunité humorale en se différenciant en cellules plasmatiques sécrétant des anticorps. De plus, les cellules B peuvent stimuler les cellules T ou servir de CPAs. L'infiltration de lymphocytes B est associée à une meilleure survie des patients, bien que généralement faible, voire rare (Napoli et al., 2021).

1.8. Diagnostic et traitements du MPM**1.8.1. Diagnostic**

A un stade précoce, les patients atteints du MPM sont asymptomatiques. C'est pourquoi, la maladie est souvent diagnostiquée à un stade avancé (Janes et al., 2021).

Les symptômes du MPM incluent une effusion pleurale (70% des cas), des difficultés respiratoires et une douleur thoracique, associée à la présence de liquide pleural et de l'invasion tumorale qui entravent les mouvements pulmonaires. La fatigue, la perte de poids, l'anorexie, la sueur ainsi que les malaises peuvent également se présenter (Robinson et al., 2005; Bibby et al., 2016; Janes et al., 2021).

Le diagnostic du MPM repose sur des techniques d'imagerie et des examens histopathologiques.

Les techniques d'imagerie apportent des informations sur le stade de la tumeur. La radiographie et la tomodensitométrie constituent les premières techniques de diagnostic du MPM. Elles permettent de déterminer la présence d'effusion pleurale, les épaississements de la plèvre et la localisation de la masse (Bibby et al., 2016). L'imagerie par résonance magnétique apporte des informations plus détaillées sur l'invasion tumorale. De plus, lorsque le diagnostic reste incertain, d'autres méthodes plus invasives peuvent être utilisées, telles que la médiastinoscopie, la laparoscopie, l'échographie endobronchique et échographie endoscopique (Janes et al., 2021).

Des examens histopathologiques basés sur des biomarqueurs sont également réalisés afin de confirmer le diagnostic. L'examen de biopsie pleurale est souvent préféré à celui du fluide pleural (Janes et al., 2021). Il n'existe pas de biomarqueurs qui présentent une sensibilité et une spécificité suffisante dans le cas du MPM, ce qui nécessite, dès lors, l'utilisation d'un panel de biomarqueurs (Bibby et al., 2016). De plus, ils sont plus spécifiques et sensibles au sous-type épithélioïde que sarcomatoïde (Popat et al., 2022). Ces biomarqueurs permettent notamment de discriminer le MPM de l'adénocarcinome.

Cette discrimination est basée sur l'utilisation d'au moins deux marqueurs mésothéliaux (calrétinine, protéine tumorale de Wilms (*Wilm's tumor 1 antigen*), cytokératine 5/6, D2-40 (podoplanin)), devant être positifs, et deux marqueurs associés à l'adénocarcinome (facteur de transcription de la thyroïde, antigène carcinoembryonnaire, Ber-EP4), devant être négatifs (Janes et al., 2021). Dans le cas du sous-type sarcomatoïde, un marquage à la cytokératine doit être utilisé afin de discriminer ce sous-type du sarcome (Popat et al., 2022). D'autres biomarqueurs peuvent également être utilisés : la mésothéline, l'ostéopontine, la fibuline 3, BAP-1 (plus commun dans les tumeurs épithélioïdes), CDKN2A (plus commun dans les tumeurs sarcomatoïdes), NF2 et TP53 (Sinn et al., 2021; Popat et al., 2022).

Sur base de l'ensemble de ces analyses, le stade du MPM peut être catégorisé selon la classification UICC TNM (8^e version) (**Table 1**). La classification TNM correspond à une classification internationale permettant de regrouper les cancers selon leur extension anatomique. Les lettres TNM symbolisent la propagation du cancer sur le site de la tumeur primitive (T), dans les ganglions lymphatiques (N) ou dans les sites métastatiques (M). Cette classification permet de déterminer la meilleure option de traitement pour les patients (Janes et al., 2021).

Table 1. Classification TNM. Les lettres TNM symbolisent la propagation du cancer sur le site de la tumeur primitive (T), dans les ganglions lymphatiques (N) ou dans les sites métastatiques (M). Cette classification permet de déterminer la meilleure option de traitement pour les patients (Popat et al., 2022).

T	T _x	Primary tumor cannot be assessed
	T ₀	No evidence of primary tumor
	T ₁	Tumor involves the ipsilateral parietal or visceral pleura only, with or without involvement of visceral, mediastinal, or diaphragmatic pleura
	T ₂	Tumor involves the ipsilateral pleura (parietal or visceral pleura), with at least one of the following: <ul style="list-style-type: none"> • Invasion of diaphragmatic muscle • Invasion of lung parenchyma
	T ₃	Tumor involves ipsilateral pleura (parietal or visceral pleura), with at least one of the following: <ul style="list-style-type: none"> • Invasion of endothoracic fascia • Invasion into mediastinal fat • Solitary focus of tumor invading soft tissues of the chest wall • Non-transmural involvement of the pericardium
	T ₄	Tumor involves ipsilateral pleura (parietal or visceral pleura), with at least one of the following: <ul style="list-style-type: none"> • Chest wall, with or without associated rib destruction (diffuse or multifocal) • Peritoneum (via direct transdiaphragmatic extension) • Contralateral pleura • Mediastinal organs (esophagus, trachea, heart, great vessels) • Vertebra, neuroforamen, spinal cord • Internal surface of the pericardium (transmural invasion with or without pericardial effusion)
N	N _x	Regional lymph nodes cannot be assessed
	N ₀	No regional lymph node metastasis
	N ₁	Metastases to ipsilateral intrathoracic lymph nodes (includes ipsilateral bronchopulmonary, hilar, subcarinal, paratracheal, aortopulmonary, paraesophageal, peridiaphragmatic, pericardial fat pad, intercostal, and internal mammary nodes)
	N ₂	Metastases to contralateral intrathoracic lymph nodes. Metastases to ipsilateral or contralateral supraclavicular lymph nodes
M	M ₀	No distant metastasis
	M ₁	Distant metastasis MPM

Stage	T	N	M
IA	T ₁	N ₀	M ₀
IB	T ₂ , T ₃	N ₀	M ₀
II	T ₁ , T ₂	N ₁	M ₀
IIIA	T ₃	N ₁	M ₀
IIIB	T ₁ , T ₂ , T ₃ T ₄	N ₂ any N	M ₀ M ₀
IV	Any T	Any N	M ₁

1.8.2. Traitements

A l'heure actuelle, le MPM est incurable et ses moyens de traitement ne permettent l'allongement de la vie des patients que de quelques mois (Popat et al., 2022). Les différents traitements du mésothéliome incluent la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie et l'immunothérapie. Le choix du traitement du MPM est basé sur le sous-type histologique, le stade de la tumeur, le statut de performance, les comorbidités et les préférences du patient (Yap et al., 2017; Janes et al., 2021; Popat et al., 2022).

Chirurgie

La chirurgie est limitée aux patients présentant un stade précoce de la maladie ainsi qu'un statut fonctionnel correct. La chirurgie est utilisée à des fins curatives, visant à la guérison, ou palliative, visant au soulagement du patient (Robinson et al., 2005).

L'approche curative est basée sur la pneumonectomie extrapleurale. Elle correspond à une approche chirurgicale agressive, éradiquant toute la tumeur macroscopique (poumon, plèvre, péricarde et diaphragme) (Bibby et al., 2016). La médiane de survie associée à cette approche est de 18 mois avec un taux de survie à 5 ans de 14% (Janes et al., 2021).

La pleurectomie, quant à elle, constitue une approche palliative. Elle est basée sur l'enlèvement des tumeurs macroscopiques et de la plèvre. Elle est nommée « étendue » ou « radicale » selon que le diaphragme ou péricarde sont excisés (Mossman et al., 2013). Cette approche présente moins de complications que dans le cas de la pneumonectomie extrapleurale (Bibby et al., 2016).

La pleurodèse permet le drainage du liquide pleural suivi par l'instillation d'un agent, tel que le talc, dans l'espace pleural. Cette approche permet d'améliorer la respiration des patients (Mossman et al., 2013; Bibby et al., 2016).

Chimiothérapie

La chimiothérapie est une approche thérapeutique qui est basée sur l'administration d'agents chimiques, permettant d'inhiber la croissance tumorale ou d'induire la mort des cellules cancéreuses (Chauvergne and Hoerni, 2001). La chimiothérapie constitue une seconde option thérapeutique pour les patients non éligibles à une approche chirurgicale. Elle est utilisée à des fins palliatives (Ceresoli et al., 2019).

La chimiothérapie de première intention est basée sur l'administration de pemetrexed et de cisplatine. Le pemetrexed est un antifolate qui empêche la synthèse des déoxyribonucléotiques triphosphates en inhibant une série d'enzymes incluant la thymidylate synthase, la dihydrofolate réductase et la glycinamide ribonucléotide formyltransférase et bloque, dès lors, la synthèse de l'ADN, la réplication cellulaire et la réparation de l'ADN (Brossel et al., 2021). Le cisplatine, quant à lui, correspond à un complexe composé d'un atome de platine sur lequel sont fixés du chlore et de l'ammoniac. Le cisplatine forme un pontage à l'ADN en se liant avec les guanines par des liaisons covalentes. De cette manière, le cisplatine bloque la réplication de l'ADN dans la phase S du cycle cellulaire (Brossel et al., 2021). Cette thérapie est issue d'une

étude clinique de phase III (2003) qui a permis de démontrer l'intérêt de la combinaison du pemetrexed au cisplatine. En effet, cette combinaison permet l'amélioration de la médiane de survie globale (OS) (12.1 vs 9.3 mois) et de la survie sans progression de la maladie (PFS) (5.7 vs 3.9 mois) par rapport au cisplatine seul. De plus, ce traitement présente un taux de réponse (ORR) de 41% (Vogelzang et al., 2003). Cette thérapie est complétée par de la vitamine B12 et de l'acide folique afin de limiter le taux de toxicité associé au pemetrexed (Bibby et al., 2016). De plus, le carboplatine peut être substitué au cisplatine pour les patients âgés présentant des comorbidités ou qui ne tolèrent pas le cisplatine. Une étude en phase II a, en effet, démontré que le taux de contrôle de la maladie (DCR) ainsi que la OS étaient similaires au traitement associant le cisplatine au pemetrexed (Ceresoli et al., 2006). La chimiothérapie basée sur l'utilisation du cisplatine et pemetrexed a été approuvée par la FDA et constitue un premier traitement chimiothérapeutique standard pour les patients non-éligibles à l'approche chirurgicale (Scherpereel et al., 2020).

Cependant, un grand nombre de patients devient résistant au traitement et rechute rapidement. Dans ce cas, les patients peuvent être redirigés vers une thérapie de seconde ligne qui inclut d'autres agents cytotoxiques tels que des antimétabolites (gemcitabine), des vinca alcaloïdes (vinorelbine) et des inhibiteurs de topoisomérase (doxorubicine). Il semblerait que les thérapies de seconde ligne ne soient que modérément efficaces. En effet, une méta-analyse, basée sur 49 essais cliniques de seconde ligne, a révélé une OS de 8 mois, un ORR de 8% et une PFS de 3.4 mois (Petrelli et al., 2018). Actuellement, il n'y a encore aucun moyen de traitement chimiothérapeutique standard de deuxième intention.

Radiothérapie

La radiothérapie constitue une approche thérapeutique basée sur l'utilisation de rayons ionisants dans le but de limiter la prolifération tumorale (Ceresoli et al., 2019). Dans le cas du MPM, la radiothérapie est utilisée pour soulager les douleurs thoraciques des patients ou en vue d'une approche multimodale (Patel and Dowell, 2016; Scherpereel et al., 2020). Une étude en phase II a notamment étudié l'efficacité du traitement trimodal basé sur une induction chimiothérapeutique, une pneumonectomie extrapleurale associée à une radiothérapie hémithoracique. L'étude a montré une OS de 29.1 mois et a conclu que ce traitement trimodal pouvait être bénéfique pour certains patients (Bibby et al., 2016; Rimmer et al., 2016).

Immunothérapie

L'immunothérapie est une approche thérapeutique qui consiste à activer le système immunitaire de l'hôte ou à contourner les composés immunosuppresseurs du microenvironnement (Calabrò et al., 2018).

Récemment, une étude clinique en phase III (CheckMate 743) a démontré l'intérêt de la combinaison de deux inhibiteurs de points de contrôle ciblant PD-1 (nivolumab) et CTLA-4 (ipilimumab) par rapport à la chimiothérapie standard dans un traitement de première ligne chez les patients présentant une tumeur non résecable (Baas et al., 2021).

La combinaison nivolumab et ipilimumab permet d'atteindre une OS de 18.1 mois (14.1 mois) et au ORR de 40% (43%) (en comparaison à la chimiothérapie standard). De plus, la proportion de patients vivant après 3 ans est de 23% en immunothérapie, comparativement à 15% en chimiothérapie. L'immunothérapie s'est montrée particulièrement efficace dans le traitement des sous-types non épithélioïdes. Grâce à cet essai clinique, le traitement nivolumab-ipilimumab est devenu une nouvelle approche thérapeutique de première ligne chez les patients non résecables. Ce traitement a été approuvé par la FDA et par l'agence européenne des médicaments (EMA) sans restriction en ce qui concerne le statut PD-L1 et les sous-types histologiques (Popat et al., 2022).

2. Les monocytes

Le terme « monocyte » a été introduit par Artur Pappanheim en 1910 (Guilliams et al., 2018). Les monocytes sont des leucocytes mononucléaires qui sont principalement impliqués dans la réponse immunitaire innée. Ils constituent 10% des cellules mononucléées chez l'homme et 4% chez la souris. Ils sont majoritairement localisés dans le sang, mais peuvent également se retrouver dans les tissus tels que les poumons et la rate (Ginhoux and Jung, 2014; Guilliams et al., 2018; Jeong et al., 2019).

2.1. Développement des monocytes

2.1.1. En condition homéostatique

Les monocytes se développent à partir des cellules souches hématopoïétiques (HSCs). Les HSCs prennent leur origine dans la région aorte-gonade-mésonephros du mésoderme embryonnaire avant de proliférer dans le foie et de coloniser finalement la moelle osseuse à la naissance (Kurotaki et al., 2017). Les cellules souches sont caractérisées par leur capacité d'auto-renouvellement et de différenciation cellulaire. Les HSCs vont se différencier en monocytes en passant par une série de progéniteurs myéloïdes (**Figure 8**). Ces progéniteurs sont les *Common myeloid progenitors* (CMPs), les *Granulocyte-monocyte progenitors* (GMPs), les *Monocyte-macrophage/dendritic cell precursors* (MDPs) et finalement les *Common monocyte progenitors* (cMoPs). Les cMoPs, toujours capables de prolifération, vont finalement se différencier en monocytes (Kurotaki et al., 2017). Le foie, les poumons et la peau peuvent également servir de réservoir périphérique pour les monocytes en condition homéostatique. Ce réservoir monocyttaire est dit « extramédullaire ». La véritable contribution des réservoirs périphériques monocytaires n'est pas encore complètement comprise (Guilliams et al., 2018).

Le développement des monocytes est dirigé par l'expression progressive et séquentielle de facteurs de transcription tels que l'*Hematopoietic transcription factor* (PU.1), l'*Interferon regulatory factor 8* (IRF8), le *Kruppel like factor 4* (KLF4) et le *CCAAT Enhancer Binding Protein β* (C/EBP β) ainsi que via l'axe associé au *Colony stimulating factor 1 receptor/ Colony stimulating factor 1* et IL-34 (M-CSFR/M-CSF et IL-34) qui sont nécessaires à la différenciation, la survie et la prolifération des

monocytes (Feinberg et al., 2007; Kurotaki et al., 2013, 2017; Sichien et al., 2016; Olingy et al., 2019).

Les monocytes peuvent rejoindre la circulation sanguine et traverser les tissus par chimiotactisme où ils peuvent se différencier en macrophages et en cellules dendritiques. Leur contribution dans la maintenance de ces cellules reste cependant minoritaire en condition homéostatique (Ginhoux and Jung, 2014).



Figure 8. Développement des monocytes. Les HSCs se différencient en une série de progéniteurs : CMP, GMP, MDP et cMoP pour finalement donner les monocytes (Kurotaki et al., 2017).

2.1.2. En condition inflammatoire

En condition pathologique, l'inflammation conduit à un recrutement rapide des cellules myéloïdes sur le site inflammatoire. Cette inflammation stimule le développement et la mobilisation des cellules issues de la moelle osseuse et cause ainsi un « état d'urgence » (Canè et al., 2019). De plus, l'hématopoïèse extramédullaire se trouve également augmentée (Guilliams et al., 2018). Cette demande en monocytes est soutenue par une production accrue de facteurs de croissance myéloïdes, dont le facteur *Colony stimulating factor 2* (GM-CSF) et les cytokines IL-1 et IL-6 dirigeant également la myélopoïèse (Das Gupta et al., 2016). Une fois arrivés sur le site de l'inflammation, les monocytes peuvent se différencier en macrophages et en cellules dendritiques (Kurotaki et al., 2017). En condition inflammatoire, les monocytes deviennent la source majeure des macrophages au sein de la lésion (Das Gupta et al., 2016).

De plus, des études *in vivo* ont démontré que, en condition inflammatoire, la monopoïèse n'affectait pas seulement le nombre de monocytes mais également leurs fonctions. Ces conditions conduisent à la génération de monocytes qui court-circuitent la voie de développement originelle. Par exemple, il a été démontré que des monocytes Ly6C^{hi} neutrophile-like, ainsi que des monocytes SatM provenaient directement des précurseurs GMPs/FcεRI plutôt que des précurseurs cMoPs. Les monocytes SatM ne représentent qu'une fraction négligeable en condition homéostatique. Ces monocytes contiennent des granules, qui expriment des protéines associées aux granulocytes dont la myéloperoxydase (MPO) et la neutrophile élastase (NE), et semblent liés à une réponse fibrosique (Canè et al., 2019).

2.2. Hétérogénéité phénotypique

2.2.1. Sous-populations CD14-CD16 et plasticité phénotypique

Les monocytes représentent une population hétérogène, versatile et dynamique. En 1970, les techniques de détection fluorimétrique ont permis de discriminer les monocytes en trois sous-populations en fonction de l'expression de deux récepteurs : le *Cluster of differentiation 14* (CD14), agissant comme corécepteur de lipopolysaccharides (LPS) et le CD16, un récepteur de faible affinité de la partie constante Fc des immunoglobulines de types G (FcγRIII) (Kapellos et al., 2019; Olingy et al., 2019). Ces trois sous-populations sont les classiques (CD14^{hi} CD16⁻, chez l'homme ; Ly6C^{hi} CD43^{lo} CX3CR1^{lo}, chez la souris), les non-classiques (CD14^{low} CD16^{hi}, chez l'homme ; Ly6C^{lo}CD43^{hi}CX3CR1^{hi}, chez la souris) et les intermédiaires (CD14^{hi}CD16⁺ chez l'homme, Ly6C^{int} CD43⁺CX3CR1^{hi} chez la souris). Ces sous-populations diffèrent selon leur morphologie cellulaire et leur profil transcriptomique (Patel et al., 2017; Jeong et al., 2019; Olingy et al., 2019; Wolf et al., 2019).

Bien que la classification phénotypique de monocytes soit reconnue par la communauté scientifique, de nouvelles preuves scientifiques démontrent l'existence d'un continuum phénotypique (**Figure 9**) (Patel et al., 2017; Canè et al., 2019). La transition de monocytes classiques en monocytes non classiques a été démontrée en suivant l'accumulation de molécules de glucose marquées au deutérium et administrées en intraveineuse chez des patients sains ainsi que via le transfert de CD14⁺ chez des souris humanisées (Patel et al., 2017; Olingy et al., 2019).

Les monocytes classiques, également appelés inflammatoires, se présentent sous la forme d'une population homogène qui constitue 85% de la population des monocytes. Ils sont caractérisés par l'expression de récepteurs tels que les récepteurs *C-C Motif Chemokine Receptor 2* (CCR2^{hi}), CCR1, CCR5 et les récepteurs *C-X-C Motif Chemokine Receptor 1* (CXCR1) et CXCR2 (Wong et al., 2011; Williams et al., 2018; Kapellos et al., 2019; Olingy et al., 2019).

Les monocytes classiques se forment directement à partir de progéniteurs cMoPs. Cette transition est régulée par l'expression séquentielle des facteurs de transcription incluant l'IRF8 et le KLF4 (Feinberg et al., 2007; Kurotaki et al., 2017).

Les monocytes classiques sont recrutés dans la circulation sanguine via l'expression des ligands du CCR2, les CCL2, CCL7 et CCL12 où ils présentent un temps de survie moyen de 20 heures (Olingy et al., 2019). Une fois dans le sang, une partie de ces monocytes migrent vers les tissus où ils peuvent conserver leur phénotype non différencié dans les tissus et servir de réservoir local, entrer en apoptose ou se différencier en macrophages dérivés de monocytes ou en cellules dendritiques dérivés de monocytes. Cette différenciation est dépendante de l'expression du M-CSF, du GM-CSF, de la *Fm-related receptor tyrosine kinase 3* (Flt3) ainsi que des facteurs de transcription *MAF BZIP Transcription Factor B* (MAFB) et IRF4 (Jakubzick et al., 2017; Olingy et al., 2019).

Les monocytes intermédiaires représentent 5% de la population monocyttaire. Ils expriment fortement le récepteur CCR5 ainsi que le HLA-DR, ce qui les associe à la

fonction de CPA (Cros et al., 2010; Kapellos et al., 2019). Cette sous-population apparaît comme transitoire. Les monocytes intermédiaires sont les précurseurs des monocytes non classiques (Gamrekelashvili et al., 2016; Patel et al., 2017).

Les monocytes non classiques, également appelés patrouilleurs, constituent 10% de la population monocyttaire. Ils sont caractérisés par l'expression du CX₃CR1^{hi} (Kapellos et al., 2019). Leur temps de survie est de 7 jours, mais peut s'étendre à 2 semaines en fonction de la disponibilité en M-CSF (Guilliams et al., 2018). Les monocytes non classiques sont plus petits et moins granuleux que les monocytes classiques (Cros et al., 2010; Boyette et al., 2017).

Contrairement aux monocytes classiques, l'origine des monocytes non classiques n'est pas encore complètement comprise. Il semblerait qu'une partie des monocytes non classiques soit issue de la différenciation des monocytes classiques (Patel et al., 2017; Canè et al., 2019; Kapellos et al., 2019). Un modèle informatique prédit que seulement 1% des monocytes classiques se transforment en monocytes intermédiaires avant de devenir non classiques (Olingy et al., 2017; Patel et al., 2017). Le mécanisme associé à la conversion des monocytes classiques en non classiques est basé sur l'interaction de signaux de type delta 1 (Dll1) présents sur les cellules endothéliales avec le récepteur NOTCH2 situé sur les monocytes classiques. De plus, cette conversion nécessite également la surexpression de C/EBP- β , de *Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A Member 1* (NR4A1) et de KLF2 (Hanna et al., 2012; Gamrekelashvili et al., 2016; Patel et al., 2017; Guilliams et al., 2018; Canè et al., 2019; Kapellos et al., 2019; Olingy et al., 2019). Il semblerait, par ailleurs, qu'une partie des monocytes soit directement issue des cMoPs, indépendamment de leur transition via les monocytes classiques (Canè et al., 2019).

Les monocytes non classiques ne dépendent pas de l'expression de CCL2 pour atteindre la circulation sanguine. Contrairement aux monocytes classiques, les monocytes non classiques sont constamment en contact avec l'endothélium en condition homéostasique où ils jouent un rôle dans la surveillance de l'intégrité des cellules endothéliales. L'adhésion de ces monocytes est basée sur l'interaction de l'*Integrin Subunit Beta 2* (ITGB2, LFA-1), une intégrine β 2, présente à la surface endothéliale, avec le motif *Intercellular Adhesion Molecule* (ICAM) (Cros et al., 2010). De plus, l'expression du ligand (CX₃CL1) à la surface des cellules endothéliales avec le CX₃CR1 améliore l'adhésion des monocytes sur l'endothélium (Kratofil et al., 2017; Canè et al., 2019; Olingy et al., 2019).

Les monocytes non classiques apparaissent comme une population hétérogène. Effectivement, ils peuvent être subdivisés en deux sous-populations en fonction de l'expression du 6-sulfo LacNAc (Slan). Slan correspond à un résidu glucidique qui est attaché à la surface de la protéine *P-selectin glycoprotein ligand* (PSGL-1) présente à la surface monocyttaire. Les cellules Slan⁺ sont caractérisées par une forte expression de HLA-DR, CD11c, CD16 et CX₃CR1 ainsi qu'une faible expression de CD11b, CD14, CD33 et CD64 (Cros et al., 2010; Hofer et al., 2019; Jeong et al., 2019).

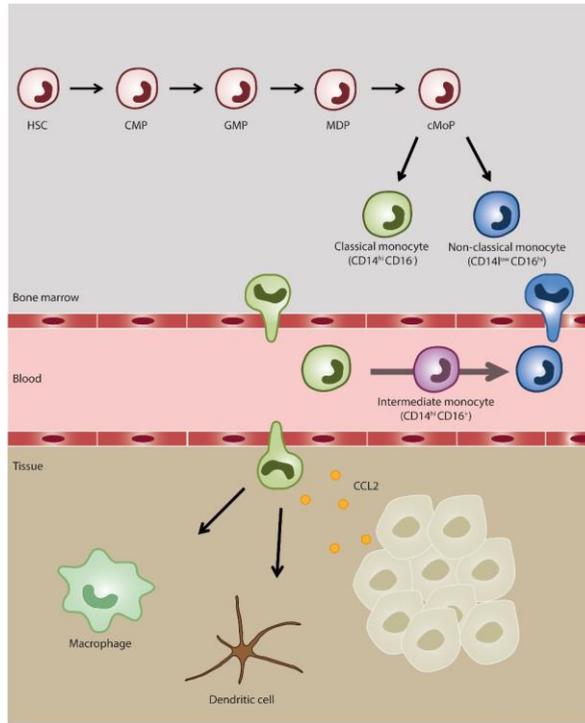


Figure 9. Sous-populations des monocytes et plasticité phénotypique. Les monocytes classiques proviennent directement des cMoPs alors que les monocytes non-classiques proviennent des cMoPs ainsi que des monocytes classiques. Les monocytes classiques sont dépendants du CCL2 pour atteindre le sang. Les monocytes peuvent ensuite rejoindre les tissus et se différencier en macrophages et en cellules dendritiques (Ginhoux and Jung, 2014).

2.2.2. Phénotype récemment découvert

Au-delà de la classification courante des sous-populations monocytaires basée sur les récepteurs CD14 et CD16, une nouvelle population de monocytes a été découverte au cours de ces dernières années. Cette population se distingue par l'expression du récepteur *Tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains* (Tie-2) (De Palma et al., 2005). Le récepteur Tie-2 est majoritairement exprimé par les monocytes intermédiaires (29%) suivis des classiques (12%), mais il n'est presque pas exprimé chez les monocytes non classiques (4%). De plus, ce récepteur est aussi bien exprimé chez les monocytes que les macrophages, suggérant qu'il soit conservé au cours de leur différenciation (Murdoch et al., 2007). Le récepteur Tie-2 se lie à l'angiopoïétine (ANG), un facteur de croissance vasculaire, notamment exprimé par les cellules cancéreuses, qui recrute les monocytes de par ses propriétés chimiotactiques. L'ANG favorise l'angiogenèse tumorale en induisant la sécrétion de facteurs tels que le VEGF, les MMPs, le bFGF et en induisant la sous-expression du TNF- α par les monocytes (Murdoch et al., 2007; Jeong et al., 2014; Olingy et al., 2019).

2.3. Fonctions des monocytes

2.3.1. Phagocytose

La phagocytose est un processus cellulaire au cours duquel un phagocyte internalise une particule ($> 0,5 \mu$) (Owen et al., 2013; Gordon, 2016). Les phagocytes professionnels incluent les neutrophiles, les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les ostéoclastes et les éosinophiles. Il existe deux types de phagocytoses qui se différencient par le type de reconnaissance directe (non opsonine) ou indirecte (opsonine) d'antigènes à la surface des phagocytes. La phagocytose opsonine est basée sur la reconnaissance de protéines solubles, dès lors qualifiées d'opsonines, incluant les anticorps (*Antibody-dependent cell-mediated phagocytosis*, ADCP) et les facteurs du système du complément, qui recouvrent la surface des microorganismes via les récepteurs associés au *Fragment cristallizable* (Fc) et les *Complement receptors* (CRs) présents à la surface des phagocytes (Flannagan et al., 2012). La phagocytose non opsonine, quant à elle, est basée sur la reconnaissance directe de motifs par les *Pattern recognition receptors* (PRRs) exprimés à la surface des phagocytes. Ces motifs correspondent, d'une part, aux motifs conservés exprimés par les pathogènes, appelés *Pathogen-associated molecular pattern* (PAMPs) tels que le LPS et les composants glucidiques et, d'autre part, ils correspondent aux ligands produits par les cellules mortes ou les cellules tumorales, appelés les *Damage-associated molecular pattern* ou alarmine (DAMPs), tels que la phosphatidylsérine externalisée et le HMGB1 (Garg et al., 2015). L'engagement de ces récepteurs déclenche une cascade de voie de signalisation intracellulaire qui amène à la polymérisation de l'actine. Cette polymérisation va induire la formation de pseudopodes permettant l'internalisation de l'agent pathogène et la génération d'un phagosome. Ce phagosome va fusionner avec un lysosome formant un phagolysosome. Le lysosome est composé d'hydrolases, de protéases, de radicaux oxygénés et azotés et de protéines antimicrobiennes (défensines) permettant la dégradation de l'agent pathogène phagocyté (**Figure 10**) (Flannagan et al., 2012).

Bien que les monocytes présentent une activité phagocytaire non négligeable, cette activité reste néanmoins réduite par rapport à celle des macrophages (Boyette et al., 2017). Chez les monocytes, la phagocytose opsonine implique les récepteurs CD14, Fc γ Rs (CD16, CD32, CD64) et les récepteurs des protéines du complément CR1 (CD35) et CR3 (CD11b/CD18) (Schlesinger and Horwitz, 1990). Ces récepteurs sont exprimés à différents niveaux au sein des sous-populations de monocytes. Les monocytes classiques expriment fortement le CD64 et faiblement le CD11b/CD18. Les monocytes intermédiaires expriment les deux récepteurs opsoniques CD16 et CD64 ainsi que le CD11b/CD18. Finalement, les monocytes non classiques expriment fortement le CD16 mais faiblement le CD64 (Idzkowska et al., 2015). Bien que certains chercheurs semblent associer la phagocytose opsonine aux monocytes non classiques, en raison de leur expression en CD16, une étude a démontré que les monocytes CD14+ présentaient également une forte capacité à phagocyter des particules d'E.coli opsonisées en présence de sérum humain. Dans cette étude, la phagocytose opsonine est dépendante de l'expression du CD14 ainsi que de la protéine de liaison au lipopolysaccharide (LBP) (Schiff et al., 1997; Wong et al., 2011; Kapellos and Iqbal,

2016). Les trois sous-populations de monocytes sont également capables de phagocytter des microbilles fluorescentes en l'absence d'opsonisation. Cependant, les études se contredisent en ce qui concerne l'identification de la sous-population qui présente la plus forte activité phagocytaire. Certains auteurs (Cros et al., Serbina et al., Shantsila et al.) affirment que les monocytes classiques et intermédiaires présentent une activité phagocytaire plus importante que les non classiques, alors que d'autres (Boyette et al.) soutiennent le fait que l'activité phagocytaire est équivalente chez les trois sous-populations (Cros et al., 2010; Serbina et al., 2010; Shantsila et al., 2011; Boyette et al., 2017).

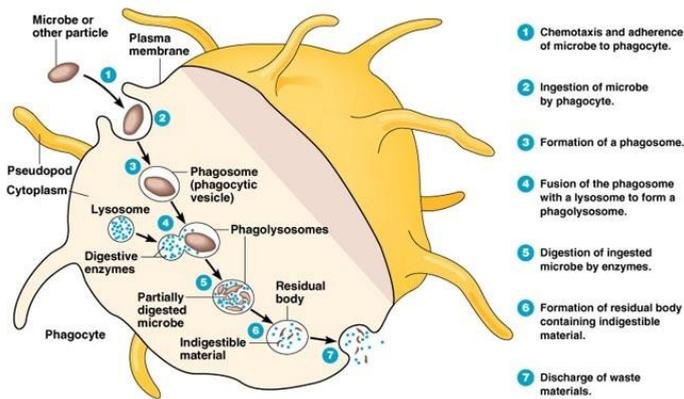


Figure 10. Etapes de la phagocytose. La reconnaissance de l'antigène, de manière directe (phagocytose non opsonine) ou indirecte via des opsonines (phagocytose opsonine), induit la formation de pseudopode qui internalise l'agent pathogène amenant à la formation d'un phagosome. Le phagosome se lie à un lysosome qui dégrade l'agent pathogène (Flannagan et al., 2012).

2.3.2. Présentation d'antigènes

Ce n'est qu'à partir de 1990 que les monocytes ont été considérés comme cellules présentatrices d'antigènes (CPAs).

De par leur expression élevée en gènes associés au CMH-II (HLA-DRA, HLA-DRB3, HLA-DRB5, HLA-DQB1, HLA-DPA1, HLA-DPB1), les monocytes intermédiaires sont considérés comme des CPAs, suivis par les monocytes non classiques (Cros et al., 2010; Geissmann et al., 2010; Ingersoll et al., 2010; Wong et al., 2011). Bien que certaines sous-populations expriment le CMH-II, la capacité des monocytes à présenter l'antigène reste encore sujet à débat. Certaines études considèrent que les monocytes présentent les antigènes d'une manière similaire aux cellules dendritiques alors que d'autres les considèrent comme de pauvres CPAs ou que leur rôle ne se limiterait qu'au transfert d'antigènes jusqu'aux ganglions lymphatiques ou à la rate (Jakubzick et al., 2013, 2017; Huang et al., 2020).

Selon les premières études, les monocytes, chargés en antigènes, migrent au sein de ganglions lymphatiques suivant deux voies. Les monocytes tissulaires, qui expriment le

CCR7, utilisent les vaisseaux lymphatiques afférents, alors que les monocytes sanguins, qui expriment le CD62L, passent par les veinules à l'endothélium épais (Jakubzick et al., 2017). Au sein des ganglions lymphatiques, les monocytes présentent l'antigène aux lymphocytes T via le CMH. Afin d'induire l'activation, l'expansion clonale et l'acquisition des fonctions effectrices des lymphocytes, la présentation d'antigènes doit se dérouler selon trois signaux. Le signal 1 implique l'interaction du TCR avec le complexe CMH-peptide, le signal 2 est basé sur l'interaction du CD80/CD86 avec le récepteur CD28 et finalement le signal 3 nécessite la production de médiateurs tels que l'IL-27 par la CPA (**Figure 11**) (Jakubzick et al., 2013, 2017).

A l'inverse, Cros, et al. a démontré que les différentes sous-populations de monocytes étaient incapables de présenter l'antigène associé à la toxine tétanique aux cellules T autologues, contrairement aux cellules dendritiques (Cros et al., 2010).

Parallèlement, une étude (Huang et al., 2020) basée sur l'injection de monocytes exogènes préalablement chargés en antigènes d'ovalbumine ou de mélanome dans un modèle murin, a démontré le rôle limité de fonction de présentation d'antigènes des monocytes. Dans cette étude, bien que les monocytes aient été capables de se charger en antigènes via un mécanisme de dégradation phagoendosomale (*ex vivo*) et de rejoindre la rate après leur injection, ils n'ont pas été capables de présenter les antigènes directement aux cellules T CD8+, mais passaient plutôt par l'intermédiaire de DCs endogènes. Dans ce cas, le transfert antigénique des monocytes vers les cellules DC s'est produit via un contact cellulaire nécessitant une jonction connectine 43. L'étude a également démontré que grâce à ce transfert antigénique, les DCs endogènes pouvaient ultérieurement cross-présenter l'antigène aux cellules T CD8+ permettant leur activation et leur expansion clonale. Il est important de souligner que l'efficacité antitumorale associée aux monocytes exogènes était supérieure à celles des vaccins basés sur des DCs. Cette étude permet, dès lors, de démontrer que, malgré l'incapacité des monocytes à jouer un rôle dans la présentation d'antigènes, ils sont capables de promouvoir la réponse antitumorale des CTLs en véhiculant les antigènes aux DCs endogènes (Huang et al., 2020).

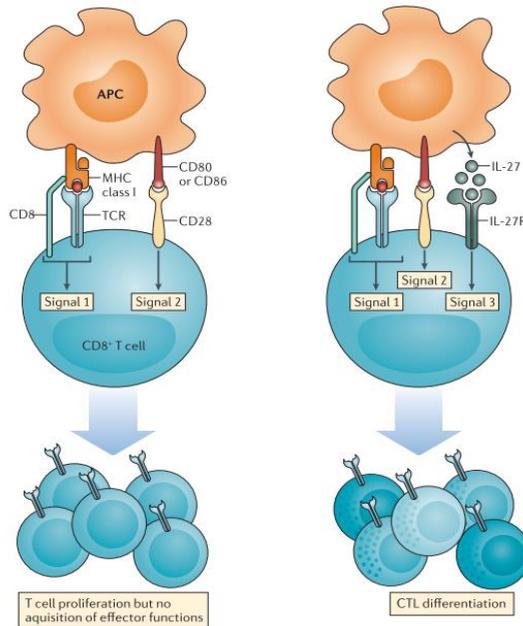


Figure 11. Présentation d'antigènes. Les monocytes présentent l'antigène aux lymphocytes T via CMH-I. Afin d'induire l'activation, l'expansion clonale et l'acquisition des fonctions effectrices des lymphocytes, la présentation d'antigènes doit se dérouler selon trois signaux. Le signal 1 implique l'interaction du TCR avec le complexe CMH-I-peptide, le signal 2 est basé sur l'interaction du CD80/CD86 avec le récepteur CD28 et finalement le signal 3 nécessite la production de médiateurs tels que l'IL-27 par la CPA. L'absence de signal 3 empêche l'acquisition des fonctions effectrices des lymphocytes T (Jakubzick et al., 2013, 2017).

2.3.3. Production de cytokines

Les cytokines correspondent à des protéines de faible masse moléculaire. Elles sont essentiellement présentes sous forme soluble, mais certaines existent sous forme membranaire (Owen et al., 2014). Les cytokines jouent un rôle dans la communication des cellules du système immunitaire et contrôlent leur survie, leur prolifération, leur différenciation et leur fonction effectrice (Lee and Margolin, 2011; Waldmann, 2018). Chez les monocytes, la production de cytokines peut-être déclenchée en présence de stimuli tels que les différents agonistes des *Toll Like Receptors* (TLRs) (Belge et al., 2002). Les cytokines sécrétées par les monocytes incluent le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-8, l'IL-10, le CCL2, le CCL3 et le *Colony Stimulating Factor 3* (G-CSF). Le TNF- α (53 kDa) joue un rôle dans la croissance et la différenciation cellulaire. De plus, il exerce un rôle cytotoxique contre un grand nombre de cellules transformées telles les cellules tumorales (Belge et al., 2002; Szaflarska et al., 2004; Owen et al., 2014). L'IL-1 β (17,3 kDa) est une puissante cytokine pro-inflammatoire qui joue un rôle central dans la défense de l'hôte en cas d'infection ou de blessure (Lopez-Castejon and Brough, 2011; Owen et al., 2014; Stammer et al., 2015). L'IL-6 (26 kDa) est une cytokine pro-inflammatoire qui stimule la maturation des cellules B et la différenciation des cellules

T cytotoxiques (Naka et al., 2002). L'IL-8 (6-8 kDa) agit comme chemoattractant et activateur des neutrophiles (Owen et al., 2014). L'IL-10 (35-40 kDa) est une cytokine anti-inflammatoire qui bloque la génération de la sous-population T_H1 des lymphocytes T auxiliaires, mais joue un rôle dans la prolifération des lymphocytes B, des thymocytes et des mastocytes (Owen et al., 2014). Le CCL2 (11 kDa) est une chimiokine qui attire les leucocytes sur le site de l'infection. Son rôle chemoattractant a d'abord été découvert chez les monocytes, mais s'est ensuite étendu aux cellules T et B, NKs, basophiles, macrophages, DCs, MDSCs et neutrophiles (Gschwandtner et al., 2019). Le CCL3 (10 kDa) correspond à une chimiokine qui mobilise les cellules issues de la lignée monocyttaire ainsi que les lymphocytes vers le site inflammatoire. De plus, le CCL3 régule la prolifération des cellules progénitrices et des cellules souches hématopoïétiques dans la moëlle osseuse (Baba and Mukaida, 2014). Finalement, le G-CSF (22 kDa) est une cytokine indispensable à la croissance et à la différenciation des neutrophiles (Roberts, 2005; Owen et al., 2014).

Aux sein des sous-populations de monocytes, les monocytes classiques semblent être les plus grands producteurs de cytokines par rapport aux monocytes non classiques (Wong et al., 2011; Boyette et al., 2017). La contribution de la sécrétion d'une cytokine particulière à une sous-population est très controversée au sein de la communauté scientifique (**Table 2**) (Frankenberger et al., 1996; Belge et al., 2002; Cros et al., 2010; Serbina et al., 2010; Wong et al., 2011; Elavazhagan et al., 2015; Boyette et al., 2017). De plus, elle varierait en fonction de l'origine du stimulus. Par exemple, Cros et al., démontre qu'en présence de lipopolysaccharide (LPS), un agoniste du TLR4, les monocytes non classiques sont des faibles producteurs de TNF- α et d'IL-1 β , par contre en présence de 3M2 (TLR8) et 3M13 (TLR7), la sécrétion de ces cytokines augmenterait significativement (Cros et al., 2010). Le tableau ci-dessous illustre la variabilité des résultats corrélant la sécrétion de cytokines par rapport à une sous-population particulière en réponse au LPS.

Table 2. Production de cytokines par les monocytes. Le tableau illustre la variabilité de résultats associés à la sécrétion des cytokines en réponse au LPS. Les cases vertes représentent la/les sous-population(s) observée(s) comme le(s) plus grand(s) producteur(s) de cytokines selon l'article.

Cytokines (pg/mL x 10 ³)	Classiques	Intermédiaires	Non classiques	Références
TNF- α	< 1000	5500	1500	Cros et al., 2010
	30000	< 20000	30000	Wong et al. , 2011
	1000	1000	<200	Boyette et al. , 2017
IL-1 β	< 1000	6500	<1000	Cros et al., 2010
	3500	3500	5000	Wong et al. , 2011
	1000	500	<250	Boyette et al. , 2017
CCL2	6000	<1000	<1000	Cros et al., 2010
	10000	0	0	Wong et al. , 2011
IL-10	200	125	<50	Cros et al., 2010
	200	50	50	Wong et al. , 2011
IL-8	100000	40000	< 5000	Cros et al., 2010
	40000	40000	40000	Wong et al. , 2011
IL-6	12000	14000	<2000	Cros et al., 2010
	100000	60000	75000	Wong et al. , 2011
	80000	4000	<500	Boyette et al. , 2017

2.3.4. Production de substances réactives

Les monocytes sont capables de générer des ROS et RNS (**Figure 12**) (Cros et al., 2010; Veglia et al., 2019).

Les ROS incluent les radicaux superoxyde ($\bullet\text{O}_2^-$) et hydroxyle ($\bullet\text{OH}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le peroxyde (ROOR) ainsi que l'hydroperoxyde (ROOH) (Eruslanov et al., 2010). Les ROS sont produits par la NADPH oxydase (également appelé phox) qui est un complexe enzymatique formé de deux protéines membranaires (gp91-phox et p22-phox) et de trois protéines cytosoliques (p47-phox, p67-phox et Rac) (Fang, 2004). Cette enzyme catalyse le transfert d'un électron venant du NADPH vers le dioxygène (O_2), générant l' $\bullet\text{O}_2^-$. La superoxyde dismutase peut ensuite convertir $\bullet\text{O}_2^-$ en H_2O_2 . Chez les monocytes, la génération de ROS est stimulée en présence de cytokines telles que le TNF- α et le GM-CSF. Les ROS causent des dommages aux biomolécules incluant les lipides, les protéines et l'ADN (Thanan et al., 2015). Parmi les monocytes, les monocytes classiques ainsi que les M-MDSCs sont les principaux producteurs de ROS, bien que cette production soit largement inférieure à celle des macrophages ou des neutrophiles (Fang, 2004; Cros et al., 2010; Veglia et al., 2019).

Les RNS incluent le monoxyde et le dioxyde d'azote (NO et NO_2). Ils sont générés à partir de l'*Inductible nitric oxide synthase* (iNos) (Owen et al., 2014; Thanan et al., 2015). Cette enzyme correspond à un homodimère. Chaque monomère est constitué d'un domaine réductase associé à une partie carboxyterminale et un domaine oxygénase

associé à une partie aminoterminal. Grâce à ces domaines, iNos utilise la L-arginine (substrat) ainsi que le NADPH et une molécule d'oxygène pour générer du NO et de la L-citrulline (Förstermann and Sessa, 2012). Les RNS causent des dommages aux lipides, aux protéines et à l'ADN (Thanan et al., 2015). Le NO peut ultérieurement réagir avec l'anion superoxyde pour former le peroxy-nitrite, un puissant oxydant (Förstermann and Sessa, 2012). Chez les monocytes, les M-MDSCs sont capables de produire du NO (Canè et al., 2019; Veglia et al., 2019).

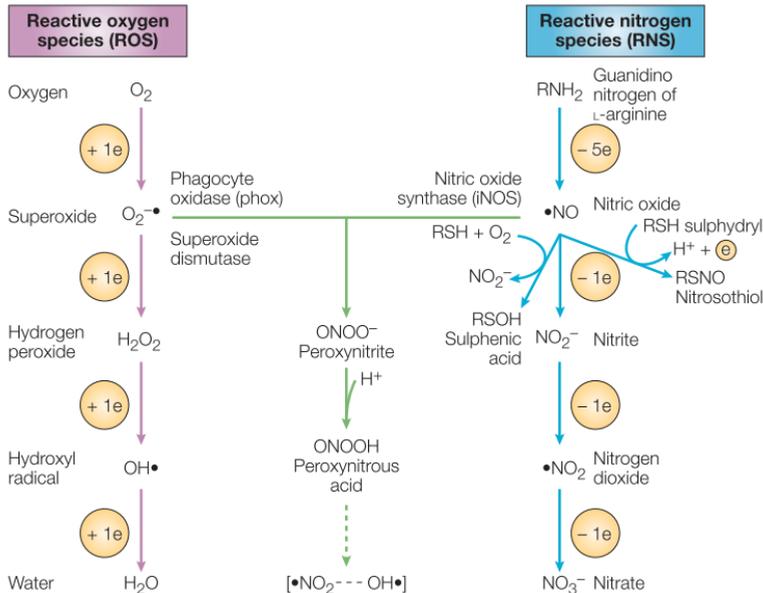


Figure 12. Production de ROS et RNS par les monocytes. Les ROS sont produits via l'activité de la NADPH oxydase alors que la production de RNS est dépendante de iNOS. Le NO peut ultérieurement réagir avec l'anion superoxyde pour former le peroxy-nitrite (Fang, 2004).

2.3.5. ADCC

La cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) est un mécanisme de défense immunitaire selon lequel une cellule cytotoxique non spécifique, exprimant des récepteurs de Fc, reconnaît l'anticorps associé à un antigène présent sur la cellule cible et la lyse (**Figure 13**). Les cellules capables d'ADCC sont les NKs, les macrophages, les monocytes, les neutrophiles et les éosinophiles (Strohl, 2012; Owen et al., 2014).

Selon la littérature, aussi bien les monocytes CD16+ que les CD14+ sont capables d'exercer l'ADCC. Lors de leur interaction avec des cellules tumorales par l'intermédiaire d'anticorps, les monocytes CD16+ sécrètent du TNF- α et induisent leur mort cellulaire (Yeap et al., 2016). Parmi, les monocytes non classiques, les S1an+ semblent capables d'exercer la fonction d'ADCC via le CD16 et le CD32 (Yeap et al., 2016; Vermi et al., 2018). De plus, les monocytes CD14+ stimulés en présence

d'agoniste du TLR8 induisent l'ADCC en sécrétant des granules cytotoxiques tels que le granzyme B (Elavazhagan et al., 2015).

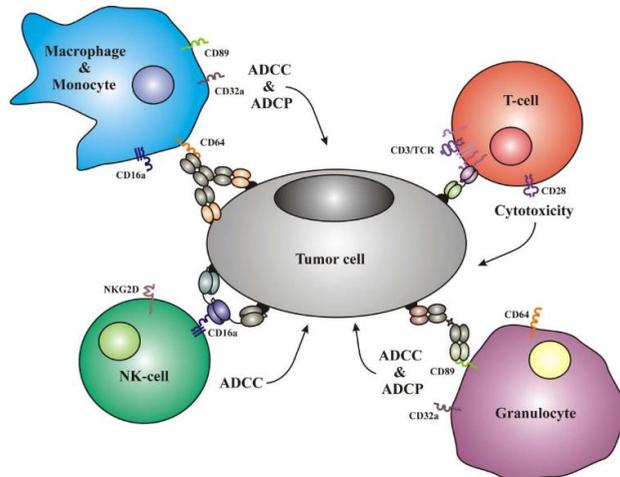


Figure 13. ADCC chez les monocytes. Au moyen des récepteurs de Fc, les monocytes reconnaissent les anticorps associés à un antigène présent sur la cellule cible et la lyse en sécrétant du TNF- α et des granzymes B (Stein et al., 2012; Elavazhagan et al., 2015; Yeap et al., 2016).

2.4. Monocytes dans le MPM

Un taux élevé de monocytes circulants est associé à un mauvais pronostic chez les patients atteints du MPM (Burt et al., 2011).

Dans le MPM, les monocytes peuvent rester à l'état non différenciés ou se différencier en macrophages et en cellules dendritiques, bien que la présence tumorale altère véritablement le phénotype des monocytes. Effectivement, l'environnement tumoral favorise la génération des M-MDSCs et des TAMs (**Figure 14**) (Veglia et al., 2019).

Les M-MDSCs ont plusieurs origines. Ils peuvent provenir des cMoPs ainsi que directement des monocytes (Millrud et al., 2017; Tcyganov et al., 2018). Dans le premier cas, l'accumulation des M-MDSCs est dirigée par deux signaux. Le premier signal est responsable de l'expansion de cellules myéloïdes immatures. Il est induit par une série de facteurs produits au sein de la tumeur tels que le GM-CSF, G-CSF, M-CSF, *Stem cell factor* (SCF), VEGF et les acides gras polyinsaturés (PUFAs). Le deuxième signal convertit ces cellules en une population immunosuppressive. Ce second signal est induit par les cytokines inflammatoires ainsi que les DAMPs dont IFN- γ , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-13, TNF, HMGB1 et les ligands des TLRs (Tcyganov et al., 2018; Veglia et al., 2019). Dans le second cas, les M-MDSCs proviennent directement des monocytes sanguins qui acquièrent un phénotype immunosuppresseurs. Cette différenciation de monocytes peut se produire lors d'une inflammation excessive ou prolongée, afin de limiter l'effet nuisible d'une réponse inflammatoire. Le mécanisme moléculaire associé

à cette différenciation est basée sur la répétition des signaux du TLR et des cytokines dont l'IL-10, *Wnt Family Member 5A* (Wnt5a), *Prostaglandin E2* (PGE₂). Cette répétition de signaux biaise la formation des sous-unités hétérodimères de NF-κB (p65:p50) associées à des propriétés pro-inflammatoires, amenant à la formation des sous-unités homodimères de NF-κB (p50:p50) associées à des propriétés immunosuppressives (Millrud et al., 2017). Il semblerait que cela soit les monocytes classiques qui apparaissent comme les précurseurs des M-MDSCs (Olingy et al., 2019). De plus, après leur migration dans la tumeur, les M-MDSCs peuvent se différencier en TAMs et en DCs inflammatoires, suite à une augmentation de l'activité tyrosine phosphatase qui résulte en une diminution de l'activité STAT3 (Tcyganov et al., 2018; Veglia et al., 2019).

Les TAMs peuvent également directement provenir des monocytes. Dans ce cas, les monocytes classiques apparaissent comme étant la source majoritaire (Olingy et al., 2019). Cette différenciation est menée via la voie (M-CSFR, M-CSF, IL-34) (Cornelissen, 2015). Cependant, il est important de souligner que bien que les TAMs soient majoritairement issus des monocytes et des M-MDSCs, les macrophages résidents tissulaires sont également impliqués dans leur génération (Tcyganov, E, 2018).

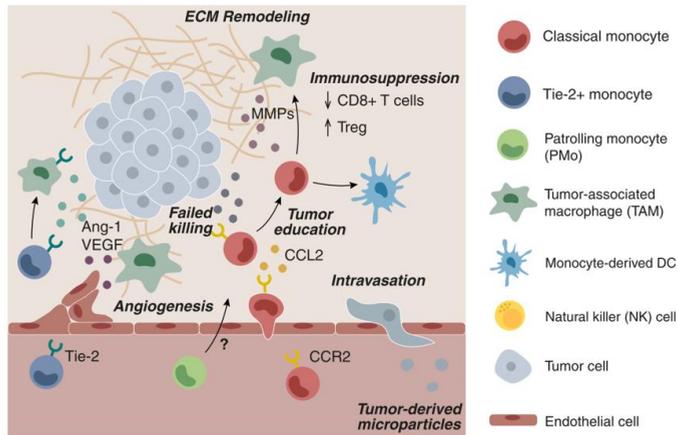


Figure 14. Monocytes dans le MPM et leur recrutement. Les monocytes classiques sont principalement recrutés via l'axe CCR2/CCL2 afin de rejoindre l'environnement tumoral. L'environnement tumoral induit leur différenciation en macrophages (TAMs), en DCs inflammatoires et en MDSCs (Olingy et al., 2019).

2.4.1. Recrutement des monocytes dans le MPM

Les cellules composant le microenvironnement tumoral produisent un ensemble de facteurs chimiotactiques qui vont recruter les monocytes au sein de la tumeur. Ces facteurs incluent le CCL2, CCL4, CCL5 et CXCL12, M-CSF, CX₃CL1 (Chéné et al., 2016; Tcyganov et al., 2018; Chu et al., 2019; Jeong et al., 2019). De plus, l'hypoxie tumorale favorise également le recrutement des monocytes via la sécrétion de VEGFβ, de *Phosphatidylinositol Glycan Anchor Biosynthesis Class F* (PIGF) et de l'ANG-1 et 2 (Tabata et al., 2010; Canè et al., 2019). Le CCL2 représente la chimiokine majeure

qui est impliquée dans le recrutement des monocytes et plus particulièrement des monocytes classiques. Un taux de CCL2 est significativement plus élevé chez les patients atteints de MPM et augmente avec le stade de la tumeur (Chéné et al., 2016; Kishimoto et al., 2019). De plus, le taux de CCL2 est également élevé dans le liquide pleural de patients atteints de MPM (Gueugnon et al., 2011).

3. Epigénétique

3.1. Généralités

L'épigénétique correspond à l'ensemble des modifications post-traductionnelles qui gouvernent l'accessibilité des gènes sans pour autant modifier la séquence nucléotidique. Les modifications épigénétiques sont réversibles et héréditaires (Vandermeers et al., 2013).

L'ADN est organisé sous forme de chromatine (**Figure 15**). La chromatine est enroulée autour d'un octamère d'histones, constitué de deux exemplaires des histones H2A, H2B, H3 et H4, le tout formant un nucléosome (147 paires de bases) (Banik et al., 2019). Deux nucléosomes sont séparés par de l'ADN (50 pb) et sont connectés par l'histone H1. La chromatine peut être compactée (hétérochromatine) ou relâchée (euchromatine). L'hétérochromatine bloque l'accès aux facteurs de transcription empêchant, dès lors, la transcription. A l'inverse, l'euchromatine est caractérisée par une transcription active (Chen et al., 2020).

Les histones sont des protéines qui possèdent un domaine globulaire carboxy-terminal, formant le nucléosome, et une queue amino-terminale présente à la surface du nucléosome. Cette queue amino-terminale peut subir diverses modifications qui vont influencer l'état de compaction de la chromatine et dès lors le niveau d'expression des gènes. Ces modifications sont dites épigénétiques (Banik et al., 2019).

Les modifications épigénétiques majeures sont la méthylation de l'ADN et la méthylation et l'acétylation des histones (Soria-Castro et al., 2019). Ces modifications sont réalisées par le biais d'enzymes dont les ADN méthyltransférases (DNMTs), les histones méthyltransférases (HMTs) et déméthylases (HDMs), et les histones acétyltransférases (HATs) et déacétylases (HDACs) (Vandermeers et al., 2013).

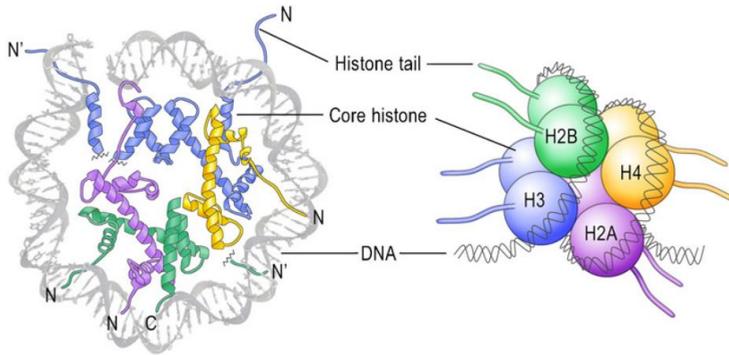


Figure 15. Organisation de la chromatine. La chromatine est enroulée autour d'un octamère d'histones formé par deux exemplaires des histones H2A, H2B, H3 et H4, le tout formant un nucléosome. Les histones sont des protéines qui possèdent un domaine globulaire carboxy-terminal, formant le nucléosome, et une queue amino-terminale présente à la surface du nucléosome (Gräff and Mansuy, 2008).

3.2. Méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN se produit au niveau de la région dinucléotidique (5'-cytosine-phosphate-guanine-3'), également appelée « îlot CpG ». Les DNMTs catalysent l'addition d'un groupement méthyle, qui provient de la S-adenosyl-L-méthionine, sur le carbone 5 de la cytosine générant le 5'méthylcytosine. L'ajout d'un groupement méthyle sur l'ADN conduit à une répression transcriptionnelle des gènes.

Chez les mammifères, il existe trois DNMTs qui présentent une activité catalytique: la DNMT1, la DNMT3A et la DNMT3B (Hoeksema and de Winther, 2016). La DNMT1 est la DNMT la plus exprimée dans le MPM (85-90% des DNMTs totales). Elle correspond à une méthyltransférase de maintien qui permet de dupliquer le brin d'ADN hémi-méthylé lors de la réplication (Vandermeers et al., 2013; Saldívar-González et al., 2018). Les DNMT3A et DNMT3B agissent sur les brins non méthylés uniquement (Saldívar-González et al., 2018).

Les DNMTs sont formées de 2 domaines, un grand et un petit séparé par une fente liant l'ADN (Ryazanova et al., 2012). Le plus grand domaine est constitué de deux parties dont la première contient la S-adenosyl-L-méthionine, qui agit comme cofacteur, et la seconde forme le site de liaison de la cytosine cible. Le deuxième domaine contient la région *Target recognition domain* (TRD) qui présente une séquence spécifique au substrat. Ce domaine varie en taille et en structure spatiale (Ryazanova et al., 2012).

Les DNMTs sont dérégulées dans de nombreux types de cancers, tels que le cancer du poumon, du sein, de l'estomac, du colon ainsi que la leucémie. Dans le MPM, les DNMT1, DNMT3A et DNMT3B sont surexprimées. De plus, un grand nombre de gènes sont hyperméthylés (McLoughlin et al., 2017). L'hyperméthylation des gènes suppresseurs de tumeur et la surexpression des DNMTs semblent dès lors jouer des rôles clés dans la carcinogenèse (Gnyszka et al., 2013).

La modulation de la méthylation de l'ADN est également impliquée dans le développement et les fonctions des cellules immunitaires. Par exemple, le niveau de méthylation de l'ADN diminue fortement dans les processus de différenciation des

monocytes en macrophages et en DCs (**Figure 16**) (Álvarez-Errico et al., 2015). Parallèlement, l'hyperméthylation de SOCS1 dirigée par la DNMT1 amène à une augmentation de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires induites par le LPS telles que le TNF- α et l'IL-6. La DNMT1 peut également induire l'hyperméthylation de Notch1, de PU.1 et de *Kinesin Family Member 4* (KIF4) induisant la polarisation des macrophages vers un phénotype M1 (Chen et al., 2020). Finalement, la DNMT3B régule également la polarisation des macrophages en changeant le niveau de méthylation d'ADN du *Peroxisome Proliferator Activated Receptor* (PPAR γ 1). L'inhibition de DNMT3B favorise la polarisation des macrophages en M2 et supprime l'inflammation (Yang et al., 2014).

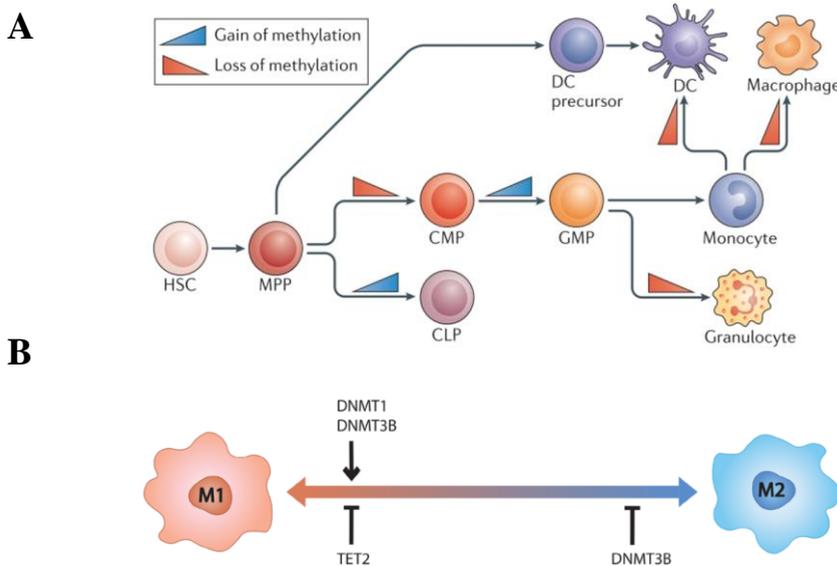


Figure 16. Implication de la méthylation de l'ADN dans la différenciation des cellules immunitaires. A. La différenciation des monocytes en macrophages et en DCs est majoritairement menée par une perte de méthylation de l'ADN. B. Les enzymes DNMT1 et DNMT3B sont également impliquées dans la polarisation en macrophages M1 (Álvarez-Errico et al., 2015; de Groot and Pienta, 2018).

3.2.1. Inhibiteurs de DNMTs

La répression transcriptionnelle des DNMTs peut être empêchée au moyen d'inhibiteurs de DNMTs (DNMTi). Il existe 2 catégories de DNMTi : Les inhibiteurs nucléosidiques et non nucléosidiques.

Les inhibiteurs nucléosidiques incluent le 5-azacytidine, le 5-aza-2'déoxycytidine (décitabine) et la zébularine (**Figure 17**). La 5-azacytidine et la décitabine correspondent à des analogues de la cytidine qui présentent une modification (nitrogène) sur la position 5 du noyau pyrimidique. L'5-azacytidine est un ribonucléotide qui est incorporé dans l'ARN et en moindre quantité dans l'ADN alors que la décitabine correspond à un déoxyribose qui n'est incorporé que dans l'ADN. La zébularine, quant

à elle, correspond à un analogue de nucléoside qui ne présente pas de groupement aminé en position 4 du noyau pyrimidique. La zébularine est incorporée dans l'ADN. De plus, elle apparaît plus stable que les précédentes DNMTi et présente une faible cytotoxicité (Gnyszka et al., 2013; Marques-Magalhães et al., 2018).

Le fonctionnement des DNMTi est basé sur le fait que l'azote en position 5 des DNMTi intégré dans l'ADN interagit avec la DNMT par des liaisons covalentes et empêche le dénouement du complexe (DNMTi-ADN et DNMT) et ses réactions futures. Le complexe non fonctionnel est détruit par dégradation protéasomique. La DNMT est bloquée, les cellules filles après réplication, sont dès lors inhibées (Gnyszka et al., 2013). Afin d'être actives, les DNMTi doivent être intégrées dans le génome de cellules proliférant rapidement au cours de la phase S du cycle cellulaire (Gnyszka et al., 2013). L'utilisation de ces DNMTi a déjà été étudiée dans le cadre du MPM. Effectivement, des évidences montrent que le traitement avec la décitabine augmente l'expression de NY-ESO-1, MAGE-A1 et MAGE-A3 dans les cellules de MPM (Leclercq et al., 2011; Lofiego et al., 2021). De plus, la décitabine diminue la survie des cellules de MPM et initie la sénescence en surrégulant la *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A* (p21) ainsi qu'en bloquant les cellules en phase G2/M lors du cycle cellulaire (Vandermeers et al., 2013).

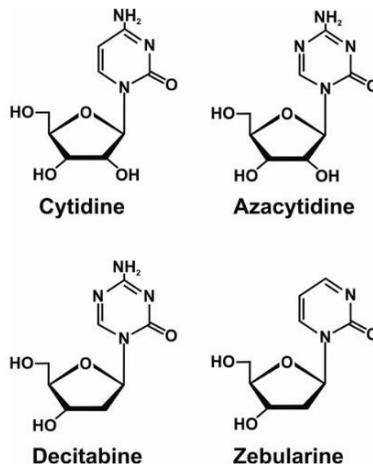


Figure 17. Inhibiteurs nucléosidiques de DNMTs. L'azacytidine, la décitabine et la zébularine correspondent à des analogues de la cytidine (Gnyszka et al., 2013).

Les inhibiteurs non-nucléosidiques, quant à eux, sont souvent moins efficaces pour inhiber les DNMTs, mais également moins toxiques. Ces inhibiteurs incluent le gallate d'épigallocatechine (Epigallocatechin-3-gallate, EGCG), la curcumine, la procaïne et l'RG108. Ces inhibiteurs bloquent le site actif de l'enzyme ou se fixent sur les régions CpG de l'ADN empêchant la liaison du DNMT sur l'ADN. Des preuves expérimentales montrent que l'EGCG induit l'apoptose des cellules de MPM via l'ouverture de canaux de Ca^{2+} de type T dépendent du H_2O_2 . De plus, la curcumine induit l'apoptose via un mécanisme qui implique la kinase *Mitogen-Activated Protein Kinase 14* (p38), les

caspases 3 et 9 ainsi que *BCL2 Associated X* (Bax) et *Poly(ADP-Ribose) Polymerase* (PARP) (Vandermeers et al., 2013; Zagni et al., 2013; Marques-Magalhães et al., 2018).

3.3. Méthylation des histones

Les histones H3 et H4 présentent des lysines et des arginines sur leur extrémité amino-terminale qui peuvent être méthylées par les HMTs ou déméthylées par les HDMs. La méthylation des histones est corrélée à une activation ou une répression selon sa localisation. En effet, les triméthylations de H3K4, de H4K36 et de H3K79 sont associées à une activation alors que les triméthylations de H3K9, de H3K27 et de H4K20 sont associées à une répression de gènes (Zagni et al., 2013; Hamaidia et al., 2016; Chen et al., 2020). La méthylation des histones modifie le niveau de basicité, d'hydrophobicité et d'affinité avec d'autres protéines, telles que les facteurs de transcription, sur l'ADN. Les HMTs sont des enzymes qui catalysent le transfert d'un groupement méthyle venant d'une S-adénosyl-L-méthionine sur un résidu lysine ou arginine des histones. Il existe trois familles d'HMT : Les protéines contenant un domaine SET, les protéines de type DOT1 et les protéines appartenant à la famille des arginine N-méthyltransférases. Les deux premières familles sont responsables de la méthylation des lysines. Le groupement amine des lysines peut être méthylé entre 1 à 3 fois. La dernière famille catalyse la méthylation des arginines. Le groupement guanidyle des arginines ne peut être méthylé qu'une à deux fois seulement (Hoeksema, M, 2016).

Parmi les HMTs, l'*Enhancer of Zeste Homolog 2* (EZH2) constitue le cœur du *Polycomb Repressive Complex 2* (PCR2) et catalyse la triméthylation de H3K27 qui est associée à une répression transcriptionnelle. EZH2 est surexprimé dans le MPM et sa surexpression limite la survie des patients de MPM. EZH2 est impliqué dans plusieurs activités biologiques telles que la progression du cycle cellulaire, l'autophagie, l'apoptose, la sénescence et la réparation des dommages de l'ADN (Mola et al., 2021).

À l'inverse, la *Lysine Demethylase 6B* (JMJD3) agit en tant HDM de H3K27me3 qui induit l'activation transcriptionnelle des gènes. L'expression de JMJD3 est induite par le facteur de transcription NF- κ B en réponse aux stimuli microbiens. JMJD3 contribue à l'expression des gènes pro-inflammatoires bien qu'il ait été montré que son inactivation génique ne biaise pas leur production (De Santa et al., 2007, 2009; Hamaidia et al., 2016; Hoeksema and de Winther, 2016). De plus, il semblerait que le JMJD3 ne soit pas nécessaire à la polarisation des macrophages de phénotype M1, mais soit indispensable à la polarisation en M2. Effectivement, l'utilisation de souris JMJD3^{-/-} a permis de déterminer l'implication de JMJD3 dans l'induction de la différenciation et la polarisation des macrophages M2 dépendante de IRF4 (**Figure 18**) (Satoh et al., 2010; Hamaidia et al., 2016).

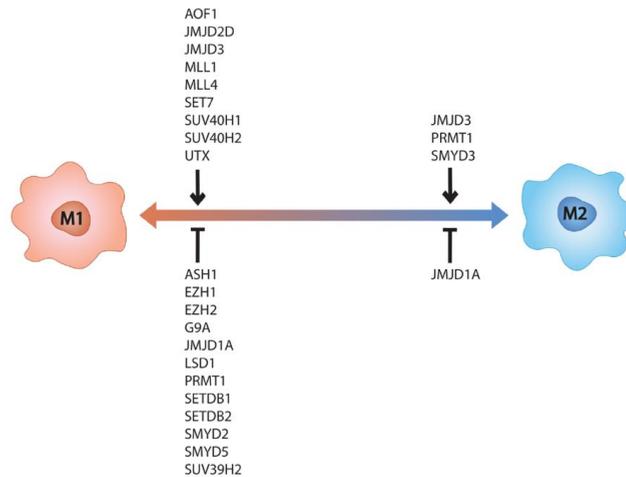


Figure 18. Implication de la méthylation des histones dans la différenciation des macrophages. JMJD3 est impliqué dans la polarisation des macrophages en M2. EZH2 limite la polarisation des macrophages en M1 (de Groot and Pienta, 2018).

3.3.1. Inhibiteurs d'HMTs

Les inhibiteurs d'HMTs inhibent l'activité enzymatique des HMTs et répriment, dès lors, leur modulation épigénétique.

Parmi les inhibiteurs de HMTs, EPZ correspond à un inhibiteur pharmacologique compétitif d'EZH2 réduisant la triméthylation d'H3K27. L'inhibition pharmacologique de EZH2 permet de réduire significativement la prolifération et la migration des cellules de MPM. Grâce à ses propriétés, l'inhibiteur EPZ (EPZ-6438, Tazemostat) a été approuvé par la FDA pour les patients souffrant d'un sarcome épithélioïde avancé. De plus, l'EPZ est entré dans les essais cliniques concernant le lymphome diffus à grandes cellules B, le lymphome folliculaire et le MPM de patients réfractaires et en rechute, qui présentent une inactivation du gène BAP-1 (Mola et al., 2021). EPZ semble dès lors un bon candidat dans le traitement du MPM. Cependant, des études ont récemment montré qu'EPZ interagissait également avec le microenvironnement tumoral en augmentant le recrutement des monocytes présentant un phénotype TAMs et que ce recrutement supprimait l'effet antiprolifératif associé à l'inhibition de EZH2 sur les cellules de MPM (Mola et al., 2021). De plus, une autre étude a également montré que l'utilisation de EPZ biaisait l'activité cytotoxique des macrophages murins (RAW264.7) envers les cellules de MPM (AB1 et AB12) et augmentait l'expression du point de contrôle PD-1 (Hamaidia et al., 2019). Cependant, dans cette étude, un prétraitement avec l'EPZ sur les macrophages en présence d'un anticorps bloquant contre PD-1 a permis à nouveau de contrôler la croissance tumorale des cellules de MPM dans un modèle BALB/C, suggérant la combinaison de l'inhibiteur de point de contrôle PD-1 avec un inhibiteur de EZH2 dans le traitement du MPM (Hamaidia et al., 2019).

3.4. Acétylation des histones

L'acétylation des histones correspond au transfert d'un groupement acétylé (CH₃CO) provenant de l'acétyl-coenzyme A sur le groupement ε-aminé des lysines. Cette modification, menée par les HATs, va provoquer la neutralisation de la charge positive du groupement NH₃⁺ de la lysine ayant pour effet d'affaiblir les interactions entre les histones et l'ADN (PO₄³⁻) qui va être à l'origine de la décompaction de la chromatine permettant ainsi l'activation transcriptionnelle. A l'inverse, les HDACs vont être à l'origine de la compaction de la chromatine liée à une répression transcriptionnelle (Hoeksema and de Winther, 2016).

Il existe 18 HDACs catégorisées en : HDACs classiques et non classiques. Les HDACs classiques (1-11) utilisent une molécule de Zn²⁺ comme cofacteur au sein de leur site actif. Les HDACs non classiques, appelées sirtuines (SIRT1-7), utilisent le NAD⁺ comme cofacteur (Kim and Bae, 2011). Les HDACs sont également regroupées en différentes classes basées selon l'homologie des HDACs de la levure. La classe I est composée des HDACs 1, 2, 3 et 8. Elles sont formées d'approximativement 400 acides aminés et sont localisées dans le noyau (Das Gupta et al., 2016; Wang et al., 2020). La classe II est subdivisée en deux sous-classes, la sous-classe IIa qui comprend les HDACs 4, 5, 7 et 9 et la sous-classe IIb qui comprend les HDACs 6 et 10. Les HDACs de la classe II sont composées de 600 à 1200 acides aminés et sont localisées dans le noyau et le cytoplasme. La classe 3 est composée de 7 SIRT1s. Les SIRT1s 1, 6 et 7 sont localisées dans le noyau, les SIRT1s 3, 4 et 5 dans les mitochondries alors que la SIRT1 2 est retrouvée dans le cytoplasme. Finalement, la classe 4 n'est représentée que par l'HDAC 11 qui est majoritairement retrouvée dans le noyau (Das Gupta et al., 2016; Banik et al., 2019).

Les HDACs sont impliqués dans plusieurs processus biologiques comprenant le développement, la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire des cellules cancéreuses (Kim and Bae, 2011).

De plus, le développement, le phénotype et les fonctions des monocytes et des macrophages apparaissent fortement régulés par les HDACs (**Figure 19**). Effectivement, la différenciation des promonocytes en monocytes implique notamment l'assemblage d'un complexe répresseur E2F4-RBL2-HDAC1-BRM (SWI/SNF) qui va réduire la transcription de PARP1 et réprimer les facteurs de transcription pluripotents tels que *POU Class 5 Homeobox 1* (POU5F1), *SIX Homeobox 2* (SIX2) et *Nanog Homeobox* (NANOG) (Wang et al., 2020). HDAC 1 agit également en tant que régulateur négatif dans les voies de signalisation associées aux TLRs en ciblant les gènes inflammatoires dont l'IL-12p40, COX-2 et IFN-β (Das Gupta et al., 2016). L'HDAC 2, recrutée par *Tet Methylcytosine Dioxygenase 2* (Tet2), une enzyme impliquée dans la déméthylation de l'ADN, joue un rôle dans l'inhibition du gène pro-inflammatoire IL-6 (Das Gupta et al., 2016). L'HDAC 3 participe à la réponse inflammatoire via l'axe IFN-β-STAT. L'HDAC3 supprime également l'expression des gènes dépendant de l'IL-4, l'impliquant dans la polarisation des macrophages. Effectivement, macrophages HDAC3^{-/-} sont polarisés vers un phénotype activé alternativement qui est marqué par l'expression de *Clec7a* et de *Arg1*. L'HDAC4 semble associée à une réponse anti-inflammatoire en jouant un rôle dans l'inhibition de

NF- κ B (Hoeksema and de Winther, 2016). L'HDAC 5, quant à elle, est pro-inflammatoire. Sa surexpression est associée à une augmentation significative du TNF- α et d'autres médiateurs inflammatoires (Hoeksema and de Winther, 2016). L'HDAC 6 agit en tant qu'activateur transcriptionnel de la cytokine IL-10. L'HDAC 7 est transitoirement sous-exprimée lors de la différenciation en macrophages avant d'être réexprimée afin de participer aux fonctions des macrophages. De plus, comme l'HDAC 5, l'HDAC 7 est associée à un phénotype pro-inflammatoire (Das Gupta et al., 2016; Hoeksema and de Winther, 2016). L'HDAC 9 est surrégulée lors de la différenciation en macrophage et semble également impliquée dans l'expression de gènes inflammatoires. Finalement, l'HDAC 11 bloque l'expression des cytokines anti-inflammatoires, induites après exposition au LPS, et régule négativement le développement et les fonctions des cellules myéloïdes suppressives notamment en sous-régulant l'IL-10 (Das Gupta et al., 2016).

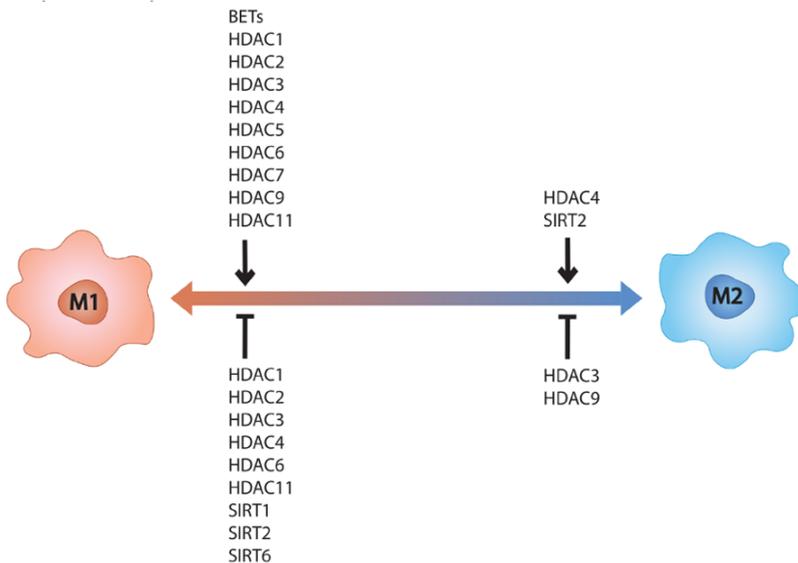


Figure 19. Implication de l'acétylation des histones dans la polarisation des macrophages. La contribution des HDACs dans la polarisation des macrophages est complexe. Certaines HDACs sont aussi bien impliquées dans la polarisation M1 que M2. De plus, elles sont également impliquées dans la surrégulation que la sous-régulation du phénotype M1 (de Groot and Pienta, 2018).

3.4.1. Inhibiteurs d'HDACs

La répression transcriptionnelle des HDACs peut être empêchée par l'utilisation des inhibiteurs d'HDAC (HDACi). Les HDACi fonctionnent en se liant au site catalytique des HDACs. Les HDACi sont regroupés en quatre groupes en fonction de leur similarité structurale : les hydroxamates, les peptides cycliques, les acides aliphatiques et les benzamides (**Figure 20**) (Kim and Bae, 2011).

Les hydroxamates constituent la plus grande famille des HDACi (Autin et al., 2019). Elles incluent la trichostatine A (TSA, pan-HDACi), le SAHA (Vorinostat, pan-HDACi) et le PXD-101 (pan-HDACi). La TSA constitue le premier hydroxamate naturel inhibant les HDACs. Cependant, le TSA est très toxique. Le Vorinostat est le premier HDACi approuvé par la FDA et est utilisé dans le traitement du lymphome cutané à cellules T (CTCL) de patients réfractaires ou en rechute (Kim and Bae, 2011).

Les peptides cycliques comprennent le depsipeptide (HDACi 1 et 2) et l'apicidine. Le depsipeptide a été approuvé par la FDA dans le traitement du CTCL en 2009 (Kim and Bae, 2011).

Les benzamides comprennent le MS-275 (HDACi 1, 2 et 3) et le MGCD0103 (HDACi de classe I) (Kim and Bae, 2011).

Les acides aliphatiques incluent l'acide valproïque (VPA, HDACi de classe I et IIa), le phénylbutyrate de sodium (HDACi de classe I et IIa) et le butyrate de sodium (pan-HDACi). Ce sont des faibles HDACi associés à une activité à des concentrations de l'ordre du millimolaire (Kim and Bae, 2011).

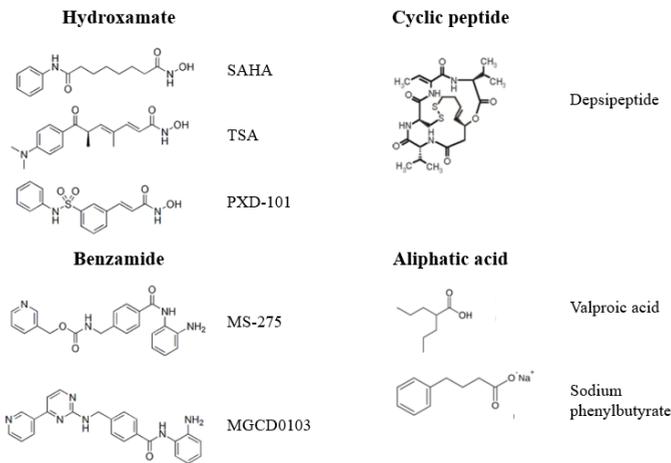


Figure 20. Famille des inhibiteurs d'HDAC. Les inhibiteurs d'HDAC sont composés de quatre familles qui incluent, les hydroxamates, représentant la plus grosse famille, les peptides cycliques, les benzamides et les acides aliphatiques (Kim and Bae, 2011).

La plupart des HDACi jouent un rôle antitumoral en induisant l'arrêt du cycle cellulaire, la différenciation et l'apoptose (Wang et al., 2017). Effectivement, parmi les HDACi, le VPA induit l'apoptose en activant la voie extrinsèque via les récepteurs de mort et la voie intrinsèque via les protéines de la famille Bcl-2 amenant à la disruption de la membrane mitochondriale et à la libération de la cytochrome c (Vandermeers et al., 2009).

En plus de jouer un rôle dans l'activité antitumorale, les HDACi modulent également l'immunité antitumorale. Cependant, leur contribution dans l'immunité apparait complexe (Wang et al., 2017).

Certaines études associent le traitement des HDACi à des fonctions immunosuppressives. Effectivement, l'administration orale de SAHA chez des souris

inhibe la production de cytokines circulantes telles que le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-6 et l'IFN- γ stimulées au LPS et réduit la sécrétion de TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-12 et l'IFN- γ chez les PBMCs humains stimulés *in vitro* (Hoeksema and de Winther, 2016; Banik et al., 2019). De manière similaire, le TSA, le MS-275 et le SAHA bloquent la production de NO des macrophages murins (Das Gupta et al., 2016). A l'inverse, une autre étude a montré que le traitement au SAHA, VPA et butyrate de sodium n'avait pas d'effet sur la production de NO dans les cellules RAW 264.7 et les macrophages primaires murins (Das Gupta et al., 2016).

D'autres études soulignent, qu'au contraire, les HDACi induisent des effets immunostimulants. Effectivement, dans un modèle murin, le SAHA stimule l'immunogénicité des cellules de MPM et induit une infiltration lymphocytaire (Guillot et al., 2011). En augmentant l'immunogénicité des cellules tumorales par une surexpression des CMHs de classe 1 et 2, des molécules de co-stimulation (CD80, CD86) et des molécules d'adhérence intercellulaire (ICAM1) à la surface des cellules tumorales, les HDACi favorisent l'activation des cellules T sécrétant l'IFN- γ et l'augmentation de la réponse antitumorale par les lymphocytes T cytotoxiques (Wang et al., 2017). Le SAHA augmente également la sécrétion de l'IL-1 β dans les cellules dendritiques humaines et murines et les macrophages murins stimulés au LPS d'une manière dépendante de l'HDAC11 (Stammler et al., 2015). Il a également été démontré que le SAHA pouvait appauvrir le taux de MDSCs dans la tumeur mammaire 4T1 murine et augmenter la proportion de T CD8+ produisant des IFN- γ et des perforines (Wang et al., 2017). Finalement, l'administration de TSA favorise l'activité antitumorale des macrophages infiltrant les tumeurs induisant le phénotype M1 (Li et al., 2021).

Le valproate

Le VPA est un acide gras à courte chaîne constitué de 8 atomes de carbone (2-n-propyl-pentanoïque).

Le VPA a été synthétisé pour la première fois par Burton en 1882. Le VPA n'avait pas d'application clinique jusqu'à ce que ses propriétés anticonvulsives soient découvertes par le plus grand des hasards en 1962. Lors d'une étude, le VPA était utilisé en tant que solvant pour dissoudre certains composés en vue d'étudier leur propriété anticonvulsive. Le résultat positif de chacun des composés utilisés amena les chercheurs à étudier les propriétés anticonvulsives du VPA lui-même, confirmant son efficacité. Ces études ont conduit à un premier essai clinique en 1964 et à sa mise sur le marché en 1967 (Löscher, 2002). Depuis, il a été démontré que l'activité du VPA était due à l'augmentation de la disponibilité de l'acide γ -aminobutyrique (GABA), un inhibiteur de neurotransmetteur, dans l'espace neuronal (Soria-Castro et al., 2019).

A ce jour, le VPA constitue le traitement de première ligne pour l'épilepsie, les troubles bipolaires et les migraines. De plus, le VPA présente également d'autres avantages thérapeutiques dans le traitement des troubles psychologiques (dépression, dépendance aux substances psychotropes, comportement maniaque), cancers, troubles immunitaires et maladies chroniques. Il est en cours d'essai clinique de phase II dans le traitement de la leucémie (Soria-Castro et al., 2019).

Le VPA présente également des propriétés d'HDACi de classe I et II amenant à l'augmentation de l'acétylation des histones H2, H3 et H4 (Soria-Castro et al., 2019). Le VPA inhibe l'activité des HDACs en se liant à leur centre catalytique (Göttlicher et al., 2001). Il a également été démontré que le VPA pouvait agir en tant que HDACi en dégradant l'HDAC2 par un mécanisme dépendant du protéasome (Krämer et al., 2003). De plus, le VPA semble jouer un rôle dans la triméthylation de H3K4 et dans la déméthylation de l'ADN amenant à la conversion du 5'méthylcytosine en cytosine (Boudadi et al., 2013; Mello, 2021).

Bien que le VPA soit moins actif que certains hydroxamides tels que le SAHA, il présente des propriétés pharmacocinétiques (temps de demi-vie : 11 à 20h) et de biodisponibilité (>80%) qui sont appropriées en essais cliniques. De plus, le VPA ne possède presque pas d'effets secondaires. Ces effets secondaires incluent des effets gastrointestinaux (nausée, vomissement, crampe abdominale, diarrhée), d'hépatotoxicité, neuroaux et tératogènes (Pinder et al., 1977).

Objectif de la thèse

L'inhibition HDAC en présence de valproate améliore la cytotoxicité directe des monocytes contre les cellules de mésothéliome

Le mésothéliome pleural malin (MPM) est un cancer rare qui affecte les cellules mésothéliales de la plèvre. L'origine du MPM est associée à l'exposition à l'amiante et sa période de latence est comprise entre 20 à 50 ans. Les patients atteints de MPM présentent une médiane de survie allant de 7 à 27 mois. En Europe de l'Ouest, 500.000 morts liés à l'amiante seraient prédits d'ici 2030. Actuellement, le MPM est incurable et les traitements ne permettent d'allonger la survie des patients que de quelques mois. Dans ce contexte, il est urgent de développer des nouvelles approches thérapeutiques.

La croissance du MPM est contrôlée par le système immunitaire qui développe une réponse antitumorale. Les monocytes sont des cellules de l'immunité innée qui constituent une première ligne de défense contre les cellules tumorales. Dans le MPM, les monocytes exercent des fonctions immunosuppressives par l'intermédiaire des macrophages associés aux tumeurs (TAMs) et des cellules myéloïdes suppressives monocytaires (M-MDSCs). Leur présence est associée à un mauvais pronostic chez les patients atteints de MPM. Malgré leurs fonctions immunosuppressives, les monocytes sont également capables d'exercer des fonctions antitumorales via la phagocytose, l'ADCC et la production de cytokines et de substances réactives.

Dans ce contexte, les objectifs de cette thèse consisteront à :

- étudier l'évolution des monocytes sanguins lors d'une thérapie
- établir un modèle cellulaire afin d'étudier l'activité cytotoxique des monocytes dans le MPM
- moduler l'activité cytotoxique des monocytes par l'intermédiaire de régulateurs épigénétiques
- évaluer l'activité cytotoxique dans un modèle primaire, à partir de monocytes isolés de sang périphérique de donneurs sains
- caractériser l'activité cytotoxique en quantifiant la mobilité et l'agrégation cellulaire ainsi que le profil transcriptomique des monocytes.

3

Résultats

L'inhibition HDAC induite par le valproate améliore la cytotoxicité directe des monocytes contre les cellules de mésothéliome

1. Les thérapies du MPM affectent le nombre de monocytes circulants dans le sang

L'efficacité des traitements du MPM peut être réduite par un environnement conditionné par les cellules immunosuppressives. Les monocytes sont les sources des TAMs ainsi que des M-MDSCs qui représentent la population immunosuppressive majeure dans le microenvironnement tumoral. Dans le MPM, l'infiltration cellulaire de TAMs et de MDSCs est associée à un mauvais pronostic chez les patients. Parallèlement, des études ont montré que certaines thérapies, telles que la chimiothérapie, affectaient la différenciation des monocytes vers un phénotype M2 et induisaient la prolifération des MDSCs dans l'environnement tumoral (Dijkgraaf et al., 2013; Ding et al., 2014).

Dans ce contexte, nous avons évalué l'effet de la chimiothérapie de première ligne (cisplatine/carboplatine + pemetrexed) et de l'immunothérapie (nivolumab + ipilimumab) sur l'infiltration monocytaire périphérique chez les patients atteints de MPM. Pour ce faire, le nombre absolu de monocytes ($10^9/L$ de sang) a été analysé chez les patients avant et après la thérapie.

Les résultats montrent que le nombre absolu de monocytes augmente significativement après chimiothérapie et immunothérapie (**Figure 21**).

Malgré les effets prometteurs de l'immunothérapie, l'augmentation du nombre de monocytes associée au traitement pourrait amoindrir son efficacité. Les monocytes apparaissent dès lors une cible intéressante à prendre en compte dans la thérapie du MPM.

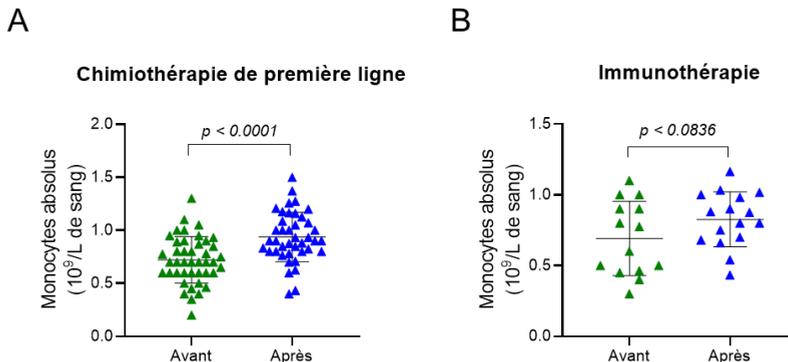


Figure 21. Effet de la thérapie sur la valeur absolue des monocytes avant et après chimiothérapie de première ligne ou immunothérapie. Les données cliniques ont été collectées à partir du registre de données des patients du Département of Pneumology and Thoracic Oncology au CHU de Lille, France. A. Le nombre absolu de monocytes ($10^9/L$ de sang) a été mesuré avant et après une chimiothérapie de première intention (cisplatine/ carboplatine + pemetrexed). Les données sont présentées sous forme : moyenne + écart type. Les moyennes ont été comparées via un test de student pairé. B. Le nombre absolu de monocytes ($10^9/L$ de sang) a été mesuré avant et après une immunothérapie (nivolumab + ipilimumab). Les données sont présentées sous forme : moyenne + écart type. Les moyennes ont été comparées via un test de student pairé.

2. HDAC inhibition with valproate improves direct cytotoxicity of monocytes against mesothelioma tumor cells

2.1. Préambule

Bien que les monocytes exercent des fonctions immunosuppressives par l'intermédiaire des TAMs et des M-MDSCs, qui sont corrélés à un mauvais pronostic chez les patients atteints de MPM, ils jouent des fonctions essentielles dans la réponse antitumorale via la phagocytose, l'ADCC, la production de cytokines et de substances réactives. De plus, les monocytes sont les précurseurs des macrophages. Des données préliminaires du laboratoire ont montré que les macrophages étaient capables d'exercer une activité antitumorale directe contre les cellules de MPM. Ceci suggère que, en tant que précurseurs des macrophages, les monocytes puissent également posséder ces mécanismes de cytotoxicité qu'il serait intéressant d'exploiter dans la thérapie du MPM.

Dans l'article suivant, nous avons étudié l'activité cytotoxique directe des monocytes dans un modèle de lignée cellulaire et dans un modèle primaire à partir de monocytes issus de sang de donneurs sains. Nous avons également cherché à moduler cette activité par l'intermédiaire de régulateurs épigénétiques. La caractérisation de cette activité via l'étude de la mobilité, de l'agrégation cellulaire et du profil transcriptomique nous a permis d'avoir une première compréhension de la fonction cytotoxique des monocytes dans le contexte du MPM.

2.2. HDAC inhibition with valproate improves direct cytotoxicity of monocytes against mesothelioma tumor cells

Clotilde Hoyos ^{1,†}, Alexis Fontaine ^{1,†}, Jean-Rock Jacques ¹, Vincent Heinen ², Renaud Louis ², Bernard Duysinx ², Arnaud Scherpereel ³, Eric Wasielewski ³, Majeed Jamakhani ¹, Malik Hamaidia ¹ and Luc Willems ^{1,*}

¹ Molecular and Cellular Epigenetics, Interdisciplinary Cluster for Applied Genoproteomics (GIGA) and Molecular Biology, Teaching and Research Centre (TERRA), University of Liège, 4000 Liege, Belgium; clotilde.hoyos@uliege.be (C.H.); alexis.fontaine@uliege.be (A.F.); jean-rock.jacques@uliege.be (J.-R.J.); majeed.jamakhani@uliege.be (M.J.); mhamaidia@uliege.be (M.H.)

² Department of Pneumology – Allergology, University Hospital, Sart-Tilman, 4000 Liege, Belgium; v.heinen@chuliege.be (V.H.); r.louis@chu.ulg.ac.be (R.L.); bduysinx@chuliege.be (B.D.)

³ Department of Pneumology and Thoracic Oncology, CHU Lille, 59037 Lille, France; arnaud.scherpereel@chru-lille.fr (A.S.); eric.wasielewski@chru-lille.fr (E.W.)

* Correspondence: luc.willems@uliege.be; Tel.: +32-81-622152

† These authors contributed equally to this work and share first authorship.

Simple Summary: Tumor-associated macrophages and monocyte myeloid-derived immunosuppressive cells are associated with bad prognosis in malignant pleural mesothelioma (MPM). This study shows that peripheral blood monocytes can, nevertheless, be cytotoxic for MPM tumor cells. This cytotoxic activity that involves direct cell-to-cell contact can be improved with a lysine deacetylase inhibitor (VPA), opening new prospects for further improvement of still unsatisfactory MPM therapies.

Abstract: The composition of the tumor microenvironment (TME) mediates the outcome of chemo- and immunotherapies in malignant pleural mesothelioma (MPM). Tumor-associated macrophages (TAMs) and monocyte myeloid-derived immunosuppressive cells (M-MDSCs) constitute a major fraction of the TME. As central cells of the innate immune system, monocytes exert well-characterized functions of phagocytosis, cytokine production, and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC). The objective of this study was to evaluate the ability of monocytes to exert a direct cytotoxicity by cell-to-cell contact with MPM cells. The experimental model is based on cocultures between human blood-derived monocytes sorted by negative selection and mesothelioma cell lines. Data show (i) that blood-derived human monocytes induce tumor cell death by direct cell-to-cell contact, (ii) that VPA is a pharmacological enhancer of this cytotoxic activity, (iii) that VPA increases monocyte migration and their aggregation with MPM cells, and (iv) that the molecular

mechanisms behind VPA modulation of monocytes involve a downregulation of the membrane receptors associated with the M2 phenotype, i.e., CD163, CD206, and CD209. These conclusions, thus, broaden our understanding about the molecular mechanisms involved in immunosurveillance of the tumor microenvironment and open new prospects for further improvement of still unsatisfactory MPM therapies

Keywords: pleural mesothelioma; monocyte; macrophage; tumor microenvironment; histone deacetylase; valproate; cytotoxicity

2.2.1. Introduction

Malignant pleural mesothelioma (MPM) is a rare cancer arising from mesothelial cells in the pleura, mainly caused by occupational asbestos exposure. Due to the widespread use of asbestos, the incidence of MPM is still increasing worldwide despite complete or partial bans in most countries (Alpert et al., 2020). Overall survival post-diagnosis is very poor and depends on the histology of the tumor: epithelioid (12–27 months), biphasic (8–21 months), and sarcomatoid (7–18 months) (Brcic and Kern, 2020).

Besides multimodal options that are restricted to a limited number of patients, antiproliferative chemotherapy based on the combination of a crosslinking agent (cisplatin or carboplatin) and an antifolate (pemetrexed) has been the standard-of-care for unresectable MPM for many years (Vogelzang et al., 2003; Scherpereel et al., 2020; Janes et al., 2021). Cisplatin blocks the S phase of the cell cycle through covalently bound DNA adducts or via intrastrand crosslinks. Pemetrexed is a multifolate antagonist that impairs de novo synthesis of triphosphate deoxyribonucleotides (dNTPS) through inhibition of thymidylate synthase (TS), dihydrofolate reductase (DHFR), and glycinamide ribonucleotide formyltransferase (GARFT), thereby indirectly affecting DNA replication. This first-line chemotherapy is considered as palliative since patients are refractory to the cisplatin/pemetrexed regimen or rapidly relapse after treatment. Options for a second-line treatment include other cytotoxic drugs such as antimetabolites (gemcitabine/2'-deoxy-2',2'-difluorocytidine), vinca alkaloids (vinorelbine/navelbine), or topoisomerase inhibitors (doxorubicin) (Petrelli et al., 2018). Meta-analysis of 49 second-line clinical trials reveals a disappointing median progression-free survival of 3.4 months (Petrelli et al., 2018). Recently, immunotherapy with two immune checkpoint inhibitors targeting PD-1 (nivolumab) and CTLA-4 (ipilimumab), proved efficacy by extending MPM patient's overall survival to 18.1 months compared to 14.1 months with standard chemotherapy (Baas et al., 2021). The efficacy of the immunotherapy was particularly impressive in the non-epithelioid subtypes of MPM. However, with an objective response rate of 40%, only a subset of patients benefits from this treatment. Currently, combinations of chemo- and immunotherapies (i.e., cisplatin, pemetrexed, and pembrolizumab/durvalumab) are evaluated in phase II/III clinical trials (trials NCT02784171, NCT04334759). A major drawback of this approach is the additive and perhaps synergistic toxicity (Salas-Benito et al., 2021). Alternative options of chemoimmunotherapy include immune checkpoint inhibitors in combination with low-dose chemotherapy that would transiently activate error-prone

DNA damage repair (DDR) or tolerance (DDT) pathways. The idea is to generate non-synonymous mutations that would be translated into neoantigens in the presence of a fully competent antitumor immune response (Brossel et al., 2021).

The main limitation impeding MPM immunotherapy is the strong immunosuppressive microenvironment promoted by tumor-associated macrophages (TAMs) and monocyte myeloid-derived immunosuppressive cells (M-MDSCs) (Cersosimo et al., 2021). Indeed, TAMs that massively infiltrate MPM tumors are correlated with poor prognosis (Hegmans et al., 2006; Rippo et al., 2008; Cornelissen, 2015; Lievense et al., 2016; Minnema-Luiting et al., 2018; Grosso et al., 2021). Consistently with their role of macrophage precursors, circulating monocytes are also associated with a worse overall survival of MPM patients (Burt et al., 2011; Yamagishi et al., 2015; Tanrikulu et al., 2016; Cantini et al., 2020). As central cells of the innate immune system, monocytes exert well-characterized functions of phagocytosis and cytokine production (i.e., IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α) (Belge et al., 2002; Cros et al., 2010; Wong et al., 2011). Furthermore, monocytes directly kill other cells via antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) (Yeap et al., 2016). This process is initiated by the recognition of an antigen expressed on the target cell by specific antibodies. Upon interaction of the Fc domain of these immunoglobulins with their Fc γ receptors (Fc γ Rs), monocytes release TNF- α and mediate cell death. Similarly to monocytes, macrophages also orchestrate innate immunity through phagocytosis and T-lymphocyte activation. Furthermore, macrophages can be directly cytotoxic for mesothelioma cells via a particular caspase-independent apoptosis process called oxeiptosis (Hamaidia et al., 2019). In this mechanism, reactive oxygen species (ROS) and peroxynitrites produced by macrophages activate the Kelch-like ECH-associated protein 1/nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Keap1/Nrf2) pathway in the target cell (Holze et al., 2018). Live-cell imaging reveals that onset of oxeiptosis is initiated after a transient contact between the macrophage and the tumor cell, independently of phagocytosis and ADCC (Hamaidia et al., 2019). However, in MPM, the tumor microenvironment shapes the phenotype of infiltrating monocytes towards an immunosuppressive state which is predicted to impair macrophage-directed cytotoxicity (Chéné et al., 2016; Lievense et al., 2016; Mola et al., 2021).

In this context, the aims of this study are (i) to investigate the ability of blood-derived human monocytes to induce tumor cell death by direct cell-to-cell contact and (ii) to identify pharmacological approaches to enhance this cytotoxic activity.

2.2.2. Materials and methods

Cell lines and primary monocyte cultures

Mesothelioma M14K (Cellosaurus CVCL_8102, epithelioid subtype) and ZL34 (CVCL_5906, non-epithelioid subtype) cell lines were kindly provided by Sakari Knuutila (Laboratory of Cytomolecular Genetics, Haartman institute, University of Helsinki, Finland), James Rheinwald (Dana Farber Cancer Research Institute, Boston, MA, USA), and Emanuela Felley-Bosco (Laboratory of Molecular Oncology, University Hospital Zürich, Switzerland). M14K and ZL34 were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Lonza, Basel, Switzerland) supplemented with 10%

of heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Gibco, Waltham, MA, USA) and antibiotics (penicillin–streptomycin 10,000 U/mL, Lonza, Basel, Switzerland) (referred to as complete DMEM). The THP-1 monocytic cell line (CVCL_0006, TIB-202) originating from peripheral blood of a pediatric patient with acute monocytic leukemia was cultured in Roswell Park Memorial Institute 1640 medium (RPMI-1640, Gibco, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% of FBS (Gibco, Waltham, MA, USA) and antibiotics (penicillin–streptomycin 10,000 U/mL, Lonza, Basel, Switzerland) (Complete RPMI). The cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. THP-1 monocytes were differentiated into macrophages with 16.2 μM of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Abcam, Cambridge, UK) for 48 h (Lund et al., 2016; Richter et al., 2016).

To isolate primary human monocytes, buffy coats were obtained from healthy donors (Red Cross of Belgium). The use of human samples was approved by the institutional ethic committee of the Liège University Hospital (Sart-Tilman) under reference #2012/8. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by density gradient centrifugation on Lymphoprep (1.077 g/mL, Stemcell Technology, Vancouver, BC, USA). PBMCs (70×10^6 cells) were washed, blocked in PBS containing 10% of heat-inactivated FBS (PBS/FBS10%) before labeling with anti-CD3-PE (50X, Beckman Coulter, Brea, CA, USA), anti-CD19-PC5 (50X, Beckman Coulter, Brea, CA, USA), and anti-CD56-BV421 (50X, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) during 1 h at 4 °C. After a wash in PBS/FBS10%, monocytes were isolated by negative selection using a cell sorter flow cytometer (BD FACSAria III, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Cells were collected, counted, and resuspended in complete RPMI supplemented with 1% of sodium pyruvate (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), 1% of non-essential amino acid solution (MEM, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), and 0.1% of 2-mercaptoethanol (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Cell lines (M14K, ZL34, and THP-1) and primary monocytes were incubated with different concentrations of the HDAC inhibitor, valproate (VPA, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), or the EZH2 methyltransferase inhibitor (EPZ005687, EPZ, BioConnect, Huissen, the Netherlands).

Metabolic activity

THP-1 monocytes (4×10^4 cells/well in a 96-well plate) and primary monocytes (1×10^5 cells/well in a 96-well plate) were incubated, respectively, during 48 and 24 h in the presence of different concentrations of VPA or EPZ. Metabolic activity was evaluated using the MTS assay (CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation assay, Promega, Madison, WI, USA), which is based on the conversion of the tetrazolium salt into formazan via the enzymatic activity of NAD(P)H-dependent dehydrogenase enzymes present in metabolically active cells. After addition of 20 μL MTS solution to 100 μL cell cultures, the optical density was measured at 490 nm with a Multiskan GO spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Apoptosis in cocultures of monocytes and mesothelioma cells

M14K mesothelioma cells (2×10^6 cells) were labeled with 5 mM of carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) in 1 mL of DMEM during 7 min at 37 °C in the presence of 5% CO₂. THP-1 monocytes (1×10^5 cells in 24-well plate) were untreated (mock) or treated with PMA (16.2 μM), VPA (2.5 mM), or EPZ (10 μM) for 48 h. After washing, THP-1 monocytes were mixed with CFSE-labeled M14K cells (1×10^4 cells) and further cultured for 48 h. Primary monocytes (2×10^5 cells in a 24-well plate) and CFSE-labeled M14K cells (10×10^3 cells) were cocultured for 24 h in the presence of VPA (2 mM). Floating and adherent cells were collected, washed with PBS, and resuspended in 100 μL of annexin binding buffer (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂, pH 7.4, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Cells were then labeled with annexin V-APC (5 μL, Immunotools, Friesoythe, Germany) during 15 min at room temperature. After adding 150 μL of annexin binding buffer, labeled cells were recorded by flow cytometry (BD FACSCanto, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). CFSE and annexin V double-positive events were considered as apoptotic M14K cells.

Live cell imaging

THP-1 monocytes (3×10^3 cells in a 96-well plate) were untreated (mock) or treated with PMA (16.2 μM), VPA (2.5 mM) or EPZ (10 μM) for 48 h. After washing the medium, the THP-1 cells were cocultured with CFSE-labeled M14K (3×10^3 cells). Primary monocytes (6×10^4 cells in a 96-well plate) were mixed with CFSE-labeled M14K cells (3×10^3 cells). To evaluate cell death, annexin V-APC (5 μL, Immunotools, Friesoythe, Germany) or propidium iodide (0.5 μM, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) was added to each well. The monocyte-M14K cocultures were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ and recorded hourly with a Incucyte imaging S3 Live-Cell system (Sartorius, Göttingen, Germany) equipped with a 20× objective. The percentages of CFSE-positive M14K cells labeled by annexin V or propidium iodide were calculated with the Incucyte S3 software.

To assess cell motility, Incucyte images were further analyzed with the CellTracker 1.1 software (<http://celltracker.website/index.html>, accessed on 15 November 2021) (Piccinini et al., 2016). Uneven signal intensity distributions were homogenized from the background by bicubic interpolation (vignetting correction). Moreover, paraxial imaging mismatches were adjusted by automatic alignment. Total migration and average speed were determined by manual cell tracking at each time set. Total migration and average speed were determined from 10 cells for each condition in triplicate.

Cluster formation between CFSE-labeled M14K cells and monocytes was quantified with the ImageJ software. The area of 10 delineated clusters was determined with the ROI Manager tool in triplicate.

Confocal microscopy

CFSE-labeled M14K cells (5×10^4 cells in a 24-well plate) were cultured on a coverslip. Freshly sorted primary monocytes (2×10^5 cells) were then added to M14K cells. After 24 h, cells were washed with PBS and then with PBS containing 2% of heat-

inactivated FBS (PBS/FBS2%). Cells were thereafter incubated with an anti-CD33 monoclonal antibody (1/200, Immunotools, Friesoythe, Germany) during 30 min at 4 °C, washed with PBS/FBS2%, and labeled with Alexa Fluor 647 (1/1000, Invitrogen, Waltham, MA, USA) during 30 min at 4 °C. After a wash in PBS/FBS2%, cells were resuspended in PBS and fixed with paraformaldehyde (PFA) 4% in the dark for 15 min. After fixation, cells were washed in PBS and stained with DAPI (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) during 15 min in the dark at room temperature. Slides were mounted with ProLong Glass Antifade Mountant (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) and scanned by confocal microscopy (Confocal super resolution Zeiss LSM880 AiryScan Elyra S1, Zeiss, Jena, Germany). Images were computed with the Imaris software (Oxford Instrument Imaris, Zurich, Switzerland).

H3K27me3 and Kac immunofluorescence

For H3K27 trimethylation and histone acetylation, cells were collected, washed in PBS, fixed in PFA 4% during 15 min in the dark, and permeabilized in Triton X-100 0.5% during 15 min at room temperature. After a wash with PBS/FBS 10%, cells were incubated with rabbit anti-acetylated histone (1/400, Cell Signaling, Danvers, MA, USA) during 12 h at 4 °C or with rabbit anti-trimethyl-histone H3 lysine 27 (1/500, Merck Millipore, Burlington, MA, USA) during 1 h at room temperature. After washing in PBS/FBS 10%, cells were labeled with Alexa Fluor 488 anti-rabbit (1/1000, Invitrogen, Waltham, MA, USA) during 30 min at 4 °C. After a wash in PBS/FBS 10%, cells were labeled with DAPI (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) in the presence of PBS, mounted on a coverslip in ProLong Glass Antifade Mountant (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) and scanned with an epifluorescence microscope (Nikon Eclipse Te2 microscope, Nikon, Tokyo, Japan) equipped with a 20× objective. Images were analyzed with the NIS-Element AR software (Nikon, Tokyo, Japan). For flow cytometry analysis, cells were collected, washed in PBS, fixed in PFA 4% during 15 min in the dark, and permeabilized in Triton X-100 0.5% during 15 min at room temperature. After a wash with PBS/FBS 10%, cells were incubated with rabbit anti-acetylated histone (1/400, Cell Signaling, Danvers, MA, USA) during 12 h at 4 °C or with rabbit anti-trimethyl-histone H3 lysine 27 (1/500, Merck Millipore, Burlington, MA, USA) during 1 h at room temperature. After washing in PBS/FBS 10%, cells were labeled with Alexa Fluor 488 anti-rabbit (1/1000, Invitrogen, Waltham, MA, USA) during 30 min at 4 °C. After a wash in PBS/FBS 10%, cells were stained with Draq5 (Invitrogen). Labeled cells were recorded by flow cytometry (BD FACSCanto, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA).

RNA sequencing and bioinformatics analysis

Human blood monocytes isolated by flow cytometry (2×10^6 cells) were cocultured with CFSE-labeled M14K cells (1×10^5 cells in 6 well plate) in the presence (sample D1+VPA) or absence (sample D1) of VPA (2 mM) for 24 h. Floating and adherent cells were recovered in cold PBS/EDTA 1 mM by pipetting and gentle scrapping. Monocytes were purified by negative selection based on CFSE labeling using a flow cytometer (BD

FACSAria III sorter, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). As control, 1×10^6 uncultured monocytes (sample D0) were washed in PBS and stored at -80°C .

RNA from D0, D1, and D1+VPA monocytes was isolated using the RNeasy Micro Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). RNA integrity and quantity were evaluated with a bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). When the RNA Integrity Number (RIN) was > 8 , cDNA libraries were generated based on the SMARTer ultra-low mRNA (poly-A selection). Sequencing of the libraries (2×150 bp) was performed on a Novaseq 6000 system (Illumina, San Diego, CA, USA).

Quality controls including base quality, sequence duplication levels, and adapter contents of FASTQ reads were performed with FASTQ tools (version 0.11.9). Trimmomatic (version 0.39) was thereafter used to filter out low quality reads, minimum length reads, and Illumina universal adapters contamination (filtration parameters: SLIDINGWINDOW:4:20 TRAILING:3 MINLEN:36). rRNA contamination was removed with bwa mem (version 0.7.17). rRNA-free trimmed reads were mapped to the human genome (hg18, Genome Reference Consortium GRCh38) using STAR (version 2.7.9.a) and aligned reads were further marked for duplicates with MarkDuplicates (version 2.26.3). The read count table was eventually generated using Featurecounts (version 2.0.1).

Differential expression analysis between D1+VPA vs. D0 and D1 vs. D0 conditions was performed using the R/Bioconductor DESeq2 package (version 1.32.0) without correction for patient heterogeneity. Differentially expressed genes (DEGs) ($p\text{-adj} < 0.05$ and $|\text{Log}_2\text{FC}| > 1$) were obtained in each comparison and ranked according to adjusted p-values. Enriched pathway analysis of significant genes ($p\text{-adj} < 0.05$) against GO:MF, GO:BP, and KEGG databases were performed using the gprofiler2 package (version 0.2.1). Publicly available datasets analyzed in this study can be found on the library:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/study/?acc=PRJNA807510&o=acc_s%3Aa, accessed on 21 February 2022.

Statistics

Standard statistical analyses were performed with the GraphPad Prism 8 software. Data were expressed as means \pm standard error of the mean of at least three independent experiments. The normality of the distribution was evaluated based on the Shapiro–Wilk test and equality of variance was verified by the Brown–Forsythe test. Assuming normal distributions and variance equality, one-way analysis of variance (ANOVA 1) followed by Dunnett or Tukey multiple comparison tests were performed. In other conditions, means were compared with a Kruskal–Wallis test followed by a Dunn’s test of multiple comparisons. When only two populations were analyzed, means were compared with an unpaired t-test when distributions were normal and variances equal. If not, means were compared based on the Mann–Whitney test.

2.2.3. Results

HDAC inhibition promotes THP-1 cytotoxicity towards MPM cells

The first objective of the study was to investigate the ability of monocytes to induce tumor cell death by direct cell-to-cell contact. We used a well-characterized model based on THP-1 monocytic cell line. As control, THP-1 cells were differentiated with PMA (16.2 μ M) during 48 h (Lund et al., 2016; Richter et al., 2016). In order to make distinction between tumor cells and monocytes, M14K were labeled with CFSE and then cocultured with untreated (Mock) or PMA-differentiated THP-1 according to the protocol schematized in **Figure 22A**. The cocultures of M14K and mock THP-1 were recorded hourly by time-lapse Incucyte imaging, in the presence of annexin V-APC (**Figure 22B and Video S1**) or propidium iodide (**Figure 22C and Video S2**). Annexin V labels early apoptosis while propidium iodide reveals irreversible cell death through plasma membrane permeabilization (Galluzzi et al., 2015). Both fluorescent markers labeled CFSE⁺ M14K in contact with mock THP-1 monocytes, indicating onset of cell death. More importantly, the videos clearly illustrate that apoptosis occurred after a transient contact between M14K and THP-1 cells. The percentages of annexin V⁺ CFSE⁺ and PI⁺ CFSE⁺ double-positive M14K cells gradually increased with time (**Figure 22D,E**, respectively). Although cytotoxic interactions between M14K cells and mock THP-1 occurred, there was no statistically significant difference between the percentages of apoptotic M14K cells in the different conditions: absence of monocytes (mock, in black), presence of THP-1 (mock THP-1, in green) or PMA-differentiated THP-1 (PMA, in orange). A series of pharmacological inhibitors of tyrosine kinases and histone modulators was, therefore, evaluated at different doses and cell ratios to modulate the cytotoxicity of THP-1 monocytes (data not shown). Among these, valproate (VPA), a HDAC inhibitor previously evaluated in a clinical trial, significantly increased THP-1-mediated cytotoxicity towards M14K cells (in blue, **Figures 22D,E and S1**) (Scherpereel et al., 2011). In contrast, an inhibitor of the EZH2 histone methyltransferase of the Polycomb repressive complex 2 (EPZ) had no statistically significant effect in eight independent experiments (EPZ, in grey, **Figures 22D,E and S1**). These conclusions were validated by flow cytometry analysis performed after 48 h of coculture (**Figure 22F**). Note that flow cytometry revealed an effect of PMA that was not observed by Incucyte imaging. This apparent discrepancy was related to the experimental conditions. Incucyte imaging and flow cytometry were performed at different cell THP-1/M14K ratios (1/1 and 10/1, respectively). High cell ratios were not compatible with Incucyte time-lapse imaging due to the resulting fluorescence saturation that led to misrepresentation of the number of events. In flow cytometry, high cell ratios were required to analyze significant numbers of events. The experiments were extended to another cell line of the non-epithelioid subtype (ZL34, annexin V, **Figures S2 and S3**). Epifluorescence microscopy confirmed the inhibitory effects of VPA and EPZ on lysine deacetylation and H3K27 trimethylation, respectively (**Figure 22G,H**). Time-lapse imaging further revealed that PMA and VPA promoted externalization of phosphatidylserine on THP-1 monocytes as indicated by their red fluorescence in the presence of annexin V-APC (**Figure 22I**). Notwithstanding, the phenotype of THP-1 differentiated with PMA or VPA markedly differed in terms of cell shape, motility, and

membrane receptor. While PMA increased the cell size and granularity (**Figures 22I and S4**) and reduced migration indicating monocyte-to-macrophage differentiation, VPA had no significant effect on THP-1 motility (**Figure 22J–L**). Moreover, VPA-treated THP-1 present a significantly higher expression of CD14 membrane receptor compared to mock and PMA-treated THP-1 (**Figure S5**).

Taken together, these data point out that VPA promotes THP-1 cytotoxicity towards M14K cells.

L'inhibition HDAC induite par le valproate améliore la cytotoxicité directe des monocytes contre les cellules de mésothéliome

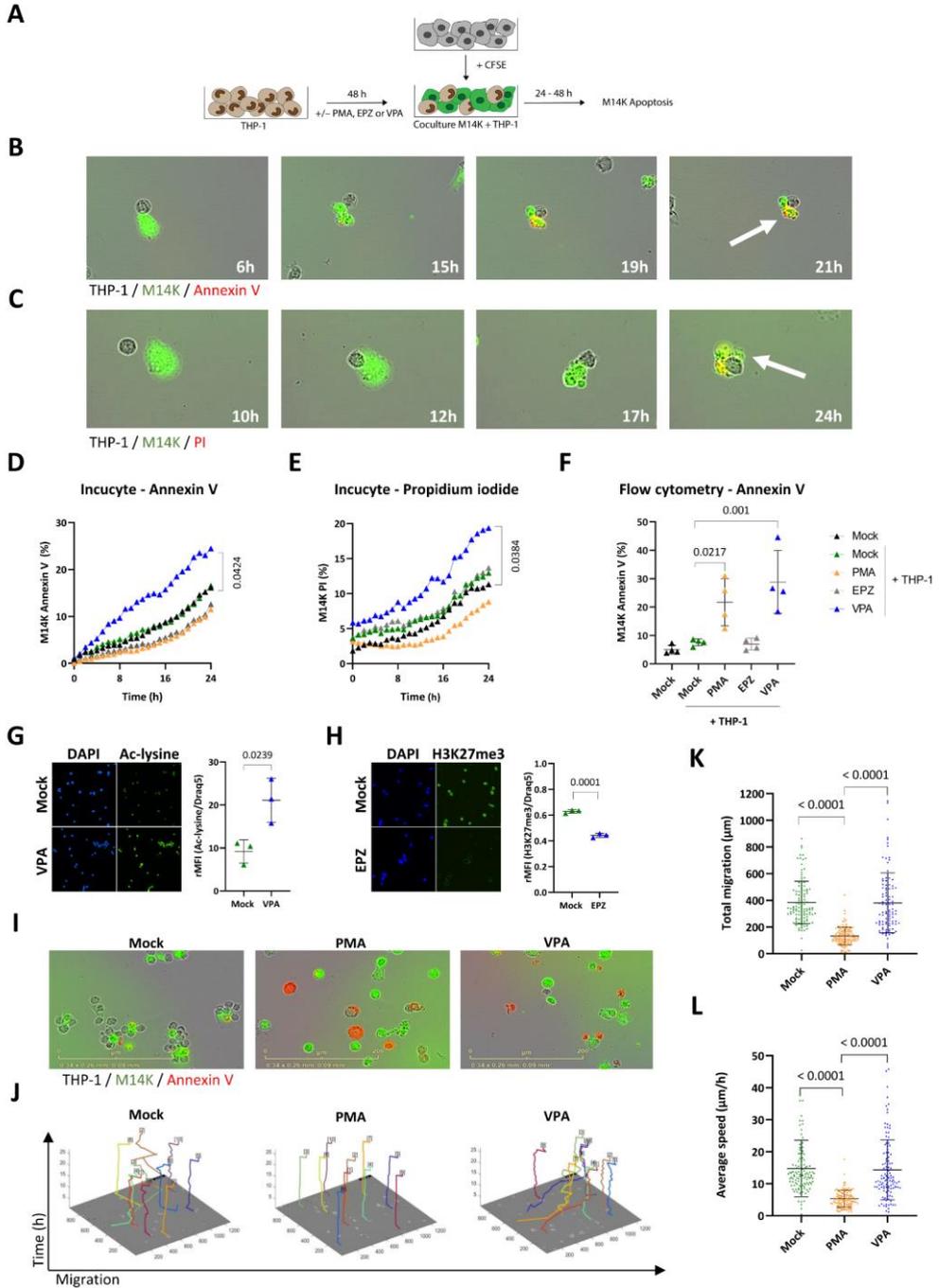


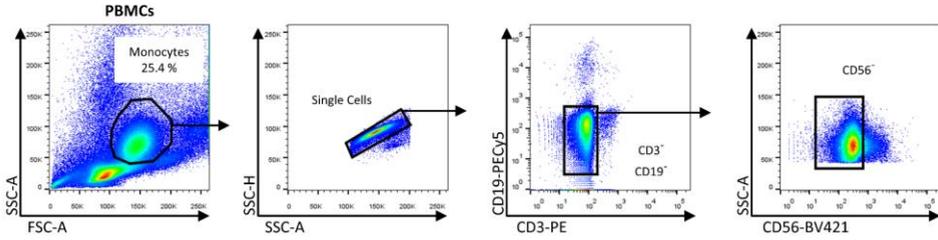
Figure 22. Direct cytotoxicity of THP-1 monocytes in contact with mesothelioma M14K cells. (A) Experimental design. THP-1 monocytes were treated with 16.2 μ M of PMA, 2.5 mM of VPA, or 10 μ M of EPZ005687 (EPZ) for 48 h. After washing the medium, THP-1 monocytes were cocultured with CFSE-labeled M14K cells at 1/1 (Incucyte) and 10/1 (Flow cytometry) ratios during 24 or 48 h. Apoptosis of M14K cells was evaluated by Incucyte S3 time-lapse microscopy and flow cytometry. (B,C) Untreated monocytes (Mock) and M14K cells were cocultured in the presence of annexin V-APC (B) or propidium iodide (C) and recorded by time lapse microscopy (Incucyte) for 24 h. (D) The percentage of annexin V positive CFSE-labeled M14K cells was calculated based on Incucyte imaging data. (E) The percentage of propidium iodide positive CFSE-labeled M14K was deduced from Incucyte imaging data. Data (D,E) are means of eight independent experiments. Statistical significance was evaluated using a one-way ANOVA test with Tukey's multiple comparison test. (F) After 48 h of coculture, cells were labeled with annexin V-APC and analyzed by flow cytometry. Apoptosis of M14K cells (%) was determined based on the double positive CFSE and annexin V labeling. Data are expressed as means of four independent experiments \pm standard deviations. Statistical significance was evaluated using a one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test. (G,H) THP-1 monocytes were labeled with anti-acetylated lysine (G) or anti-H3K27me3 (H) primary antibodies followed by Alexa Fluor 488 conjugate. The cells were stained with DAPI and mounted on slides prior to fluorescent microscopy. The graphs of relative mean fluorescence intensities (rMFI) were obtained by flow cytometry after acetylated lysine and H3K27me3 labeling and Draq5 staining. (I) Representative Incucyte images are shown. (J) Motility of THP-1 monocytes was determined with the CellTracker software using Incucyte images. (K,L) Based on CellTracker data, total migration (K) and average speed (L) of the THP-1 monocytes were determined for 10 cells per condition in triplicate. Data are presented as the means (\pm standard deviations) of four independent experiments. The statistical significance was evaluated with non-parametric Kruskal-Wallis followed by a Dunn's multiple comparison test.

Blood-derived monocytes exert a direct cytotoxic activity against MPM cells

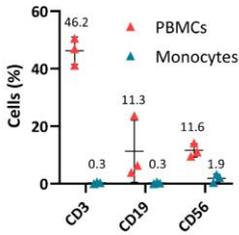
Although THP-1 have been widely used to investigate monocyte activity, this model only imperfectly recapitulates the phenotype of primary cells. For example, THP-1 monocytes are devoid of the Fc γ RIII receptor (CD16) (Forrester et al., 2018). Therefore, blood-derived monocytes were enriched from buffy coats of healthy donors using density gradient centrifugation and subsequent triple-negative sorting by flow cytometry after labeling cells with anti-CD3, anti-CD19, and anti-CD56 antibodies (**Figure 23A**). This selective protocol yielded highly purified (>97.5%) and viable monocyte populations (**Figure 23B**). Further characterization for CD14 and CD16 receptors revealed, as expected, the different phenotypes of classical, intermediate, and non-classical monocytes (**Figure 23C**). In order to investigate their ability to interact and kill MPM cells, primary monocytes were cocultured with CFSE⁺ M14K cells. After labeling with an antibody directed against the sialic acid-binding Ig-like lectin 3 (Siglec-3 or CD33), which is specific to the myeloid lineage, cells were analyzed by confocal microscopy. Representative images shown in **Figure 23D** revealed that monocytes (CD33, in red) directly interact with M14K cells (CFSE, in green) and induce their nuclear fragmentation (DAPI, in blue), indicating the onset of apoptosis (**Videos S3, S4**).

L'inhibition HDAC induite par le valproate améliore la cytotoxicité directe des monocytes contre les cellules de mésothéliome

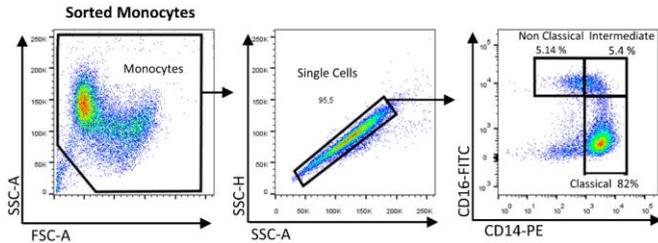
A



B



C



D

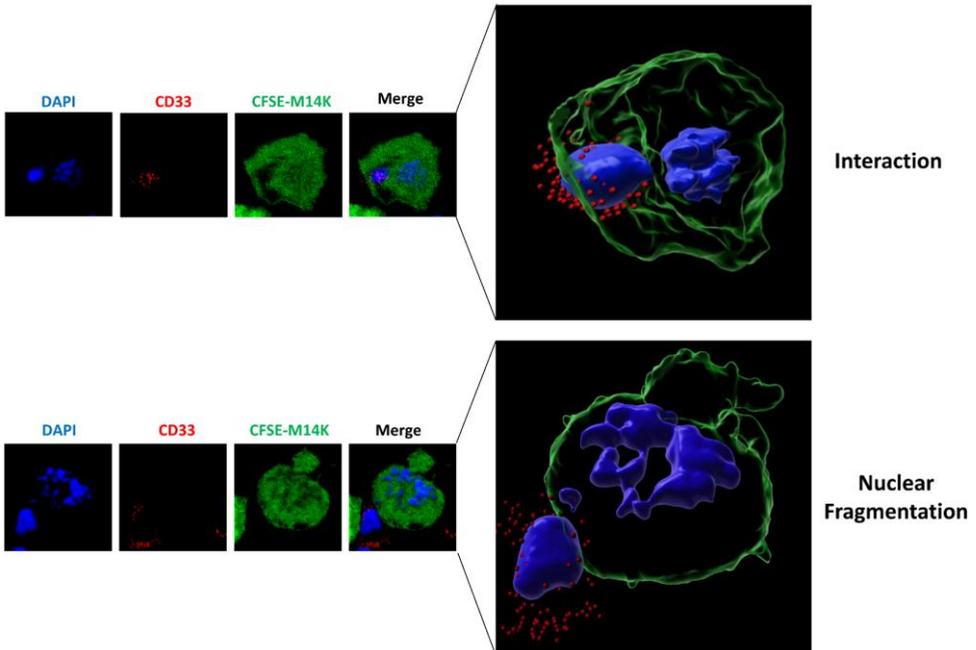


Figure 23. Cell-to-cell contact between blood-derived monocytes and M14K cells. (A) PBMCs were isolated from buffy coats of healthy donors by Ficoll gradient centrifugation. After labeling with CD3-PE, CD19-PECy5, and CD56-BV421 antibodies, monocytes were negatively sorted by flow cytometry. (B) Flow cytometry analysis of PBMCs and sorted monocytes labeled with CD3-PE, CD19-PECy5, and CD56-BV421 antibodies. The graph represents the percentages of labeled events before (PBMCs) and after cell sorting (Sorted Monocytes). (C) Isolated monocytes were labeled with anti-CD14-PE and anti-CD16-FITC. Representative plots are shown. (D) M14K cells were labeled with CFSE, incubated for 4 h, and then cocultured with freshly isolated monocytes at a ratio of 4/1. After 24 h of culture on coverslips, cells were labeled with an anti-CD33 primary antibody followed by an Alexa Fluor 647 conjugate. Cells were further fixed with PFA 4%, stained with DAPI, and analyzed with a HR confocal microscope. Images were computed with Imaris. Representative interactions between CFSE-positive M14K cells (in green) and CD33-labeled monocytes (in red) are shown. Nuclei fragmentation is revealed by DAPI staining (in blue).

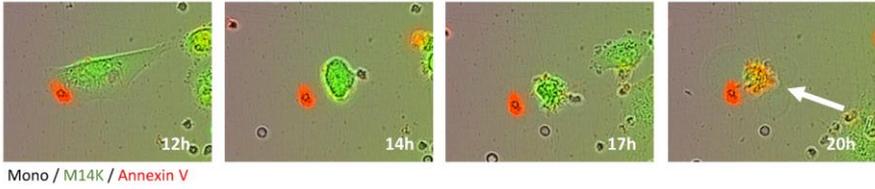
VPA positively modulates the cytotoxic activity of blood-derived monocytes against MPM cells

To further quantify their cytotoxic activity, primary monocytes (Mock) were cocultured with CFSE-labeled M14K cells and recorded by time-lapse imaging. Both annexin V-APC (**Figure 24A and Video S5**) and PI (**Figure 24B and Video S6**) fluorescent markers confirmed that primary monocytes (Mock) induce M14K cell death after a transient contact. Quantification of the Incucyte data set showed that primary monocytes were cytotoxic for M14K cells particularly in the presence of a sub-toxic dose of VPA (2 mM) (**Figures 24C,D and S6**). These conclusions were validated by flow cytometry analysis performed at 24 h of coculture (**Figure 24E**) and at different monocyte-M14K ratios (**Figure S7**). Computing Incucyte images with the CellTracker software unveiled that VPA increased the total migration and average speed of monocytes (**Figure 24F–H**). Another marked effect of VPA is the induction of clusters between monocytes and M14K cells (**Figure 24I**). Cellular aggregation was quantified from Incucyte data by measuring the cluster area formed by M14K cells with one or several monocytes. Time course kinetics revealed that cluster area increased with time in the presence of monocytes (in green) particularly when the coculture was incubated with VPA (in blue) (**Figure 24J**).

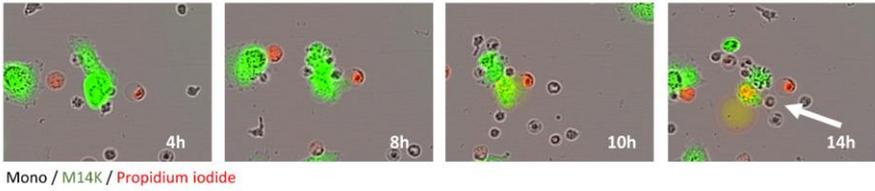
These results thus demonstrate that VPA promotes the direct cytotoxicity of primary monocytes towards MPM cells.

L'inhibition HDAC induite par le valproate améliore la cytotoxicité directe des monocytes contre les cellules de mésothéliome

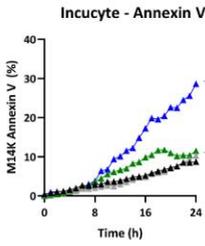
A



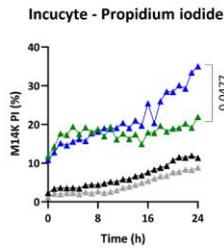
B



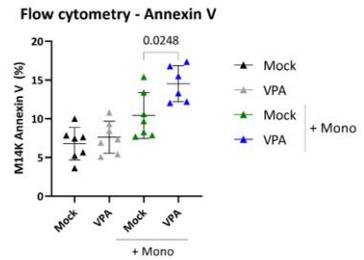
C



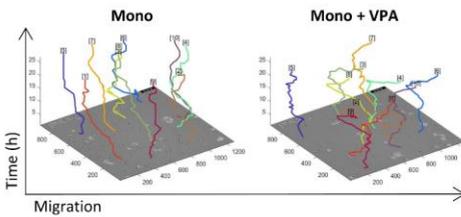
D



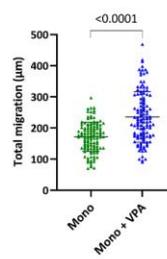
E



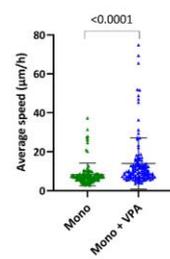
F



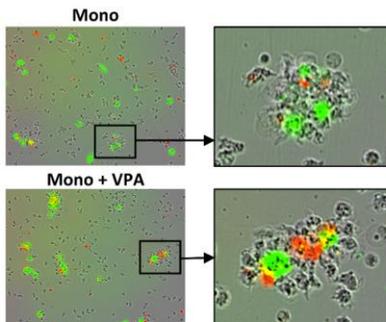
G



H



I



J

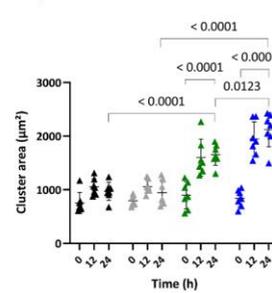


Figure 24. Effect of VPA on primary monocyte migration and cytotoxicity. (A,B) Blood-derived monocytes (Mock) were cocultured with CFSE-labeled M14K cells at a 20/1 ratio. Representative Incucyte kinetics upon labeling with annexin V-APC (A) or propidium iodide (B). (C,D) Single-cell imaging data from nine independent experiments were recorded by Incucyte. The graphs represent the mean percentages of CFSE-labeled M14K cells staining for annexin V (C) or propidium iodide (D). Statistical significance was evaluated using a one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test. (E) After 24 h of coculture, cells were stained with annexin V-APC and analyzed by flow cytometry. Mean (\pm standard deviation) percentages of CFSE-positive M14K cells labeled with annexin V were deduced from seven independent experiments. Statistical significance was evaluated using one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test. (F) Based on Incucyte images, cell motility of 10 monocytes per condition performed in triplicate was determined with the CellTracker software. Total migration (G) and average speed (H) data are the means (\pm standard deviations) of four independent experiments. The statistical significance was evaluated with non-parametric Kruskal–Wallis followed by a Dunn's multiple comparison test. (I) Representative Incucyte images of clusters formed by monocytes and CFSE-labeled M14K cells in the presence of mock or VPA. (J) Using ImageJ, the mean area of 10 clusters formed by M14K cells alone or in interaction with one or several monocytes was measured in triplicate at 0, 12, and 24 h. Data are the means (\pm standard deviations) of seven independent experiments. The statistical significance was evaluated with a two-way ANOVA followed by a Tukey's multiple comparison test.

VPA primarily affects binding and downregulates M2 markers

In order to get a deeper insight into the mechanisms promoted by VPA, the transcriptomic profiles of cocultured monocytes were established by RNA sequencing. For this purpose, monocytes were sorted by flow cytometry after being cocultured with M14K cells (**Figure 25A**). RNAs were extracted from monocytes prior (D0) and after 24 h of coculture, in the absence (D1) or in presence of VPA (D1+VPA). Complementary DNA (cDNA) libraries were amplified and sequenced with a Novaseq 6000 device. After adequate quality controls, reads were stripped of adaptors and aligned against the human reference genome. Read counts were calculated from the alignment data and differential gene expression analysis (DGEA) between experimental conditions was performed (**Tables S1–S3**). As indicated by the volcano plot of **Figure 25B**, there was no significant differentially expressed gene (DEG) at $p\text{-adj} < 0.05$ that was associated with the coculture (D1 vs. D0). In other terms, the short-term culture of monocytes in contact with tumor cells only marginally affected their transcriptome. In contrast, VPA modified the transcriptome of monocytes (**Figure 25C**), consistently with the ability of this HDAC inhibitor to induce gene expression (Noguchi et al., 2015; Felisbino et al., 2021). The heatmap of **Figure 25D** further showed the top list of DEGs affected by VPA during the coculture. Gene ontology classification and pathway enrichment analysis highlighted that protein binding (GO:0005515), carbohydrate binding (GO:0030246), small molecule binding (GO:0036094), exogenous protein binding (GO:0140272), antigen binding (GO:0003823), ion binding (GO:0043167), virion binding (GO:0046790), carbohydrate derivative binding (GO:0097367), hydrolase activity (GO:0016740), and chromatin binding (GO:0003682) predominantly characterized the effect of VPA (**Figure 25E and Table S4**). Concomitantly, membrane receptors associated with the M2 phenotype were also statistically significantly

downregulated in conditions D1+VPA compared to D0: CD163 ($\text{Log}_2(\text{Fold Change}) -1.09$; p-adj 0.05), CD206 ($\text{Log}_2(\text{Fold Change}) -1.13$; p-adj 0.05), and CD209 ($\text{Log}_2(\text{Fold Change}) -1.64$; p-adj 0.03) (**Figure 25F**).

Taken together, these data reveal that VPA primarily affects binding and downregulates expression of M2 markers by monocytes cocultured with MPM cells.

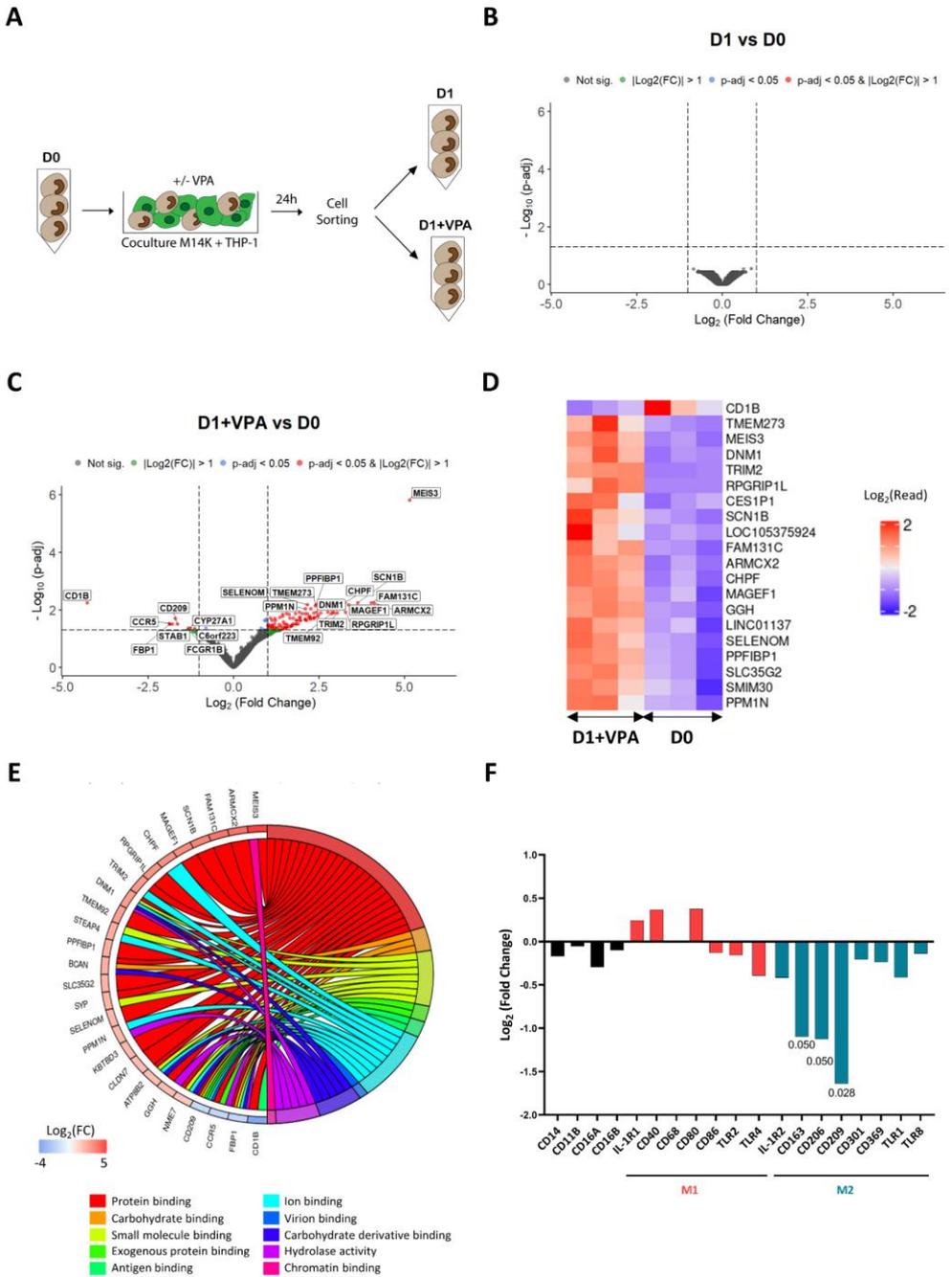


Figure 25. Transcriptomic profile of VPA-treated monocytes after cocultivation with MPM cells. (A) Experimental design. Blood-derived monocytes (D0) were cocultured with CFSE-labeled M14K cells in the absence (D1) or presence of VPA (2 mM) (D1+VPA) for 24 h. After coculture, monocytes were isolated using a flow cytometry cell sorter. The experiment was performed independently with monocytes isolated from 3 different healthy donors. After extraction of ribonucleic acids, mRNA was purified, converted to cDNA libraries, and sequenced with a Novaseq 6000 device. (B) Volcano plot of differentially expressed genes between D1 and D0 conditions with Log₂(Fold Change) threshold: 1, p-adj threshold: 0.05, shrinkage method: ashr. (C) Volcano plot of differentially expressed genes between D1+VPA and D0 conditions with Log₂(Fold Change) threshold: 1 and p-adj threshold: 0.05, shrinkage method: ashr. (D) Heatmap of the most significant DEGs deduced from 3 independent donors in the conditions D1+VPA and D0. The color key represents the Log₂(read count) (DEGs) from low (blue) to high (red). (E) Representative chord diagram of the 10 most significant pathways from GO: Molecular Functions (GO:MF) between the conditions D1+VPA and D0. The chords show a detailed relationship between Log₂(Fold Change) of DEGs (left semicircle) and their enriched GO:MF pathways (right semicircle). The color key represents the Log₂(Fold Change) from low (blue) to high (red). The GO enrichment analysis was performed by considering all significant genes (p-adj < 0.05). (F) Log₂(Fold Change) of selected membrane receptors between the conditions D1+VPA and D0.

2.2.4. Discussion

In this study, we showed (i) that blood-derived human monocytes induce tumor cell death by direct cell-to-cell contact, (ii) that VPA is a pharmacological enhancer of this cytotoxic activity, (iii) that VPA increases monocyte migration and their aggregation with MPM cells, and (iv) that the molecular mechanisms behind VPA modulation of monocytes involve a downregulation of the membrane receptors associated with the M2 phenotype, i.e., CD163, CD206, and CD209.

The monocyte/macrophage lineage specific CD163 is the high affinity scavenger receptor for the hemoglobin–haptoglobin complex. The mannose receptor CD206, a C-type lectin notably expressed by macrophages, is involved in the resolution of inflammation. CD209 (DC-SIGN) is another C-type lectin that has a high affinity for the intercellular adhesion molecule-3 (ICAM3) and therefore functions as an adhesion molecule. By decreasing the level of expression of these three receptors, VPA may thus affect differentiation of monocytes to M2 macrophages/TAMs (**Figure 25F**) (Yunna et al., 2020). Although this is speculative, reduced expression of adhesion receptors may also favor the motility of monocytes as indicated by the increase in their migration and average speed (**Figure 24F–H**). At first glance, the reduced expression of adhesion receptors is less consistent with the ability of monocytes to form clusters with MPM cells (**Figure 24I, J**). It is nevertheless possible that increased kinetics of migration favors cell-to-cell interactions. Gene ontology has highlighted that binding (GO:0005488), including protein binding (GO:0005515), carbohydrate binding (GO:0030246), small molecule binding (GO:0036094), exogenous protein binding (GO:0140272), antigen binding (GO:0003823), ion binding (GO:0043167), virion binding (GO:0046790), carbohydrate derivative binding (GO:0097367), and chromatin binding (GO:0003682), are the most significant hallmarks of VPA activity in monocytes

cocultured with M14K cells (**Figure 25E**). The remarkably pleiotropic effects of VPA include binding and destabilization of the Sodium Voltage-Gated Channel Beta Subunit 1 (SCN1B: $\text{Log}_2(\text{Fold Change})$ 3.58; $p\text{-adj}$ 0.005) (**Figure 25C**) (Zanatta et al., 2019). By binding to SCN1B, VPA affects voltage-gated sodium channel function; thereby blocking propagation of action potentials and preventing epilepsy. VPA further acts as a pharmacological chaperone that binds to the Visual G Protein-Coupled Receptor Rhodopsin destabilizing its proper folded conformation (Razzaghi et al., 2021). More strikingly, the volcano plot of Figure 25C highlights that MEIS3 is by far the most upregulated gene (MEIS3: $\text{Log}_2(\text{Fold Change})$ 5.10; $p\text{-adj}$ 1.40×10^{-6}) upon VPA treatment. MEIS3 is a transcriptional regulator that directly activates the expression of 3-Phosphoinositide Dependent Protein Kinase 1 (PDPK1) (Liu et al., 2010). This kinase participates in activation of AKT/PKB and NF- κ B pathways, regulation of Ca^{2+} uptake, and motility of vascular endothelial cells. By contrast, PDPK1 also provides negative feedback to toll-like receptor-mediated NF- κ B activation in macrophages. Moreover, CD1B is the most downregulated gene upon VPA treatment (CD1B: $\text{Log}_2(\text{Fold Change})$ -4.18 ; $p\text{-adj}$ 5.13×10^{-3}). CD1B belongs to the family of non-classical major histocompatibility complex class-I-like molecules and is expressed by monocytes/macrophages. The function of CD1B pertains to lipid antigen presentation at the cell surface of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells (Flaherty, 2012; Chancellor et al., 2018). Whether these genes are involved in monocyte cytotoxicity requires further investigation with agonists/antagonists and genetic inactivation.

The broad biological effects of VPA on innate immunity mediated by monocytes/macrophages are complex and still misunderstood. A series of reports correlate VPA treatment to immunosuppressive functions such as reduction of inflammation, phagocytosis, adhesion, and cytokine production (Bode and Dalpke, 2011; Roger et al., 2011; Wu et al., 2012; Soria-Castro et al., 2019; Singh et al., 2021). For example, VPA favors M2 polarization of RAW 264.7 macrophages in response to LPS by changing the cytokine profile (increase in IL-10 and decrease in IL-12p70, IL-6, and TNF- α) and the pattern of costimulatory molecules (increase in CD86 and decrease in CD80 and CD40) (Chateauvieux et al., 2011). In LPS-stimulated THP-1 monocytes, VPA inhibits NF- κ B activation and diminishes the secretion of both IL-6 and TNF- α . Furthermore, VPA also inhibits the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS), thereby reducing NO production in IFN- γ -treated RAW264.7 macrophages. In contrast, other evidences highlight that VPA also induces immunostimulatory effects. For example, VPA promotes acetylation of mitochondrial superoxide dismutase-2 (SOD2) and stimulates ROS production (Hansen et al., 2021). VPA also induces a significant increase in the expression of genes belonging to the monocytic differentiation network, including CD11b (Chateauvieux et al., 2011). Furthermore, VPA activates transcription of pro-inflammatory cytokines (IL-12, IL-6, IFN- γ , and TNF- α) associated with M1 markers (Cai et al., 2021). The pleiotropic effects of VPA on innate immunity are further complexified by the favored differentiation of the monocyte/macrophage lineage from myeloid hematopoietic progenitors (Gurvich et al., 2004; Das Gupta et al., 2016; Soria-Castro et al., 2019).

In order to modulate this broad diversity of effects, the most likely hypothesis is that VPA affects the cell transcriptome via epigenetic mechanisms (Hamaidia et al., 2016). As a broad-spectrum HDAC inhibitor, VPA indeed inhibits deacetylation of histones and counterbalances the ionic interactions between positively charged lysines and phosphates of the DNA. As a result, the chromatin adopts an open conformation leading to increased RNA transcription and DNA replication (Van den Bossche et al., 2014). As a short-chain fatty acid, VPA chelates the Zn^{2+} ion in the catalytic pocket of HDACs and inhibits their lysine deacetylase activity. Complex and selective transcriptional changes occur during monocyte-to-macrophage differentiation with both increased and decreased H3K27 acetylation at promoters (Saeed et al., 2014). In our study, the volcano plot of Figure 25B shows that monocytes did not significantly modify their transcriptome during the one-day culture, indicating the limited, or absence of, differentiation into macrophages. These experimental conditions, thus, differ from those set in other studies that investigated longer periods (48–72 h) of coculture and consequently monocyte differentiation in the presence of tumor cells (Blondy et al., 2020; Mola et al., 2021). Moreover, markers associated to monocyte differentiation were not significantly differentially expressed. Those markers include PU.1 ($\text{Log}_2(\text{Fold Change}) -0.07$; p-adj 0.99), IRF8 ($\text{Log}_2(\text{Fold Change}) -0.25$; p-adj 0.74), KLF4 ($\text{Log}_2(\text{Fold Change}) -0.42$; p-adj 0.45), KLF2 ($\text{Log}_2(\text{Fold Change}) -0.33$; p-adj 0.51), CEBPB ($\text{Log}_2(\text{Fold Change}) -0.26$; p-adj 0.77), NR4A1 ($\text{Log}_2(\text{Fold Change}) -0.18$; p-adj 0.61), MAFB ($\text{Log}_2(\text{Fold Change}) -0.38$; p-adj 0.60), and Flt3 ($\text{Log}_2(\text{Fold Change}) -0.30$; p-adj 0.66). In contrast, statistically significant transcriptional changes characterized the effect of VPA (**Figure 25C,D**). Although unsupervised gene ontology primarily unveiling binding (GO:0005488) is consistent with functions of cell clustering, other direct mechanisms of VPA cannot be formally excluded. For example, VPA also acts as a pharmacological chaperone that interacts with membrane-bound receptors and destabilizes their conformation (Razzaghi et al., 2021).

In this report, we showed that VPA improves direct cytotoxicity of human blood-derived monocytes towards epithelioid MPM cells. The experimental model is based on highly purified monocytes sorted by triple-negative selection using flow cytometry and time-lapse imaging. The conclusions extend pioneering studies based on partially purified monocytes and poorly sensitive assays (^{51}Cr release, ^3H thymidine incorporation) (Musson, 1983; Uchida and Yanagawa, 1984; Webb and Gerrard, 1990; Te Velde and Figdor, 1991). Therefore, these technical settings did not reveal the direct cytotoxicity of unstimulated monocytes in basal conditions. It is also important to keep in mind that our experimental conditions did not include human serum or antibodies against tumor antigens, thereby excluding the onset of ADCC (Elavazhagan et al., 2015; Yeap et al., 2016). Single-cell imaging by Incucyte also highlighted the involvement of a transient contact between monocytes and M14K just prior to cell death based on annexin V and propidium iodide labeling (**Videos S5, S6**). Finally, confocal microscopy validated the nuclear fragmentation of M14K cells in contact with CD33-positive monocytes sorted by CD3/CD19/CD56 triple-negative selection. Notwithstanding similar observations obtained with ZL34 non-epithelioid cells cultured with THP-1 (**Figures S2 and S3**), additional experiments are planned to assess cytotoxicity of

primary monocytes in other mesothelioma subtypes (sarcomatoid and biphasic). Besides, further technical improvements in our approach may include culture conditions in 3D spheroid models (Blondy et al., 2020; Mola et al., 2021) combined with light-sheet fluorescence microscopy (Stelzer, 2014). Microfluidics has also recently opened prospects to simultaneously investigate single cell cloning, live cell–cell interactions, and their transcriptional profiling (Van Lent et al., 2021). These technical improvements that associate phenotype and function would not only confirm the direct cytotoxicity of monocytes towards MPM cells but also provide information about their diversity, their cytotoxic mechanisms, and kinetics of expression. Of particular interest will be the focus on the newly identified monocyte subpopulation that distinctively expresses a cytotoxic gene signature (PRF1, GNL3, CTSW) (Villani et al., 2017).

Many open questions remain about the involvement of the monocyte–macrophage lineage in the context of mesothelioma. In clinical studies, the presence of immunosuppressive macrophages in MPM biopsies correlates with poor overall survival (Cornelissen, 2015; Chee et al., 2017; Salaroglio et al., 2019). Furthermore, low lymphocyte-to-monocyte ratios are associated with poor prognosis (Burt et al., 2011; Yamagishi et al., 2015; Tanrikulu et al., 2016; Cantini et al., 2020). Consistently, culture models reveal that monocytes differentiate into M2-type macrophages upon contact with MPM cells (Musson, 1983; Chéné et al., 2016; Lievense et al., 2016; Blondy et al., 2020; Mola et al., 2021). Pleural fluid from MPM patients promotes the immunosuppressive phenotype of macrophages through prostanoid prostaglandin E2 (Lievense et al., 2016). These immunosuppressive macrophages inhibit T-cell proliferation, decrease cytotoxicity of tumor antigen-specific CD8+ T lymphocytes, and limit chemotherapy efficiency (Chéné et al., 2016; Mola et al., 2021). Moreover, the C-C motif chemokine ligand 2 (CCL2) is a chemoattractant for monocytes that differentiate them into M2 macrophages via the M-CSF/CSF1R signaling pathway (Chéné et al., 2016; Blondy et al., 2020). Pharmacological inhibitors targeting COX-2 (celecoxib) and CSF1R signaling (pexidartinib and GW2580) efficiently impair differentiation of monocytes into M2 macrophages (Veltman et al., 2010; Chéné et al., 2016; Dammeijer et al., 2017). A clinical trial currently evaluates the potential therapeutic improvement of celecoxib in mesothelioma (INFINITE NCT03710876) (Janes et al., 2021). Alternatively, a monoclonal antibody that inhibits CSF-1 receptor (CSF-1R) activation may be further investigated (NCT01494688) (Ries et al., 2014). Although less specific, another strategy to prevent macrophage immunosuppression would be to deplete phagocytic cells with liposome-encapsulated clodronate that efficiently reduced tumors in a mouse model of mesothelioma and that was previously evaluated in other cancers (i.e., Bonafos in NCT00873808) (Miselis et al., 2008).

These different strategies that reduce monocyte infiltration or deplete phagocytes have the major drawback of interfering with their essential roles in cancer immunity. Besides antigen presentation, expression of cytokines, activation of cytotoxic T-lymphocytes, and phagocytosis of apoptotic cancer cells, our results show that macrophages (Hamaidia et al., 2019) and monocytes (this report) are directly cytotoxic for MPM cells. This activity is modulated by different epigenetic regulators in macrophages (EZH2) and in monocytes (HDACs). The final outcome of pharmacological inhibitors

targeting epigenetic modifications is even complexified by their effects on monocyte recruitment and antitumor activity (Mola et al., 2021). It is, therefore, likely that more specific agonists/antagonists will be required to preserve the anticancer functions of monocyte/macrophages while impairing their immunosuppressive effects. In this paradigm, an essential parameter will be the toxicity of the candidate compounds. A randomized phase 3 trial (NCT00128102) assessing a monotherapy with a more potent HDAC inhibitor (i.e., suberoylanilide hydroxamic acid, Vorinostat) did not improve overall survival (Krug et al., 2015). In contrast, VPA was well tolerated and improved a second line chemotherapy (Scherpereel et al., 2011; Disselhorst and Baas, 2020; Staumont et al., 2020; Janes et al., 2021).

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The RNA sequencing datasets presented in this study can be found in Tables 1-2-3-4.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CH and AF performed experiments and analyzed data; JJ provided technical support; VH, RL, BD, AS and EV provided clinical information; MJ designed and performed bioinformatic analyzes; MH and LW designed the study. CH and LW drafted the manuscript. All authors edited and approved the manuscript.

FUNDING

This research was funded by the Fonds National de la Recherche Scientifique (FNRS), the Télévie, the Belgian Foundation against Cancer (FBC), the Fonds Spéciaux pour la Recherche de l'Université de Liège and the Fondation Léon Fredericq (FLF). C.H. (FNRS research fellow), A.F. (Télévie fellow), M.J., and M.H. (Télévie post-doctoral researchers) and L.W. (research director) are members of the FNRS.

ACKNOWLEDGMENTS

We are very grateful to the Red Cross of Belgium for providing the buffy coats. We also thank the GIGA technological platforms for advice and support.

2.2.5. Supplementary data

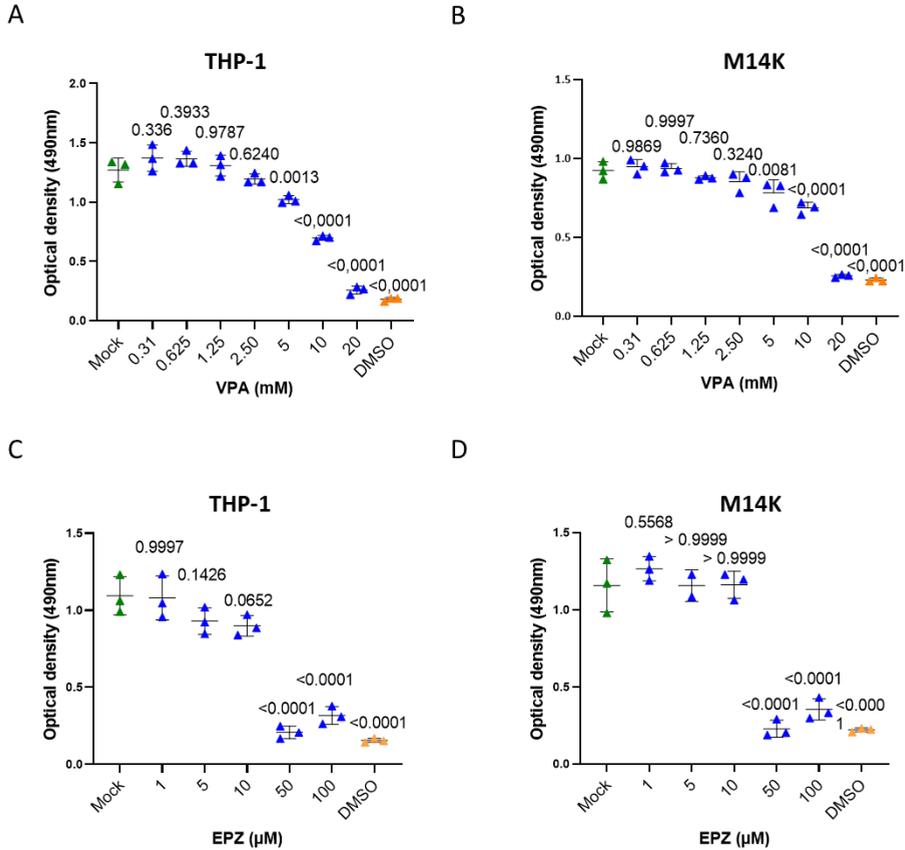


Fig S 1. Dose-response of VPA and EPZ on metabolic activity of THP-1 and M14K cells. THP-1 (A) and M14K cells (B) were cultured with increasing concentrations of VPA (0, 0.31, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 and 20 mM). THP-1 (C) and M14K cells (D) were incubated with increasing concentrations of EPZ (0, 1, 5, 10, 50 and 100 μ M). After 48 hours, activity of NAD(P)H-dependent dehydrogenases was measured using the MTS assay. Treatment of cells with DMSO (10%) was used as positive control. Data are presented as the means of three independent experiments \pm standard deviations. Statistical significance was evaluated using a one-way ANOVA test with Dunnett's multiple comparison test.

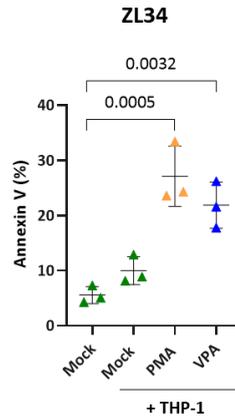


Fig S 2. Direct cytotoxicity of THP-1 in contact with mesothelioma ZL34 cells measured by flow cytometry. THP-1 cells were cultured in presence of 16.2 μ M of PMA or 2.5 mM of VPA during 48 hours. After washing the medium, THP-1 were cocultured with CFSE-labeled ZL34 cells at a 10/1 ratio during 48 hours. Annexin V⁺ ZL34 cells were counted by flow cytometry. Data (%) are presented as the means of three independent experiments \pm standard deviations. Statistical significance was evaluated using a one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test.

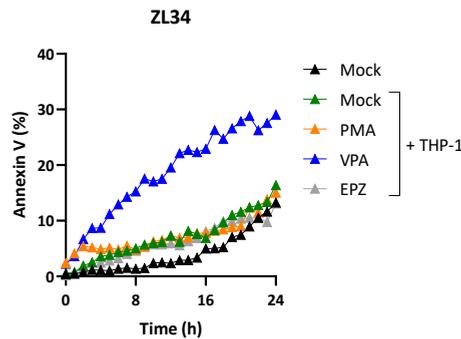


Fig S 3. Direct cytotoxicity of THP-1 in contact with mesothelioma ZL34 cells analyzed by Incucyte. THP-1 cells were cultured in presence of 16.2 μ M of PMA, 2.5 mM of VPA or 10 μ M of EPZ during 48 hours. After washing the medium, THP-1 were cocultured with CFSE-labeled ZL34 cells at a 1/1 ratio during 24 hours. The percentage of annexin V positive CFSE-labeled ZL34 cells was calculated based on Incucyte imaging data. Data (%) are presented as the means of three independent experiments \pm standard deviations. Statistical significance was evaluated using a one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test.

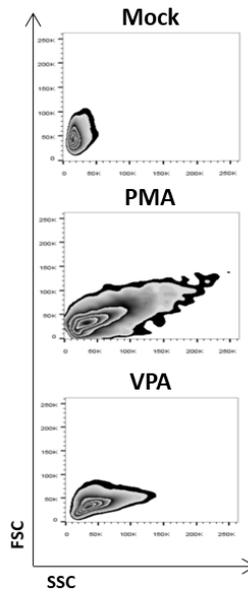


Fig S 4. Effect of PMA and VPA on THP-1 cell size and granularity. THP-1 cells were cultured in presence of 16.2 μ M of PMA or 2.5 mM of VPA during 48 hours and analyzed by flow cytometry. Forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) profiles allow for the discrimination of cells by size and granularity, respectively.

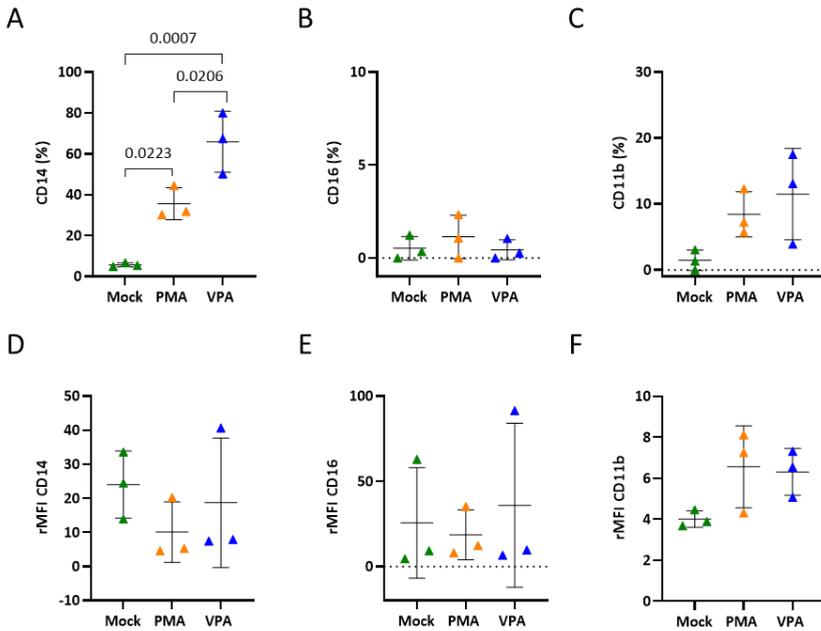


Fig 5. Effect of PMA and VPA on expression of CD14, CD16 and CD11b by THP-1 cells. THP-1 cells (1×10^6 cells in a 6 well plate) were cultured in absence (mock) or in presence of $16.2 \mu\text{M}$ of PMA or 2.5 mM of VPA for 48 hours. Cells were labeled with antibodies directed against CD16 (*Immunotools*) or CD11b (*Immunotools*) followed by Alexa Fluor 647 conjugates (*Invitrogen*) and anti-CD14-PE (*Beckman Coulter*). After recording events by flow cytometry (BD FACSCanto, *BD Biosciences*), data were analyzed with FlowJo v10 software (*BD Biosciences*). Data were expressed in percentages of fluorescent cells (A-C) or in ratio of mean of fluorescence intensity (rMFI) (D-E). Data (%) are presented as the means of three independent experiments \pm standard deviations. Statistical significance was evaluated using a one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test.

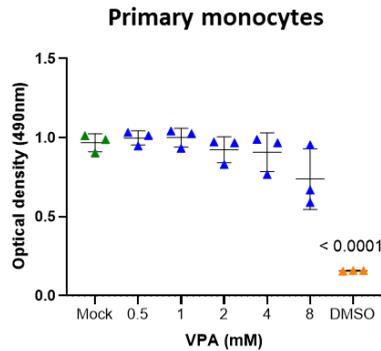


Fig S 6. Dose-response of VPA on metabolic activity of primary monocytes. After isolation, primary monocytes were cultured in presence of increasing concentrations of VPA (0, 0.5, 1, 2, 4 and 8 mM) during 24 hours. Cell viability activity was measured using the MTS assay. Treatment of primary monocytes with DMSO (10 %) was used as positive control. Data (optical densities at 490 nm) are presented as the means of three independent experiments \pm standard deviations. Statistical significance was evaluated using a one-way ANOVA test with Dunnett's multiple comparison test.

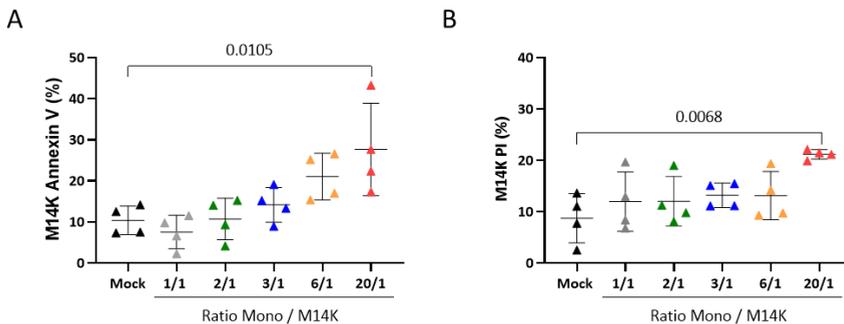


Fig S 7. Direct cytotoxicity of blood-derived monocytes in contact with mesothelioma M14K cells at different ratios. After isolation, primary monocytes were cocultured with CFSE-labeled M14K at different monocyte/M14K cell ratios 1/1 ($3 \times 10^3/3 \times 10^3$), 2/1 ($6 \times 10^3/3 \times 10^3$), 3/1 ($9 \times 10^3/3 \times 10^3$), 6/1 ($18 \times 10^3/3 \times 10^3$) and 20/1 ($6 \times 10^4/3 \times 10^3$). Cell cultures were recorded by Incucyte in presence of annexin V (A) or propidium iodide (B) during 24 hours. The percentages of annexin V (A) or propidium iodide (B) positive CFSE-labeled M14K cells were retrieved after 24 hours from the Incucyte data sets. The means \pm standard deviations result from four independent experiments. Statistical significance was evaluated using a one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test.

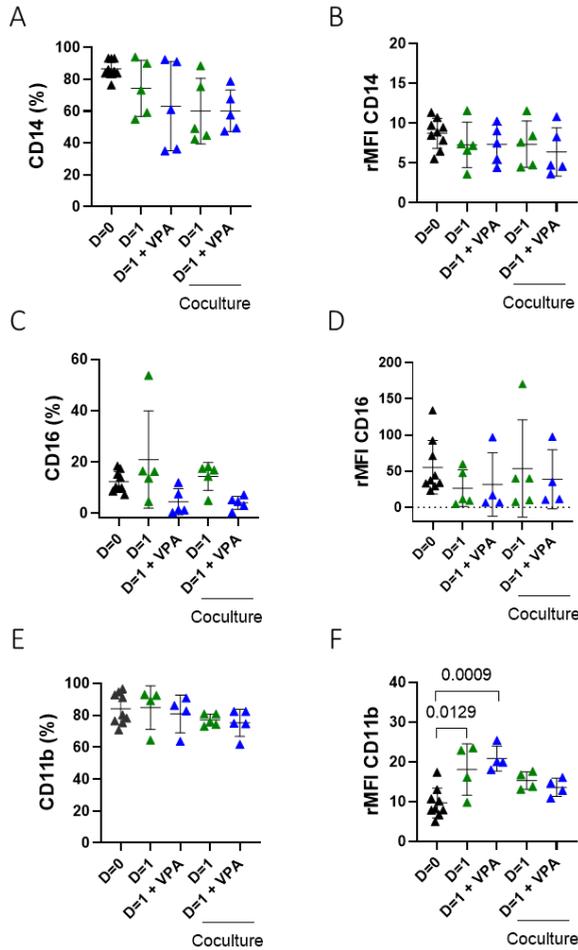


Fig S 8. Effect of VPA on expression of CD14, CD16 and CD11b by primary monocytes. Primary monocytes (5×10^5 cells in a 6 well plate) were cultivated alone or cocultured with M14K cells (25×10^3) in absence or in presence of 2 mM of VPA during 24 hours. Cells were labeled with antibodies directed against CD16 (*Immunotools*) or CD11b (*Immunotools*) followed by Alexa Fluor 647 conjugates (*Invitrogen*) and anti-CD14-PE (*Beckman Coulter*). After recording events by flow cytometry (BD FACSCanto, *BD Biosciences*), data were analyzed with FlowJo v10 software (*BD Biosciences*). Data were expressed in percentages of fluorescent cells (A,C,E) or in ratios of mean of fluorescence intensity (rMFI) (B,D,F). Data are presented as the means of five independent experiments \pm standard deviations. Statistical significance was evaluated using a one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test.

4

Discussion générale, perspectives et conclusion

Les monocytes sont des cellules de l'immunité innée qui pourraient constituer une première ligne de défense contre les cellules de MPM. En plus d'être précurseurs des macrophages et des cellules dendritiques, les monocytes sont capables d'exercer des fonctions essentielles dans l'activation et le maintien du système immunitaire via la phagocytose, l'ADCC ainsi que la production de cytokines et de substances réactives oxygénées et azotées (Belge et al., 2002; Cros et al., 2010; Wong et al., 2011; Yeap et al., 2016; Boyette et al., 2017).

Pendant, la présence de monocytes est considérée comme un indicateur négatif dans les cancers (Gentles et al., 2015). Dans le cas du MPM, un nombre important de monocytes circulants est associé à une faible survie des patients (Burt et al., 2011). En tant que précurseurs des TAMs et des M-MDSCs, les monocytes contribuent au développement tumoral en initiant la néo-angiogenèse, l'échappement immunitaire et l'invasion métastatique (Guilliams et al., 2018). Parallèlement, des études ont montré que certaines thérapies, telles que la chimiothérapie, promeuvent la différenciation des monocytes vers un phénotype M2 et induisent la prolifération des MDSCs dans l'environnement tumoral (Dijkgraaf et al., 2013; Ding et al., 2014). De plus, dans le cadre de cette thèse, nous avons montré que le nombre de monocytes augmente significativement après un traitement chimiothérapeutique ou immunothérapeutique (**Figure 21A, B**). Dans ce contexte, le manque d'efficacité des thérapies du MPM pourrait notamment s'expliquer par la présence de monocytes, précurseurs de cellules immunosuppressives, dans le microenvironnement.

A cet égard, plusieurs stratégies thérapeutiques ont été mises en place dans le but d'appauvrir le nombre de monocytes (trabectedin, biphosphate) ou de limiter leur recrutement (CCL2, M-CSF) au sein du microenvironnement tumoral. L'inhibition du recrutement via l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-CCL2 a notamment permis d'inhiber le nombre de métastases et d'augmenter la survie des souris atteintes d'une tumeur mammaire (Qian et al., 2012). En outre, le blocage du M-CSF au moyen de siRNAs a permis de diminuer l'infiltration en macrophages et a largement réduit la croissance tumorale (Aharinejad et al., 2004). Bien qu'encourageantes, ces approches présentent l'inconvénient d'empêcher les monocytes/macrophages d'exercer leurs fonctions immunitaires. En maintenant l'infiltration monocyttaire, une autre approche consisterait à moduler ces monocytes vers un phénotype antitumoral.

A cet effet, plusieurs études ont démontré l'implication des modulations épigénétiques dans les fonctions et la plasticité des cellules myéloïdes. Par exemple, l'histone déméthylase JMJD3 est impliquée dans la polarisation des macrophages vers un phénotype M2 (Satoh et al., 2010). Les histones déacétylases semblent également moduler les fonctions immunitaires des monocytes (de Groot and Pienta, 2018).

Dans ce contexte, cette thèse s'est focalisée sur l'activité cytotoxique directe des monocytes envers les cellules de MPM en présence de modulateurs épigénétiques.

1. Les monocytes exercent une activité cytotoxique contre les cellules de MPM

Le premier objectif de cette thèse a consisté à étudier l'activité cytotoxique directe des monocytes dans le MPM. Pour ce faire, deux modèles de monocytes ont été utilisés. Le premier modèle est basé sur une lignée cellulaire monocyttaire (THP-1) originaire du sang périphérique d'un patient présentant une leucémie monocyttaire aiguë. Le second modèle utilise les monocytes humains isolés à partir de sang de donneurs sains. Afin d'étudier l'activité cytotoxique des monocytes, ces cellules ont été cocultivées en présence de cellules de MPM (M14K). L'apoptose des M14K a été analysée au moyen de marquage à l'annexine V, à l'iodure de propidium et au DAPI par imagerie Incucyte, cytométrie en flux et microscopie confocale.

Les résultats démontrent que les monocytes primaires induisent une augmentation significative du pourcentage d'apoptose des cellules de MPM (**Figure 24C-E**). De plus, l'imagerie Incucyte montre que l'apoptose des cellules tumorales se produit lors d'un contact avec un monocyte (**Figure 24 A,B**). Ensuite, l'analyse en microscopie confocale a pu mettre en évidence que la fragmentation nucléaire d'une cellule tumorale se produisait en contact avec une cellule myéloïde (CD33⁺), isolée à partir de sang de patient, excluant, dès lors, l'activité cytotoxique associée aux cellules NKs (**Figure 23D**). Finalement, l'analyse en séquençage ARN a montré qu'une coculture de 24 heures n'affecte que très faiblement le transcriptome des monocytes primaires indiquant la différenciation limitée ou l'absence de différenciation en macrophages (**Figure 25B**). Ces résultats démontrent, dès lors, que les monocytes primaires sont capables d'exercer une activité cytotoxique directe contre les cellules de MPM. Parallèlement, les monocytes THP-1 n'ont pas présenté d'activité cytotoxique significative contre les cellules de MPM, quoiqu'observée en imagerie Incucyte (**Figure 22 B-F**).

Le fait que l'activité cytotoxique soit significative en présence de monocytes primaires et non en présence de THP-1 peut s'expliquer par les différences phénotypiques de ces deux modèles. Les THP-1 correspondent à une lignée cellulaire humaine associée à un stade de différenciation pro-monocyttaire qui est, dès lors, précoce par rapport à celui des monocytes primaires (Lackman and Cresswell, 2006; Chanput et al., 2015). En outre, une caractérisation phénotypique a notamment mis en évidence que les THP-1 n'exprimaient pas les récepteurs CD1a, CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD35, CD36, CD55, CD59, CD80, CD86, CD163, CD204, CD327 (Siglec 6), CD328 (Siglec 7), CD329 (Siglec 9), Siglec 10, TIM-3, TIM-4, normalement exprimés chez les monocytes primaires (Forrester et al., 2018; Riddy et al., 2018). Ces résultats soulignent les limitations associées à l'utilisation de lignées monocytaires et renforcent le besoin d'utiliser des monocytes issus d'un environnement plus pertinent, comme dans le cas de ce travail où l'accent a été mis sur l'isolement de monocytes à partir de donneurs sains.

Bien que peu caractérisée, la capacité des monocytes, isolés à partir de sang périphérique, à induire spontanément l'apoptose des cellules tumorales a déjà été investiguée et démontrée (Mantovani et al., 1979; Gerrard et al., 1980). Holtermann et al. Rinehart et al. ont été parmi les premiers à démontrer que la coculture de monocytes

primaires avec des cellules tumorales permettait de réduire leur nombre (Holtermann et al., 1974; Rinehart et al., 1978). A partir de ces résultats, un grand nombre d'articles ont vu le jour sur le sujet. Cependant, en raison des techniques de l'époque, ces recherches présentent les inconvénients d'avoir été réalisées avec des tests moins sensibles ainsi qu'avec une population de monocytes présentant une pureté limitée. De plus, il est important de préciser que dans certaines de ces études, les étapes d'isolement des monocytes ont été menées en présence de sérum humain ou d'anticorps humains non spécifiques, ne pouvant, dès lors, pas exclure les cytotoxicités dépendantes des anticorps ou du système du complément.

Dans ces études, il est démontré que les monocytes humains sont capables d'exercer une activité cytotoxique contre un grand nombre de cancers (Rinehart et al., 1978; Mantovani et al., 1979; Gerrard et al., 1980; Mukherji, 1980; Kirsch et al., 1994; Mytar et al., 1999; Yeap et al., 2016). Les différents cancers étudiés sont le cancer du poumon, de la vessie, du sein, du colon, du cerveau, des ovaires, de la prostate, du pancréas, de la peau et la leucémie. Il est important de souligner qu'aucune de ces études n'a relevé un cancer particulier présentant une résistance face à la cytotoxicité des monocytes. Finalement, dans ces études, l'activité cytotoxique des monocytes n'a pas été étudiée dans un modèle de mésothéliome ne pouvant donc pas confronter les résultats à cette présente thèse.

Parallèlement, un ensemble d'observations associées à l'activité cytotoxique des monocytes a pu être mis en évidence dont la sélectivité de l'activité antitumorale aux cellules néoplasiques, l'effet ratio, l'impact des sous-populations, l'effet de la stimulation ainsi que différents mécanismes cytotoxiques impliqués (**Tables 3 et 4**). Ces observations seront détaillées brièvement dans la suite du document.

Table 3. Observations associées à l'activité cytotoxique des monocytes en fonction des études

Observations	Références qui soutiennent les observations
Sélectivité de l'activité antitumorale aux cellules néoplasiques	(Mantovani et al., 1979) (Gerrard et al., 1980) (Fidler and Kleinerman, 1984) (Sone et al., 1985) (Barna et al., 1991) (Mytar et al., 1999)
L'activité cytotoxique augmente avec le ratio (monocytes/cellules tumorales)	(Mukherji, 1980) (Fischer et al., 1981) (Shimizu and Fujimoto, 1990) (van de Loosdrecht et al., 1993) (Griffith et al., 1999) (Washburn et al., 2003)

Les sous-populations de monocytes exercent différemment l'activité cytotoxique	(Szaflarska et al., 2004)
L'activité cytotoxique augmente lorsque les monocytes sont stimulés avec :	
<i>Muramyldipeptique</i>	(Saiki et al., 1985) (Worth et al., 1999)
<i>LPS</i>	(Sone et al., 1985) (Ziegler-Heitbrock et al., 1986) (Fidler et al., 1986) (Barna et al., 1987) (Sone et al., 1988) (Sampson-johannes and Carlino, 1988) (Shimizu and Fujimoto, 1990) (Smith et al., 1990) (Barna et al., 1991) (Bernasconi et al., 1991) (Singh et al., 1996)
<i>Acyltripeptide</i>	(Sone et al., 1988)
<i>IFN-α, -β, -γ</i>	(Saiki et al., 1985) (Philip and Epstein, 1986) (Itoh et al., 1987) (Sampson-johannes and Carlino, 1988) (Webb and Gerrard, 1990) (Shimizu and Fujimoto, 1990) (Bernasconi et al., 1991) (Kirsch et al., 1994) (Griffith et al., 1999) (Nakayama et al., 2000) (Düesberg et al., 2001) (Washburn et al., 2003)
<i>IL-1β, -2, -3</i>	(Philip and Epstein, 1986) (Itoh et al., 1987) (Sampson-johannes and Carlino, 1988) (Smith et al., 1990) (Düesberg et al., 2001)
<i>TNF-α</i>	(Philip and Epstein, 1986) (Webb and Gerrard, 1990) (Smith et al., 1990) (Kirsch et al., 1994)
<i>M-CSF/GM-CSF</i>	(Suzu et al., 1989)
<i>PMA</i>	(Weiss et al., 1980)

1.1. Les monocytes sont capables d'exercer une activité antitumorale

Étant donné que les monocytes peuvent aussi bien présenter une activité cytotoxique contre les cellules saines que tumorales, des études ont été réalisées afin de démontrer la spécificité de cette activité sur les cellules néoplasiques. A cet égard, plusieurs chercheurs ont montré que l'activité cytotoxique affectait sensiblement moins les cellules saines que les cellules tumorales (Mantovani et al., 1979; Gerrard et al., 1980). Ces travaux démontrent, par conséquent, que les monocytes sont capables d'exercer une activité antitumorale. En tant que cellules néoplasiques, les cellules tumorales expriment des motifs moléculaires altérés, tels que les nucléotides ou les ligands des TLRs (HMGB-1, *Heat shock proteins*, HSPs), qui sont libérés dans l'environnement tumoral et qui peuvent être reconnus par les monocytes (Myrtek et al., 2008; Midwood and Piccinini, 2010). HMGB-1 est notamment surexprimé dans une grande variété de cancers tels que le cancer du sein, du poumon, du pancréas, du colon, le mélanome et le mésothéliome (Naumnik et al., 2009; Li et al., 2014; Ueda et al., 2014; Sun et al., 2015; Wu et al., 2016). Cette sélectivité indique que les monocytes pourraient exercer un rôle dans l'immunosurveillance et jouer une fonction importante dans le contrôle du développement tumoral.

Dans le cadre de cette thèse, la sélectivité de l'activité antitumorale n'a pas été démontrée. Une perspective consisterait à étudier des cellules mésothéliales normales, telles que la lignée LP9 (Jacobson et al., 2013).

1.2. L'activité cytotoxique augmente avec le ratio (monocytes/cellules tumorales)

Les différentes études démontrent que l'activité antitumorale des monocytes est amplifiée lorsque le nombre de monocytes augmente par rapport au nombre de cellules tumorales. De manière similaire, dans cette thèse, l'activité cytotoxique des monocytes augmente avec le ratio (Mono/M14K), mais ne devient significative qu'à partir d'un ratio 20/1, indiquant l'importance d'un nombre suffisamment élevé de monocytes pour exercer cette activité (**Figure S7**). Plusieurs explications peuvent étayer ces observations. En présence d'un faible nombre de monocytes, la proportion plus élevée de cellules tumorales pourrait inhiber l'activité cytotoxique des cellules effectrices. La sécrétion de facteurs solubles par les cellules tumorales tels que le M-CSF, l'IL-10, l'IL-13, l'IL-34 et le PGE₂ est connue pour induire un phénotype immunosuppresseur chez les monocytes, en les différenciant en M-MDSCs ainsi qu'en TAMs, et bloquant ainsi leur activité antitumorale (Cornelissen, 2015; Lievense et al., 2016; Millrud et al., 2017). De plus, il est également possible qu'après avoir interagi avec les cellules tumorales et exercé leur activité cytotoxique, les monocytes deviennent anergiques. Cet état d'anergie correspond à un mécanisme de tolérance au cours duquel les monocytes deviennent fonctionnellement inactifs, bien qu'étant toujours viables (Williams et al., 1998; Das et al., 2000). L'état d'anergie des monocytes interagissant avec les cellules tumorales a déjà été démontré (Mytar et al., 2003; del Fresno et al., 2005).

1.3. L'influence des sous-populations de monocytes dans l'activité cytotoxique

Il est très tentant d'associer l'activité cytotoxique à une sous-population particulière de monocytes. Cependant, trop peu d'études ont été menées à cet égard pour pouvoir émettre des conclusions. De plus, elles présentent des résultats contradictoires. Parmi ces recherches, Yeap et al. ne semblent pas relever de différence de cytotoxicité entre les trois sous-populations de monocytes, alors que Szaflarska et al. attribuent l'activité cytotoxique à la population CD14⁺CD16⁺ (Szaflarska et al., 2004; Yeap et al., 2016).

1.4. Une stimulation préalable des monocytes augmente l'activité cytotoxique

Bien que les monocytes semblent présenter une activité cytotoxique basale envers les cellules tumorales, cette activité apparaît significativement plus élevée lorsque les monocytes sont préalablement stimulés. Dans les études précitées, plusieurs composés ont été utilisés afin d'étudier leur influence dans l'activité cytotoxique tels que les produits bactériens (LPS, muramyl-dipeptide) et les cytokines (IFN- α , - β , - γ , TNF- α , IL-1, -2, -3). L'activation des monocytes joue, dès lors, un rôle important dans l'activité cytotoxique (Webb and Gerrard, 1990; Duesberg et al., 2001).

1.5. Mécanismes impliqués dans l'activité cytotoxique des monocytes

Bien que l'activité cytotoxique des monocytes ait été démontrée, les mécanismes de cytotoxicité ne sont que partiellement compris. Les monocytes peuvent exercer leur cytotoxicité de manière indirecte et directe (**Table 4**).

Mécanismes indirects

Les monocytes ont la capacité de produire un ensemble de composés cytotoxiques, tels que les cytokines pro-inflammatoires et les substances réactives oxygénées et azotées (RONS) qui pourraient être impliquées dans la mort des cellules tumorales (Cros et al., 2010; Wong et al., 2011; Boyette et al., 2017).

L'interaction des cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ , IL-1 β) à la surface des cellules tumorales peut stimuler leur apoptose par la voie extrinsèque via l'activation de la caspase-8 (Lesinski et al., 2008). Ces cytokines peuvent également induire leur apoptose via la voie intrinsèque. En effet, les cytokines pro-inflammatoires induisent la perméabilisation mitochondriale qui amène à la libération du cytochrome C. Une fois dans le cytoplasme, le cytochrome C interagit avec le *Apoptosis-Protease Activating Factor-1* (APAF-1) qui, en présence d'ATP, active la caspase 9 initiateur. Via un clivage protéolytique, la caspase 9 active la caspase 3 effectrice, qui va finalement induire l'apoptose cellulaire (Grunnet et al., 2009).

Les RONS peuvent altérer l'ADN, les lipides et les protéines des cellules tumorales. L'implication de ces substances dans l'activité cytotoxique des monocytes a pu être démontrée au moyen d'inhibiteurs pharmacologiques dans plusieurs études (**Table 4**). Les RNS altèrent l'ADN par des réactions de nitration, nitrosylation et de désamination des bases (Thanan et al., 2015; Hamaidia et al., 2016). Les ROS, quant à eux, induisent des stress oxydatifs à l'ADN en oxydant notamment la guanine en 8-hydroxyguanine et en 7,8 dihydro-8-guanine. Ces lésions peuvent ultérieurement former des liaisons hydrogènes avec les déoxyadénines et les déoxycytosines qui vont être à l'origine de mutations lors de la réplication de l'ADN (Wiseman and Thurmond, 2012; Hamaidia et al., 2016). Ces réactions vont générer des cassures simple et double brins de l'ADN, des délétions, des substitutions, des réarrangements ainsi que des insertions de bases (Greenblatt et al., 1994; Yang et al., 2008; Thanan et al., 2015). Les RONS altèrent également les lipides notamment via les radicaux libres qui attaquent les acides gras présents dans la bicouche lipidique des membranes cellulaires, affectant leurs fonctions membranaires. De plus, par des réactions de nitration et d'oxydation, les RONS altèrent respectivement la structure des acides gras et du cholestérol, bloquant leurs fonctions biologiques (Prolo et al., 2014; Thanan et al., 2015). Finalement, ces substances réactives induisent des réactions d'oxydation, de nitration et de S-nitrosylation qui affectent la conformation protéique et également leurs fonctions (Thanan et al., 2015).

Mécanismes directs

Lors d'une coculture, les monocytes peuvent induire une activité cytotoxique via des facteurs solubles, mais aussi via un contact direct avec les cellules tumorales. Ce contact, dit « létal », implique l'interaction de récepteurs de mort présents à la surface de cellules tumorales avec leur ligand agoniste exprimé par les monocytes. Les monocytes expriment les ligands TNF- α , Fas L et Trail L (Ziegler-Heitbrock et al., 1986; Cannistra et al., 1988; Bremner et al., 1999; Griffith et al., 1999), alors que les cellules de mésothéliome expriment les récepteurs de mort TNFR, Fas et Trail-R1/2 (Halaas et al., 2000; Daniel et al., 2001; Stewart et al., 2002; Belyanskaya et al., 2007; Pasello et al., 2014; Dabir et al., 2015; Matsumoto et al., 2015). L'implication de ces récepteurs a pu être démontrée dans l'activité cytotoxique des monocytes au moyen d'anticorps bloquants (**Table 4**). La fixation du ligand sur le récepteur induit le recrutement des protéines adaptatrices au niveau du « death domain » (*Fas Associated Death Domain*, FADD, *TNF Receptor Associated Death Domain*, TRADD) associé au récepteur de mort. Leur liaison conduit ensuite au recrutement des procaspases 8 ou 10. Ces caspases, dites initiatrices, vont s'activer en se liant l'une à l'autre, permettant ensuite l'activation des caspases effectrices, telles que la caspase 3, qui initient l'apoptose (Leger, 2006).

Table 4. Mécanismes impliqués dans l'activité cytotoxique des monocytes mis en évidence lors de travaux précédents

Mécanismes	Références mettant en évidence les mécanismes
ROS	(Weiss et al., 1980) (Webb and Gerrard, 1990) (Davies and Edwards, 1992) (Hansson et al., 1995) (Mytar et al., 1999) (Woller et al., 2008) (Yang et al., 2011) (Pommier et al., 2013)
TNF-α	(Philip and Epstein, 1986) (Ziegler-Heitbrock et al., 1986) (Cannistra et al., 1988) (Sampson-johannes and Carlino, 1988) (Suzu et al., 1989) (Smith et al., 1990) (van de Loosdrecht et al., 1993) (Ghibelli et al., 1994) (Dong et al., 1996)
FASL	(Bremner et al., 1999) (Daigneault et al., 2012)
TRAIL	(Griffith et al., 1999) (Washburn et al., 2003)
TWEAK	(Nakayama et al., 2000)

2. La différenciation des monocytes THP-1 en macrophages augmente l'activité cytotoxique

L'activité cytotoxique des macrophages n'a été étudiée qu'à partir de la lignée monocyttaire THP-1. Pour ce faire, les monocytes ont été prétraités en présence de phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) pendant 48 heures (**Figure 22A**). La différenciation des monocytes en macrophages a servi de contrôle positif dans ce travail (Lund et al., 2016).

Les résultats montrent que les monocytes différenciés en macrophages présentent une activité cytotoxique significativement supérieure par rapport aux monocytes THP-1 non différenciés (**Figure 22D-F**).

Le PMA agit en tant qu'activateur de protéines kinases C (PKC). Le mécanisme de différenciation des monocytes THP-1 en macrophages via le PMA n'est pas encore complètement compris. Cependant, des études ont montré que dans un premier temps,

le PMA induisait l'arrêt du cycle cellulaire avant d'initier la différenciation en macrophages. En effet, la stimulation des PKCs par la PMA va être à l'origine de l'activation de la voie de signalisation Raf/MEK/ERK. Cette voie de signalisation amène à l'augmentation de la synthèse de la protéine p21^{WAF1/CIP1}, qui agit en tant qu'inhibiteur de la protéine kinase Cdk2. L'inhibition de Cdk2 empêche la phosphorylation de la protéine rétinoblastome (pRb) qui va pouvoir se lier au facteur de transcription E2F induisant l'arrêt du cycle cellulaire en phase G₁/S (Traore et al., 2005). Parallèlement, le PMA induit également l'accumulation de NF-κB chez les THP-1 pouvant activer ultérieurement l'expression de gènes inflammatoires (Takashiba et al., 1999). En conséquence, le traitement au PMA induit l'adhérence cellulaire, ainsi que l'augmentation de la taille cellulaire et de la granularité (**Figure 22I** ; **Figure S4**) (Takashiba et al., 1999; Lund et al., 2016; Gatto et al., 2017). L'adhérence accrue des macrophages peut notamment expliquer la diminution de la migration cellulaire et de la vitesse moyenne de déplacement cellulaire (**Figure 22K, L**). De plus, le PMA induit l'augmentation de l'expression des récepteurs CD14 (**Figure S5**) et l'externalisation de la phosphatidylsérine (**Figure 22I**) suggérant une activation cellulaire (Callahan et al., 2003; Park et al., 2007; Zeng et al., 2015). Effectivement, les monocytes différenciés en présence de PMA sont caractérisés par une sécrétion plus importante de cytokines pro-inflammatoires tels que le TNF-α, IL-1β, IL-6 et IL-8 pouvant, dès lors, jouer des rôles dans l'activité cytotoxique (Takashiba et al., 1999; Park et al., 2007; Lund et al., 2016; Gatto et al., 2017).

Contrairement aux monocytes, l'activité cytotoxique des macrophages a déjà largement été investiguée (Piessens, 1978; Chapes et al., 1988; Albina et al., 1993; Jadus et al., 1996; Grisham et al., 1999; O'Sullivan et al., 2012; Rahat and Hemmerlein, 2013). Dans le cas du MPM, Hamaidia et al. ont récemment démontré que les macrophages murins pouvaient induire la mort des cellules de mésothéliome par un mécanisme d'oxéiptose, laquelle implique l'enzyme phosphoglycérate mutase (PGAM5) (Hamaidia et al., 2019).

3. L'EPZ n'influence pas l'activité cytotoxique des monocytes THP-1

L'EPZ est un inhibiteur pharmacologique compétitif d'EZH2 réduisant la triméthylation d'H3K27. L'inhibition pharmacologique de EZH2 permet de réduire significativement la prolifération et la migration des cellules de MPM. Grâce à ces propriétés, l'inhibiteur EPZ (EPZ-6438, Tazemostat) est entré dans un essai clinique chez les patients de MPM réfractaires et en rechute, qui présentent une inactivation du gène BAP-1 (Mola et al., 2021). Pour ces raisons, l'influence de l'EPZ a été investiguée dans l'activité cytotoxique des monocytes.

Les résultats montrent que la diminution de la triméthylation de H3K27 (**Figure 22H**) par l'EPZ n'influence pas l'activité cytotoxique des monocytes THP-1 (**Figure 22 D-F**).

Un récente étude a montré que, en plus de jouer un rôle sur les cellules de MPM, l'EPZ était capable d'influencer l'environnement immunitaire du MPM. Dans cette étude, le traitement EPZ augmente le recrutement des monocytes et favorise leur polarisation vers le phénotype protumoral TAMs (Mola et al., 2021). Parallèlement, une seconde étude, au sein de notre laboratoire, a montré que l'EPZ influençait négativement l'activité cytotoxique de macrophages murins RAW 264.7 dans un modèle de MPM, indiquant l'implication d'EZH2 dans cette activité. Dans cette étude, Hamaidia et al. ont montré que le traitement EPZ induisait l'expression de PD-1 à la surface des macrophages et que l'utilisation d'un anticorps bloquant anti-PD-1 permettait de restaurer l'activité cytotoxique (Hamaidia et al., 2019).

Il se pourrait que le traitement EPZ induise également un phénotype M2 ainsi que l'expression de PD-1 dans les monocytes qui les empêcheraient d'exercer leur activité cytotoxique. Cette hypothèse peut être confirmée par une analyse de l'expression des récepteurs membranaires des THP-1 traités à l'EPZ. Dans ce cas, il se pourrait également que, comme pour les RAW 264.7, l'utilisation d'un anticorps bloquant PD-1 restaure l'activité cytotoxique des monocytes. L'étude de la combinaison d'un anti-PD-1 avec le traitement EPZ dans un modèle monocyttaire serait une bonne perspective à ce travail.

4. Le valproate augmente l'activité cytotoxique des monocytes

Le valproate (VPA) est un acide aliphatique principalement connu pour ses propriétés antiépileptiques. L'effet du VPA dans l'induction de l'apoptose des cellules tumorales a déjà été étudié dans plusieurs cancers, dont le MPM. En effet, Vandermeers et al. ont notamment démontré que le VPA, en combinaison au cisplatine et pemetrexed, permettait d'augmenter significativement l'apoptose de plusieurs lignées de MPM via un mécanisme dépendant des caspases qui implique les voies intrinsèque et extrinsèque (Vandermeers, 2008; Vandermeers et al., 2009). Cependant, en plus de son activité apoptotique, le VPA présente également des propriétés immunomodulatrices sur plusieurs cellules immunitaires dont les macrophages (Bensaid et al., 2018). Pour ces raisons, l'effet du VPA a été investigué dans l'activité cytotoxique des monocytes.

Les résultats montrent que le traitement VPA sur les monocytes (THP-1 et monocytes primaires) permet d'augmenter significativement le pourcentage d'apoptose des cellules de MPM (**Figure 22D-F** et **Figure 24C-E**). Bien que le VPA augmente l'activité cytotoxique dans ces deux modèles, son utilisation influence différemment les THP-1 et les monocytes primaires.

L'analyse phénotypique des monocytes THP-1 montre que le VPA augmente la granularité (**Figure S4**), l'expression des récepteurs CD14 et CD11b (**Figure S5**) et induit une externalisation des phosphatidylsérines (**Figure 22I**) à la surface des monocytes, suggérant une activation cellulaire (Callahan et al., 2003). Contrairement

aux monocytes traités en présence de PMA, le traitement au VPA n'affecte pas la mobilité des monocytes THP-1 par rapport aux THP-1 non traités (**Figure 22K, L**).

Le VPA est connu pour induire la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques myéloïdes en lignée monocyttaire (Soria-Castro et al., 2019). Il existe différentes lignées de cellules myéloïdes qui sont identifiées selon le système de classification FAB en fonction de leur stade de différenciation (FAB M0 à FAB M7). Ces lignées sont caractérisées par des dérégulations d'acétylation des histones qui bloquent notamment leur niveau de différenciation cellulaire (Barbetti et al., 2013). C'est pourquoi, dans les cellules Kasumi-1 (FAB M2), le traitement du VPA induit l'expression des récepteurs CD14, CD11b, CD11c et CD15 et des facteurs de transcription PU.1 et C/EBP α , impliqués dans la différenciation de la lignée myéloïde. De manière similaire, le VPA induit également l'expression de CD14, p21 et de p27^{Kip1} dans les HL60 (FAB M2) (Heo et al., 2014). Dans la lignée U937 (FAB M5), qui présente un stade de différenciation similaire du THP-1, le VPA induit la différenciation cellulaire via une augmentation de l'acétylation des histones H3 et H4 et une augmentation de l'expression de p21 qui conduit à l'induction des gènes codant pour CD11a, CD11b, CD11c, CD13, CD18 et CD64 (Gurvich et al., 2004). Bien que le VPA soit connu pour induire la différenciation des cellules myéloïdes, son effet sur les THP-1 semble toutefois différent de celui du traitement au PMA. Effectivement, contrairement au traitement PMA, les THP-1 traités en présence de VPA n'adhèrent pas et ne présentent pas d'augmentation du volume cellulaire ni de variation en terme de mobilité. En revanche, l'augmentation de la granularité cellulaire et de l'externalisation de la phosphatidylsérine suggèrent que le VPA induit une activation cellulaire plutôt qu'une différenciation en macrophage.

Chez les monocytes primaires, le VPA n'impacte pas l'expression des récepteurs CD14, CD11b et CD16 (**Figure S8**). De plus, l'analyse transcriptomique montre que le VPA sous-régule significativement l'expression des récepteurs CD163, CD206, CD209 associés à la polarisation M2. Finalement, le VPA diminue l'adhésion des monocytes et augmente leur mobilité (**Figure 25F**).

L'implication du VPA dans la polarisation des monocytes a déjà été investiguée au cours des dernières années. Cependant, la majorité des études démontre que les HDACi, dont le VPA, induit la polarisation des macrophages vers un phénotype M2 (Bode et al., 2007; Serrat et al., 2014; Wang et al., 2015; Chen et al., 2018; Kimbrough et al., 2018; Cui et al., 2019; Luque-Martin et al., 2019). Très peu d'études montrent l'opposé (Kim et al., 2020; Cai et al., 2021; Li et al., 2021). Dans le premier cas, Chen et al. corrélaient le traitement du VPA à la polarisation des microglies vers un phénotype M2 dans un modèle de lésion médullaire. Dans cette étude, ils démontrent que la polarisation M2 dépend de l'inhibition de l'activité HDAC3 et de l'induction de STAT1 (Chen et al., 2018). Parallèlement, le VPA sous-exprime les récepteurs CD40 et CD80, ainsi que l'IL-12 et le TNF- α , alors qu'il active l'expression de l'IL-10 dans les macrophages murins issus de la moelle osseuse (Wu et al., 2012). A l'inverse, dans un modèle de cancer du sein, le traitement du VPA favorise l'infiltration de macrophages au sein de la tumeur qui présentent une surrégulation des marqueurs M1 (CD86, MHC-II, IL-12,

IL-6, IFN- γ , TNF- α) sans changer le niveau d'expression des marqueurs M2 (CD209, CD163, IL-10) (Cai et al., 2021). Ces effets contradictoires soulignent la complexité de l'utilisation du VPA en tant qu'immunomodulateur.

Dans ce contexte, une étude a pu mettre en évidence cette complexité en comparant l'effet du VPA sur la polarisation des macrophages lorsqu'ils sont cultivés dans un environnement de croissance tumorale par rapport à un milieu de culture standard. Les résultats ont montré que le VPA polarisait les macrophages RAW 264.7 vers un phénotype M2 (diminution de IL-12, IFN- γ , TNF- α et augmentation de IL-10) dans un milieu de culture standard alors que, dans un environnement de croissance tumorale, le VPA favorise une polarisation vers un phénotype M1 (augmentation de CD86, IL-12, IFN- γ , TNF- α et diminution de CD209 et de IL-10) (Cai et al., 2021). L'environnement tumoral semble par conséquent impacter l'effet du VPA sur le phénotype des cellules immunitaires. Effectivement, il apparaît que la majorité des études démontrant que les HDACi ou le VPA induisent la polarisation M2 ait été effectuées dans des conditions non tumorales (Bode et al., 2007; Serrat et al., 2014; Wang et al., 2015; Chen et al., 2018; Kimbrough et al., 2018; Cui et al., 2019; Luque-Martin et al., 2019), alors que les autres études ont été réalisées dans un modèle tumoral (Kim et al., 2020; Cai et al., 2021; Li et al., 2021). Il est important de souligner que dans le cadre de cette thèse, l'effet du VPA (activité cytotoxique, analyse transcriptomique) a également été étudié dans un environnement de croissance tumorale.

En outre, cette variabilité dans la polarisation peut également s'illustrer avec la notion de phénotype M3 chez les macrophages (Kalish et al., 2017). Au-delà des phénotypes M1 et M2, bien connus chez les macrophages, de nouvelles données semblent démontrer l'existence d'un nouveau phénotype appelé « M3 » (Malyshev and Malyshev, 2015). Ce phénotype M3 correspond à un basculement phénotypique incluant deux phénotypes : M1/2 et M2/1. Le phénotype M1/2 est caractérisé par des marqueurs M2 alors qu'il a été stimulé/observé dans des conditions pro-inflammatoires M1. A l'inverse, le phénotype M2/1 présente des marqueurs M1 alors qu'il a été stimulé/observé dans des conditions anti-inflammatoires M2. Bien que fort complexe, ce phénotype M3 n'a été, à ce jour, qu'observé et non expliqué. Ce phénomène de switching a été proposé afin d'expliquer des cas de polarisation non conventionnelles dans certaines maladies, dont les cancers. De fait, il semblerait que l'état des patients biaise vraisemblablement le mécanisme de polarisation des macrophages (Malyshev and Malyshev, 2015). L'environnement tumoral pourrait, dès lors, être un facteur induisant le phénotype M3 qui justifierait la disparité des résultats associée à l'effet du traitement du VPA dans la polarisation des macrophages. Dans ce contexte, il paraît illusoire d'étudier l'effet du VPA sur la polarisation des macrophages dans des conditions standards qui ne représentent pas l'environnement du MPM. Bien que l'environnement de croissance tumorale puisse potentiellement impacter le phénotype des monocytes en présence de VPA, l'utilisation de ce milieu ne représente qu'imparfaitement ce qui se produit chez les monocytes de patients atteints de MPM. Il paraît, dès lors, incontournable d'étudier ultérieurement cet effet sur les monocytes issus de sang de patients atteints de MPM ou dans un modèle murin MPM.

Afin de jouer un rôle dans cette activation/polarisation/activité cytotoxique, l'hypothèse privilégiée serait que le VPA affecte les monocytes par des modulations épigénétiques. En tant qu'inhibiteur de classe I et II, le VPA induit l'acétylation des histones (**Figure 22G**), et par conséquent l'expression des gènes (**Figure 25C, D**) qui pourrait notamment induire l'expression de gènes cytotoxiques (Noguchi et al., 2015; Felisbino et al., 2021). Étonnement, l'analyse transcriptomique ne révèle pas de mécanisme qui suggérerait l'influence du VPA dans l'augmentation de l'activité cytotoxique des monocytes. Dans ces circonstances, il se pourrait que cette activité cytotoxique accrue ne soit exercée que par une faible proportion de monocytes. Des technologies basées sur une détection en micro-fluidique suivie d'un séquençage *single cell*, permettraient, d'une part, d'identifier les cellules d'intérêt, et d'autre part, de caractériser le phénotype associé à leur fonction cytotoxique (Van Lent et al., 2021). Les mécanismes cytotoxiques potentiellement impliqués seraient les cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-12, TNF- α), les RONS ainsi que les ligands associés aux récepteurs de mort (TRAIL, FASL, TNF, TWEAK) (**Table 4**).

Bien que l'analyse transcriptomique n'ait pas pu révéler de mécanisme cytotoxique, elle a pu mettre en évidence les fonctions moléculaires les plus affectées par le traitement au VPA. En effet, parmi ces fonctions moléculaires, celle associée à la liaison (Binding, GO:0005488) semble la plus significativement impactée par le VPA (**Figure 25E**). L'analyse en imagerie Incucyte a effectivement permis d'observer que les monocytes interagissent davantage avec les cellules de MPM. Ces interactions accrues ont été quantifiées sur base de l'aire des clusters formés entre les monocytes et des cellules M14K (**Figure 24K, L**). L'interaction semble, dès lors, jouer un rôle important et suggère l'implication des mécanismes cytotoxiques directs dans la réponse antitumorale des monocytes (Daniel et al., 2001).

Au-delà de son rôle de modulateur épigénétique, le VPA joue également un rôle dans l'induction d'acide γ -aminobutyrique (GABA), ainsi que l'expression et l'activation de leur récepteur agoniste dans les macrophages RAW-blue (Sugiura et al., 2011). Ce mécanisme paracrine induit la sécrétion du HMGB1 qui, en se liant sur le récepteur TLR4 des macrophages RAW-blue, peut induire l'expression de NF- κ B, provoquant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. De plus, HMGB1 est également exprimé par les cellules de MPM pouvant également favoriser ce mécanisme (Tabata et al., 2013). L'effet du VPA dans l'induction de GABA peut également expliquer l'activation des monocytes, ainsi que l'augmentation de leur activité cytotoxique (Sugiura et al., 2011). Une quantification de HMGB1 dans le milieu de coculture permettrait de confirmer ces hypothèses.

Finalement, les résultats obtenus dans ce travail suggèrent que l'effet immunomodulateur du VPA pourrait être exploité dans la thérapie du MPM.

Néanmoins, il est important de souligner qu'en plus de son effet sur les monocytes, le VPA peut également agir sur d'autres composants du stroma. A cet égard, deux études ont déjà mis en évidence de telles observations. Leclercq et al. ont montré que la combinaison de drogues épigénétiques (VPA et SAHA en combinaison avec un inhibiteur d'ADN méthyltransférase) conduisait à l'induction d'antigènes chez les

cellules de mésothéliome, facilitant de ce fait leur reconnaissance et leur lyse par les lymphocytes T cytotoxiques (Leclercq et al., 2011). Parallèlement, Guillot et al. ont montré un effet similaire d'induction combinée de cytotoxicité et de réponse immunitaire contre les cellules du mésothéliome par le SAHA (Guillot et al., 2011).

De plus, il semble que la combinaison de plusieurs drogues épigénétiques soit requise pour un traitement efficace, probablement dû à l'aspect multi-composants du stroma. A titre d'exemple, une étude a montré l'inefficacité du SAHA seul lors d'un essai clinique de phase III pour le traitement du mésothéliome (Krug et al., 2015).

D'un autre côté, un traitement combiné VPA et doxorubicine a montré des résultats prometteurs dans une étude clinique de phase II sur les patients majoritairement réfractaires au traitement chimiothérapeutique standard (Scherpereel et al., 2011). Il se pourrait, qu'en plus de jouer un rôle direct sur les cellules de mésothéliome, le VPA agisse également sur la polarisation des monocytes ainsi que sur leur capacité d'induire une activité cytotoxique. Afin de confirmer ces hypothèses, il serait intéressant de déterminer si, d'une part, la polarisation des monocytes isolés de sang de patients ayant reçu le traitement VPA + doxorubicine est impactée et, d'autre part, d'étudier si ces monocytes sont capables d'exercer une activité cytotoxique supérieure à ceux issus de patients non traités. L'analyse phénotypique des échantillons de biopsie de patients ayant reçu le traitement pourrait également être envisagée. En outre, la combinaison du VPA au traitement immunothérapeutique (nivolumab + ipilimumab) pourrait améliorer la thérapie du MPM.

5. Conclusion

En conclusion, cette thèse a permis de démontrer que les monocytes sont capables d'exercer une activité cytotoxique directe envers les cellules de MPM et que le VPA module positivement cette activité. Via ses propriétés immunomodulatrices, le traitement des monocytes au VPA pourrait, dès lors, être exploité comme nouvelle approche en vue d'améliorer la thérapie du MPM.

Liste des publications scientifiques

1. Dans un journal

En co-premier auteur :

Gazon Hélène[†], Chauhan Pradeep[†], Hamaidia Malik[†], Hoyos Clotilde[†], Li Lin[†], Safari Roghaiyeh[†] and Willems Luc[†] (2018). How does HTLV-1 undergo oncogene-dependent replication despite a strong immune response? *Front. Microbiol.* 8, 1–6. doi:10.3389/fmicb.2017.02684.

Abdala Alejandro[†], Alvarez Irene[†], Brossel Hélène[†], Calvino Luis[†], Carignano Hugo[†], Franco Lautaro[†], Gazon Hélène[†], Gillissen Christelle[†], Hamaidia Malik[†], Hoyos Clotilde[†], Jacques Jean-Rock[†], Joris Thomas[†], Laval Florent[†], Petersen Marcos[†], Porquet Florent[†], Porta Natalia[†], Ruiz Vanesa[†], Safari Roghaiyeh[†], Suárez Archilla Guillermo[†], Trono Karina[†] and Willems Luc[†] (2019). BLV: lessons on vaccine development Alejandro. *Retrovirology* 16, 1–6. doi:10.1186/s12977-019-0488-8.

Brossel Hélène[†], Fontaine Alexis[†], Hoyos Clotilde[†], Jamakhani Majeed[†], Willems Mégane[†], Hamaidia Malik and Willems Luc. (2021). Activation of DNA Damage Tolerance Pathways May Improve Immunotherapy of Mesothelioma. *Cancers (Basel)*. 13, 3211–3223. doi:10.3390/cancers13133211.

Hoyos, C. [†], Fontaine, A. [†], Jacques, J., Heinen, V., Louis, R., Duysinx, B., et al. (2022). HDAC Inhibition with Valproate Improves Direct Cytotoxicity of Monocytes against Mesothelioma Tumor Cells. *Cancers (Basel)*. 14, 1–20. doi:10.3390/cancers14092164.

En troisième auteur :

Hamaidia Malik[†], Gazon Hélène, Hoyos Clotilde, Hoffmann Gabriella Brunsting, Louis Renaud, Duysinx Bernard and Willems Luc (2019). Inhibition of EZH2 methyltransferase decreases immunoeediting of mesothelioma cells by autologous macrophages through a PD-1 – dependent mechanism. *JCI insight* 4, 1–17. doi:https://doi.org/10.1172/jci.insight.128474.

2. Communications

Séminaire de l'EDT-Immunologie, Liège, Belgique (2018) Poster. « Immunoeediting activity of macrophages against mesothelioma cells »

2^e des Journées Francophones du Mésothéliome, Nantes, France (2019) Présentation orale. « L'inhibition de PD-1 augmente l'activité cytotoxique des macrophages envers les cellules de mésothéliome pleural malin »

2^e des Journées Francophones du Mésothéliome, Nantes, France (2019) Poster. « L'activité cytotoxique directe des monocytes dépendante d'EZH2 et de JMJD3 »

Séminaire du Giga Cancer, Liège, Belgique (2021) Présentation Orale. «The contribution of hdac inhibition in therapy of malignant pleural mesothelioma »

Giga Cancer Day, Liège, Belgique (2021) Présentation orale. « Contribution of lysine deacetylases to the therapy of malignant pleural mesothelioma»

Giga Cancer Day, Liège, Belgique (2021) Poster. « Contribution of lysine deacetylases to the therapy of malignant pleural mesothelioma»

5

Bibliographie

- Aharinejad, S., Paulus, P., Sioud, M., Hofmann, M., Zins, K., Schäfer, R., et al. (2004). Colony-stimulating factor-1 blockade by antisense oligonucleotides and small interfering RNAs suppresses growth of human mammary tumor xenografts in mice. *Cancer Res.* 64, 5378–5384. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0961.
- Albina, J. E., Cui, S., Mateo, R. B., and Reichner, J. S. (1993). Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 150, 5080–5085.
- Alpert, N., van Gerwen, M., and Taioli, E. (2020). Epidemiology of mesothelioma in the 21st century in Europe and the United States, 40 years after restricted/banned asbestos use. *Transl. Lung Cancer Res.* 9, S28–S38. doi:10.21037/tlcr.2019.11.11.
- Álvarez-Errico, D., Vento-Tormo, R., Sieweke, M., and Ballestar, E. (2015). Epigenetic control of myeloid cell differentiation, identity and function. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 7–17. doi:10.1038/nri3777.
- Anderson, A. C., Joller, N., and Kuchroo, V. K. (2016). Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation. *Immunity* 44, 989–1004. doi:10.1016/j.immuni.2016.05.001.Lag-3.
- Atri, C., Guerfali, F. Z., and Laouini, D. (2018). Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 1–15. doi:10.3390/ijms19061801.
- Attanoos, R. L., Churg, A., Galateau-Salle, F., Gibbs, A. R., and Roggli, V. L. (2018). Malignant Mesothelioma and Its Non-Asbestos Causes. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 142, 753–760. doi:10.5858/arpa.2017-0365-RA.
- Attanoos, R. L., and Gibbs, A. R. (1997). Pathology of malignant mesothelioma. *Histopathology* 30, 403–418.
- Autin, P., Blanquart, C., and Fradin, D. (2019). Epigenetic drugs for cancer and microRNAs: A focus on histone deacetylase inhibitors. *Cancers (Basel)*. 11, 1–22. doi:10.3390/cancers11101530.
- Baas, P., Scherpereel, A., Nowak, A. K., Fujimoto, N., Peters, S., Tsao, A. S., et al. (2021). First-line nivolumab plus ipilimumab in unresectable malignant pleural mesothelioma (CheckMate 743): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 397, 375–386. doi:10.1016/S0140-6736(20)32714-8.
- Baba, T., and Mukaida, N. (2014). Role of macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α /CCL3 in leukemogenesis. *Mol. Cell. Oncol.* 1, 1–5. doi:10.4161/mco.29899.
- Badhai, J., Pandey, G. K., Song, J., Krijgsman, O., Bhaskaran, R., Chandrasekaran, G., et al. (2020). Combined deletion of Bap1, Nf2, and Cdkn2ab causes rapid onset of malignant mesothelioma in mice. *J. Exp. Med.* 217, 1–12.
- Banik, D., Moufarrij, S., and Villagra, A. (2019). Immunoepigenetics Combination Therapies: An Overview of the Role of HDACs in Cancer Immunotherapy. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 2–29. doi:10.3390/ijms20092241.
- Barbetti, V., Gozzini, A., Cheloni, G., Marzi, I., Fabiani, E., Santini, V., et al. (2013). Time- and residue-specific differences in histone acetylation induced by VPA and SAHA in AML1/ETO-positive leukemia cells. *Epigenetics* 8, 210–219. doi:10.4161/epi.23538.
- Barna, B. P., James, K., and Deodhar, S. D. (1987). Activation of Human Monocyte Tumoricidal Activity by C-reactive Protein. *Cancer Res.* 47, 3959–3963.

- Barna, B. P., Rogers, L. R., Thomassen, M. J., Barnett, G. H., and Estes, Melinda, L. (1991). Monocyte tumoricidal activity and tumor necrosis factor production in patients with malignant brain tumors. *Cancer Immunol. Immunother.* 33, 314–318.
- Belge, K.-U., Dayyani, F., Horelt, A., Siedlar, M., Frankenberger, M., Frankenberger, B., et al. (2002). The Proinflammatory CD14 + CD16 + DR ++ Monocytes Are a Major Source of TNF. *J. Immunol.* 168, 3536–3542. doi:10.4049/jimmunol.168.7.3536.
- Belyanskaya, L. L., Marti, T. M., Hopkins-Donaldson, S., Kurtz, S., Felley-Bosco, E., and Stahel, R. A. (2007). Human agonistic TRAIL receptor antibodies Mapatumumab and Lexatumumab induce apoptosis in malignant mesothelioma and act synergistically with cisplatin. *Mol. Cancer* 6, 1–13. doi:10.1186/1476-4598-6-66.
- Bensaid, D., Blondy, T., Deshayes, S., Dehame, V., Bertrand, P., Grégoire, M., et al. (2018). Assessment of new HDAC inhibitors for immunotherapy of malignant pleural mesothelioma. *Clin. Epigenetics* 10, 1–11. doi:10.1186/s13148-018-0517-9.
- Bernasconi, S., Peri, G., Sironi, M., and Mantovani, A. (1991). INVOLVEMENT OF LEUKOCYTE (β 2) INTEGRINS (CD18/CD11) IN HUMAN MONOCYTE TUMORICIDAL ACTIVITY. *Int. J. Cancer* 49, 267–273.
- Bibby, A. C., Tsim, S., Kanellakis, N., Ball, H., Talbot, D. C., Blyth, K. G., et al. (2016). Malignant pleural mesothelioma: An update on investigation, diagnosis and treatment. *Eur. Respir. Rev.* 25, 472–486. doi:10.1183/16000617.0063-2016.
- Bignold, L. P. (2015). “Etiopathogenesis of tumors,” in *Principles of Tumors*, ed. A. Press, 47–86. doi:10.1016/b978-0-12-816920-9.00003-1.
- Blondy, T., D’Almeida, S. M., Briolay, T., Tabiasco, J., Meiller, C., Chéné, A. L., et al. (2020). Involvement of the M-CSF/IL-34/CSF-1R pathway in malignant pleural mesothelioma. *J. Immunother. cancer* 8, 1–10. doi:10.1136/jitc-2019-000182.
- Bode, K. A., and Dalpke, A. H. (2011). HDAC inhibitors block innate immunity. *Blood* 117, 1102–1103. doi:10.1182/blood-2010-11-315820.
- Bode, K. A., Schroder, K., Hume, D. A., Ravasi, T., Heeg, K., Sweet, M. J., et al. (2007). Histone deacetylase inhibitors decrease Toll-like receptor-mediated activation of proinflammatory gene expression by impairing transcription factor recruitment. *Immunology* 122, 596–606. doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02678.x.
- Bonelli, M. A., Fumarola, C., Monica, S. La, and Alfieri, R. (2017). New therapeutic strategies for malignant pleural mesothelioma. *Biochem. Pharmacol.* 123, 8–18. doi:10.1016/j.bcp.2016.07.012.
- Boudadi, E., Stower, H., Halsall, J. A., Rutledge, C. E., Leeb, M., Wutz, A., et al. (2013). The histone deacetylase inhibitor sodium valproate causes limited transcriptional change in mouse embryonic stem cells but selectively overrides Polycomb-mediated Hoxb silencing. *Epigenetics and Chromatin* 6, 1–16. doi:10.1186/1756-8935-6-11.
- Boyette, L. B., Macedo, C., Hadi, K., Elinoff, B. D., Walters, J. T., Ramaswami, B., et al. (2017). Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets. *PLoS One* 12, 1–20. doi:10.1371/journal.pone.0176460.

- Brcic, L., and Kern, I. (2020). Clinical significance of histologic subtyping of malignant pleural mesothelioma. *Transl. Lung Cancer Res.* 9, 924–933. doi:10.21037/tlcr.2020.03.38.
- Bremner, T. A., Chatterjee, D., Han, Z., Tsan, M. F., and Wyche, J. H. (1999). THP-1 monocytic leukemia cells express Fas ligand constitutively and kill Fas-positive Jurkat cells. *Leuk. Res.* 23, 865–870. doi:10.1016/S0145-2126(99)00101-0.
- Brossel, H., Fontaine, A., Hoyos, C., Jamakhani, M., Willems, M., Hamaidia, M., et al. (2021). Activation of DNA Damage Tolerance Pathways May Improve Immunotherapy of Mesothelioma. *Cancers (Basel)*. 13, 3211–3223. doi:10.3390/cancers13133211.
- Bueno, R., Stawiski, E. W., Goldstein, L. D., Durinck, S., De Rienzo, A., Modrusan, Z., et al. (2016). Comprehensive genomic analysis of malignant pleural mesothelioma identifies recurrent mutations, gene fusions and splicing alterations. *Nat. Genet.* 48, 407–416. doi:10.1038/ng.3520.
- Burt, B. M., Rodig, S. J., Tilleman, T. R., Elbardissi, A. W., Bueno, R., and Sugarbaker, D. J. (2011). Circulating and Tumor-Infiltrating Myeloid Cells Predict Survival in Human Pleural Mesothelioma. *Cancer* 117, 5234–5244. doi:10.1002/cncr.26143.
- Cai, Z., Lim, D., Liu, G., Chen, C., Jin, L., Duan, W., et al. (2021). Valproic Acid-Like Compounds Enhance and Prolong the Radiotherapy Effect on Breast Cancer by Activating and Maintaining Anti-Tumor Immune Function. *Front. Immunol.* 12, 1–16. doi:10.3389/fimmu.2021.646384.
- Calabrò, L., Rossi, G., and Maio, M. (2018). New horizons from immunotherapy in malignant pleural mesothelioma. *J. Thorac. Dis.* 10, S322–S332. doi:10.21037/jtd.2017.12.88.
- Callahan, M. K., Halleck, M. S., Krahling, S., Henderson, A. J., Williamson, P., and Schlegel, R. A. (2003). Phosphatidylserine expression and phagocytosis of apoptotic thymocytes during differentiation of monocytic cells. *J. Leukoc. Biol.* 74, 846–856. doi:10.1189/jlb.0902433.
- Canè, S., Ugel, S., Trovato, R., Marigo, I., De Sanctis, F., Sartoris, S., et al. (2019). The endless saga of monocyte diversity. *Front. Immunol.* 10, 1–18. doi:10.3389/fimmu.2019.01786.
- Cannistra, S. A., Vellenga, E., Groshek, P., Rambaldu, A., and Griffin, J. D. (1988). Human Granulocyte-Monocyte Colony-Stimulating Factor and Interleukin 3 Stimulate Cytotoxicity Through a Tumor Necrosis Factor Dependent Mechanism. *Blood* 71, 672–676.
- Cantini, L., Belderbos, R., Gooijer, C., Dumoulin, D., Cornelissen, R., Baart, S., et al. (2020). Nivolumab in pre-treated malignant pleural mesothelioma: real-world data from the Dutch expanded access program. *Transl. Lung Cancer Res.* 9, 1169–1179. doi:10.21037/tlcr-19-686.
- Carbone, M., Gazdar, A., and Butel, J. S. (2020). SV40 and human mesothelioma. *Transl. Lung Cancer Res.* 9, S47–S59. doi:10.21037/tlcr.2020.02.03.
- Carbone, M., Ly, B. H., Dodson, R. F., Pagano, I., Morris, P. T., Dogan, U. A., et al. (2012). Malignant Mesothelioma: Facts, Myths and hypotheses. *J. Cell Physiol.* 227, 44–58. doi:10.1002/jcp.22724.Malignant.

- Carbone, M., and Yang, H. (2012). Molecular Pathways : Targeting Mechanisms of Asbestos and Erionite Carcinogenesis in Mesothelioma. *Clin. Cancer Res.* 18, 598–604. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-2259.
- Cavone, D., Caputi, A., De Maria, L., Cannone, E. S. S., Mansi, F., Birtolo, F., et al. (2019). Epidemiology of mesothelioma. *Environ. - MDPI* 6, 1–18. doi:10.3390/environments6070076.
- Ceresoli, G. L., Bombardieri, E., and D’Incalci, M. (2019). *Mesothelioma : From research to clinical practice*. Springer. , eds. G. L. Ceresoli, E. Bombardieri, and M. D’Incalci.
- Ceresoli, G. L., Zucali, P. A., Favaretto, A. G., Grossi, F., Bidoli, P., Del Conte, G., et al. (2006). Phase II study of pemetrexed plus carboplatin in malignant pleural mesothelioma. *J. Clin. Oncol.* 24, 1443–1448. doi:10.1200/JCO.2005.04.3190.
- Cersosimo, F., Barbarino, M., Lonardi, S., Vermi, W., Giordano, A., Bellan, C., et al. (2021). Mesothelioma Malignancy and the Microenvironment: Molecular Mechanisms. *Cancers (Basel)*. 13, 1–20. doi:10.3390/cancers13225664.
- Chancellor, A., Gadola, S. D., and Mansour, S. (2018). The versatility of the CD1 lipid antigen presentation pathway. *Immunology* 154, 196–203. doi:10.1111/imm.12912.
- Chanput, W., Peters, V., and Wichers, H. (2015). “Chapter 14 : THP-1 and U937 Cells,” in *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models* (Springer), 1–327. doi:10.1007/978-3-319-16104-4.
- Chapes, S. K., Duffin, D., and Paulsen, A. Q. (1988). Characterization of macrophage recognition and killing of SV40-transformed tumor cells that are " resistant " or " susceptible " to contact-mediated killing. *J. Immunol.* 140, 589–596.
- Chateauvieux, S., Eifes, S., Morceau, F., Grigorakaki, C., Schnekenburger, M., Henry, E., et al. (2011). Valproic acid perturbs hematopoietic homeostasis by inhibition of erythroid differentiation and activation of the myelo-monocytic pathway. *Biochem. Pharmacol.* 81, 498–509. doi:10.1016/j.bcp.2010.11.011.
- Chauvergne, J., and Hoerni, B. (2001). *Chimiothérapie anticancéreuse*. 4e édition. Elsevier / Masson.
- Chee, S. J., Lopez, M., Mellows, T., Gankande, S., Moutasim, K. A., Harris, S., et al. (2017). Evaluating the effect of immune cells on the outcome of patients with mesothelioma. *Br. J. Cancer* 117, 1341–1348. doi:10.1038/bjc.2017.269.
- Chen, S., Yang, J., Wei, Y., and Wei, X. (2020). Epigenetic regulation of macrophages: from homeostasis maintenance to host defense. *Cell. Mol. Immunol.* 17, 36–49. doi:10.1038/s41423-019-0315-0.
- Chen, S., Ye, J., Chen, X., Shi, J., Wu, W., Lin, W., et al. (2018). Valproic acid attenuates traumatic spinal cord injury-induced inflammation via STAT1 and NF-KB pathway dependent of HDAC3. *J. Neuroinflammation* 15, 1–14. doi:10.1186/s12974-018-1193-6.
- Chen, Y., Song, Y., Du, W., Gong, L., Chang, H., and Zou, Z. (2019). Tumor-associated macrophages: An accomplice in solid tumor progression. *J. Biomed. Sci.* 26, 1–13. doi:10.1186/s12929-019-0568-z.
- Chéné, A.-L., Almeida, S., Blondy, T., Tabiasco, J., Deshayes, S., Fonteneau, J.-F., et

- al. (2016). Pleural Effusions from Patients with Mesothelioma Induce Recruitment of Monocytes and Their Differentiation into M2 Macrophages. *J. Thorac. Oncol.* 11, 1765–1773. doi:10.1016/j.jtho.2016.06.022.
- Cheung, M., Menges, C. W., and Testa, J. R. (2017). “Germline and Somatic Mutations in Human Mesothelioma and Lessons from Asbestos-Exposed Genetically Engineered Mouse Models,” in *Asbestos and Mesothelioma* (Springer), 175–195. doi:10.1007/978-3-319-53560-9_8.
- Chew, S. H., and Toyokuni, S. (2015). Malignant mesothelioma as an oxidative stress-induced cancer: An update. *Free Radic. Biol. Med.* 86, 166–178. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.002.
- Chu, G. J., Zandwijk, N. Van, and Rasko, J. E. J. (2019). The Immune Microenvironment in Mesothelioma: Mechanisms of Resistance to Immunotherapy. *Front. Oncol.* 9, 1–12. doi:10.3389/fonc.2019.01366.
- Cicala, C., Pompetti, F., and Carbone, M. (1993). SV40 Induces Mesotheliomas in Hamsters. *Am. J. Pathol.* 142, 1524–1533.
- Cornelissen, R. (2015). The Tumor and its Microenvironment in Mesothelioma. The Good, the bad and the ugly.
- Cros, J., Cagnard, N., Woollard, K., Patey, N., Zhang, S. Y., Senechal, B., et al. (2010). Human CD14^{dim} Monocytes Patrol and Sense Nucleic Acids and Viruses via TLR7 and TLR8 Receptors. *Immunity* 33, 375–386. doi:10.1016/j.immuni.2010.08.012.
- Cui, S. N., Chen, Z. Y., Yang, X. B., Chen, L., Yang, Y. Y., Pan, S. W., et al. (2019). Trichostatin A modulates the macrophage phenotype by enhancing autophagy to reduce inflammation during polymicrobial sepsis. *Int. Immunopharmacol.* 77, 1–9. doi:10.1016/j.intimp.2019.105973.
- Dabir, S., Kresak, A., Yang, M., Fu, P., Wildey, G., and Dowlati, A. (2015). CD30 is a potential therapeutic target in malignant mesothelioma. *Mol. Cancer Ther.* 14, 740–746. doi:10.1158/1535-7163.MCT-14-0972.CD30.
- Daigneault, M., de Silva, T. I., Bewley, M. A., Preston, J. A., Marriott, H. M., Mitchell, A. M., et al. (2012). Monocytes regulate the mechanism of T-cell death by inducing Fas-mediated apoptosis during bacterial infection. *PLoS Pathog.* 8, 1–16. doi:10.1371/journal.ppat.1002814.
- Dammeijer, F., Lievense, L. A., Kaijen-Lambers, M. E., Van Nimwegen, M., Bezemer, K., Hegmans, J. P., et al. (2017). Depletion of Tumor-Associated Macrophages with a CSF-1R Kinase Inhibitor Enhances Antitumor Immunity and Survival Induced by DC Immunotherapy. *Cancer Immunol. Res.* 5, 535–546. doi:10.1158/2326-6066.CIR-16-0309.
- Daniel, P. T., Wieder, T., Sturm, I., and Schulze-Osthoff, K. (2001). The kiss of death : promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. *Leukemia* 15, 1022–1032.
- Das Gupta, K., Shakespear, M. R., Iyer, A., Fairlie, D. P., and Sweet, M. J. (2016). Histone deacetylases in monocyte/macrophage development, activation and metabolism: refining HDAC targets for inflammatory and infectious diseases. *Clin. Transl. Immunol.* 5, 1–10. doi:10.1038/cti.2015.46.

- Das, S., Varalakshmi, C., and Khar, A. (2000). Target-cell-induced anergy in natural killer cells: Suppression of cytotoxic function. *Cancer Immunol. Immunother.* 49, 109–115. doi:10.1007/s002620050609.
- Davies, B., and Edwards, S. W. (1992). Interactions between human monocytes and tumour cells. Monocytes can either enhance or inhibit the growth and survival of k562 cells. *Br. J. Cancer* 66, 463–469. doi:10.1038/bjc.1992.296.
- de Groot, A. E., and Pienta, K. J. (2018). Epigenetic control of macrophage polarization: Implications for targeting tumor-associated macrophages. *Oncotarget* 9, 20908–20927. doi:10.18632/oncotarget.24556.
- De Palma, M., Venneri, M. A., Galli, R., Sergi, L. S., Politi, L. S., Sampaolesi, M., et al. (2005). Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell* 8, 211–226. doi:10.1016/j.ccr.2005.08.002.
- De Santa, F., Narang, V., Yap, Z. H., Tusi, B. K., Burgold, T., Austenaa, L., et al. (2009). Jmjd3 contributes to the control of gene expression in LPS-activated macrophages. *EMBO J.* 28, 3341–3352. doi:10.1038/emboj.2009.271.
- De Santa, F., Totaro, M. G., Prosperini, E., Notarbartolo, S., Testa, G., and Natoli, G. (2007). The Histone H3 Lysine-27 Demethylase Jmjd3 Links Inflammation to Inhibition of Polycomb-Mediated Gene Silencing. *Cell* 130, 1083–1094. doi:10.1016/j.cell.2007.08.019.
- del Fresno, C., Otero, K., Gómez-García, L., González-León, M. C., Soler-Ranger, L., Fuentes-Prior, P., et al. (2005). Tumor Cells Deactivate Human Monocytes by Up-Regulating IL-1 Receptor Associated Kinase-M Expression via CD44 and TLR4. *J. Immunol.* 174, 3032–3040. doi:10.4049/jimmunol.174.5.3032.
- Dijkgraaf, E. M., Heusinkveld, M., Tummers, B., Vogelpoel, L. T. C., Goedemans, R., Jha, V., et al. (2013). Chemotherapy alters monocyte differentiation to favor generation of cancer-supporting m2 macrophages in the tumor microenvironment. *Cancer Res.* 73, 2480–2492. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3542.
- Ding, Z.-C., Munn, D. H., and Zhou, G. (2014). Chemotherapy-induced myeloid suppressor cells and antitumor immunity: The Janus face of chemotherapy in immunomodulation. *Oncoimmunology* 3, e954471-1-e95447-3. doi:10.4161/21624011.2014.954471.
- Disselhorst, M. J., and Baas, P. (2020). Chemotherapy options versus “novel” therapies: how should we treat patients with malignant pleural mesothelioma. *Transl. Lung Cancer Res.* 9, S77–S85. doi:10.21037/tlcr.2020.01.16.
- Donaldson, K., Murphy, F. A., Duffin, R., and Poland, C. A. (2010). Asbestos, carbon nanotubes and the pleural mesothelium: a review of the hypothesis regarding the role of long fibre retention in the parietal pleura, inflammation and mesothelioma. *Part. Fibre Toxicol.* 7, 1–17.
- Dong, H. D., Kimoto, Y., Takai, S. I., and Taguchi, T. (1996). Apoptosis as a mechanism of lectin-dependent monocyte-mediated cytotoxicity. *Immunol. Invest.* 25, 65–78. doi:10.3109/08820139609059291.
- Dudnik, E., Bar, J., Moore, A., Gottfried, T., Moskovitz, M., Dudnik, J., et al. (2021). BAP1-Altered Malignant Pleural Mesothelioma: Outcomes With Chemotherapy,

- Immune Check-Point Inhibitors and Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors. *Front. Oncol.* 11, 1–12. doi:10.3389/fonc.2021.603223.
- Düesberg, U., Schneiders, A. M., Flieger, D., Inchauspé, G., Sauerbruch, T., and Spengler, U. (2001). Natural cytotoxicity and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) is not impaired in patients suffering from chronic hepatitis C. *J. Hepatol.* 35, 650–657. doi:10.1016/S0168-8278(01)00194-5.
- Duque, G. A., and Descoteaux, A. (2014). Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front. Immunol.* 5, 1–12. doi:10.3389/fimmu.2014.00491.
- Elavazhagan, S., Fatehchand, K., Santhanam, V., Fang, H., Ren, L., Gautam, S., et al. (2015). Granzyme B Expression Is Enhanced in Human Monocytes by TLR8 Agonists and Contributes to Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity. *J. Immunol.* 194, 2786–2795. doi:10.4049/jimmunol.1402316.
- Eren, N. T., and Akar, A. R. (2002). Primary pericardial mesothelioma. *Curr. Treat. Options Oncol.* 3, 369–373.
- Eruslanov, E., Daurkin, I., Ortiz, J., Vieweg, J., and Kusmartsev, S. (2010). Pivotal Advance: Tumor-mediated induction of myeloid-derived suppressor cells and M2-polarized macrophages by altering intracellular PGE 2 catabolism in myeloid cells. *J. Leukoc. Biol.* 88, 839–848. doi:10.1189/jlb.1209821.
- EUROGIP (2006). Les maladies professionnelles liées à l’amiante en Europe - Reconnaissance, chiffres et dispositifs spécifiques.
- Fang, F. C. (2004). Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: Concepts and controversies. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 820–832. doi:10.1038/nrmicro1004.
- Feinberg, M. W., Wara, A. K., Cao, Z., Lebedeva, M. A., Rosenbauer, F., Iwasaki, H., et al. (2007). The Kruppel-like factor KLF4 is a critical regulator of monocyte differentiation. *EMBO J.* 26, 4138–4148. doi:10.1038/sj.emboj.7601824.
- Felisbino, M. B., Ziemann, M., Khurana, I., Okabe, J., Al-Hasani, K., Maxwell, S., et al. (2021). Valproic acid influences the expression of genes implicated with hyperglycaemia-induced complement and coagulation pathways. *Sci. Rep.* 11, 1–12. doi:10.1038/s41598-021-81794-4.
- Fidler, I. J., and Kleinerman, E. S. (1984). Lymphokine-Activated Human Blood Monocytes Destroy Tumor Cells But not Normal Cells Under Cocultivation Conditions. *J. Clin. Oncol.* 2, 937–943. doi:10.1200/JCO.1984.2.8.937.
- Fidler, I. J., Milburn Jessup, J., Fogler, W. E., Staerkel, R., and Mazumder, A. (1986). Activation of Tumoricidal Properties in Peripheral Blood Monocytes of Patients with Colorectal Carcinoma. *Cancer Res.* 46, 994–998.
- Fischer, D. G., Hubbard, W. J., and Koren, H. S. (1981). Tumor Cell Killing by Freshly Isolated Peripheral Blood Monocytes. *Cell. Immunol.* 58, 426–435. doi:10.1016/0008-8749(81)90235-5.
- Flaherty, D. K. (2012). “Antigen-Presenting Molecules,” in *Immunology for Pharmacy*, ed. D. K. Flaherty (Mosby), 31–36. doi:10.1016/b978-0-323-06947-2.10004-5.
- Flannagan, R. S., Jaumouillé, V., and Grinstein, S. (2012). The Cell Biology of Phagocytosis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 7, 61–98. doi:10.1146/annurev-pathol-011811-132445.

- Fondation contre le cancer (2020). Mésothéliome - Généralités.
- Forrester, M. A., Wassall, H. J., Hall, L. S., Cao, H., Wilson, H. M., Barker, R. N., et al. (2018). Similarities and differences in surface receptor expression by THP-1 monocytes and differentiated macrophages polarized using seven different conditioning regimens. *Cell. Immunol.* 332, 58–76. doi:10.1016/j.cellimm.2018.07.008.
- Förstermann, U., and Sessa, W. C. (2012). Nitric oxide synthases: Regulation and function. *Eur. Heart J.* 33, 829–837. doi:10.1093/eurheartj/ehr304.
- Frankenberger, M., Sternsdorf, T., Pechumer, H., Pforte, A., and Ziegler-Heitbrock, H. (1996). Differential Cytokine Expression in Human Blood Monocyte Subpopulations: A Polymerase Chain Reaction Analysis. *Blood* 87, 373–377. doi:10.1182/blood.v87.1.373.373.
- Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., et al. (2015). Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death Differ.* 22, 58–73. doi:10.1038/cdd.2014.137.
- Gamrekelashvili, J., Giagnorio, R., Jussofie, J., Soehnlein, O., Duchene, J., Briseño, C. G., et al. (2016). Regulation of monocyte cell fate by blood vessels mediated by Notch signalling. *Nat. Commun.* 7, 1–15. doi:10.1038/ncomms12597.
- Garg, A. D., Galluzzi, L., Apetoh, L., Baert, T., Birge, R. B., Bravo-San Pedro, J. M., et al. (2015). Molecular and translational Classifications of DaMPs in immunogenic Cell Death. *Front. Immunol.* 6, 1–24. doi:10.3389/fimmu.2015.00588.
- Gatto, F., Cagliani, R., Catelani, T., Guarnieri, D., Moglianetti, M., Pompa, P., et al. (2017). PMA-Induced THP-1 Macrophage Differentiation is Not Impaired by Citrate-Coated Platinum Nanoparticles. *Nanomaterials* 7, 1–10. doi:10.3390/nano7100332.
- Geissmann, F., Manz, M. G., Jung, S., Sieweke, M. H., Merad, M., and Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science (80-)*. 327, 656–661. doi:10.1126/science.1178331.
- Gentles, A. J., Newman, A. M., Liu, C. L., Bratman, S. V, Feng, W., Kim, D., et al. (2015). The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat. Med.* 21, 938–949. doi:10.1038/nm.3909.
- Gerrard, T. L., Terz, J. J., and Kaplan, A. M. (1980). CYTOTOXICITY TO TUMOR CELLS OF MONOCYTES FROM NORMAL INDIVIDUALS AND CANCER PATIENTS. *Int. J. Cancer* 26, 585–593. doi:10.1002/ijc.2910260510.
- Ghibelli, L., Coppola, S., Nossari, C., Bergamini, A., and Beninati, S. (1994). A protein produced by a monocytic human cell line can induce apoptosis on tumor cells. *FEBS Lett.* 344, 35–40. doi:10.1016/0014-5793(94)00287-8.
- Ginhoux, F., and Jung, S. (2014). Monocytes and macrophages: Developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 392–404. doi:10.1038/nri3671.
- Globocan (2020). Mesothelioma.
- Gnyszka, A., Jastrzębski, Z., and Flis, S. (2013). DNA Methyltransferase Inhibitors and

- Their Emerging Role in Epigenetic Therapy of Cancer. *Anticancer Res.* 33, 2989–2996.
- Gordon, S. (2016). Phagocytosis: An Immunobiologic Process. *Immunity* 44, 463–475. doi:10.1016/j.immuni.2016.02.026.
- Göttlicher, M., Minucci, S., Zhu, P., Krämer, O. H., Schimpf, A., Giavara, S., et al. (2001). Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J.* 20, 6969–6978. doi:10.1093/emboj/20.24.6969.
- Gräff, J., and Mansuy, I. M. (2008). Epigenetic codes in cognition and behaviour. *Behav. Brain Res.* 192, 70–87. doi:10.1016/j.bbr.2008.01.021.
- Greenblatt, M. S., Bennett, W. P., Hollstein, M., and Harris, C. C. (1994). Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Clues to Cancer Etiology and Molecular Pathogenesis. *Perspect. Cancer Res.* 54, 4855–4878.
- Griffith, B. T. S., Wiley, S. R., Kubin, M. Z., Sedger, L. M., Maliszewski, C. R., and Fanger, N. a (1999). Monocyte-mediated Tumoricidal Activity via the Tumor Necrosis Factor-related Cytokine, TRAIL. *J. Exp. Med.* 189, 1343–1353.
- Grisham, M. B., Jourd'Heuil, D., and Wink, D. A. (1999). Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am. J. Physiol.* 276, G315–G321.
- Grosso, S., Marini, A., Gyuraszova, K., Voorde, J. Vande, Sfakianos, A., Garland, G. D., et al. (2021). The pathogenesis of mesothelioma is driven by a dysregulated translome. *Nat. Commun.* 12, 1–17. doi:10.1038/s41467-021-25173-7.
- Grunnet, L. G., Aikin, R., Tonnesen, M. F., Paraskevas, S., Blaabjerg, L., Størling, J., et al. (2009). Proinflammatory Cytokines Activate the Intrinsic Apoptotic Pathway in β -Cells. *Diabetes* 58, 1807–1815. doi:10.2337/db08-0178.
- Gschwandtner, M., Derler, R., and Midwood, K. S. (2019). More Than Just Attractive: How CCL2 Influences Myeloid Cell Behavior Beyond Chemotaxis. *Front. Immunol.* 10, 1–29. doi:10.3389/fimmu.2019.02759.
- Gueugnon, F., Leclercq, S., Blanquart, C., Sagan, C., Cellerin, L., Padieu, M., et al. (2011). Identification of Novel Markers for the Diagnosis of Malignant Pleural Mesothelioma. *Am. J. Pathol.* 178, 1033–1042. doi:10.1016/j.ajpath.2010.12.014.
- Guilliams, M., Mildner, A., and Yona, S. (2018). Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity* 49, 595–613. doi:10.1016/j.immuni.2018.10.005.
- Guillot, F., Boutin, B., Blanquart, C., Fonteneau, J. F., Robard, M., Gregoire, M., et al. (2011). Vaccination with epigenetically treated mesothelioma cells induces immunisation and blocks tumour growth. *Vaccine* 29, 1–10. doi:10.1016/j.vaccine.2011.05.029.
- Gurvich, N., Tsygankova, O. M., Meinkoth, J. L., and Klein, P. S. (2004). Histone Deacetylase Is a Target of Valproic Acid-Mediated Cellular Differentiation. *Cancer Res.* 64, 1079–1086. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-0799.
- Halaas, O., Vik, R., Ashkenazi, A., and Espevik, T. (2000). Lipopolysaccharide Induces Expression of APO2 Ligand / TRAIL in Human Monocytes and Macrophages. *Scand J Immunol.* 51, 244–250.

- Hamaidia, M., Gazon, H., Hoyos, C., Hoffmann, G. B., Louis, R., Duysinx, B., et al. (2019). Inhibition of EZH2 methyltransferase decreases immunoediting of mesothelioma cells by autologous macrophages through a PD-1 – dependent mechanism. *JCI insight* 4, 1–17. doi:<https://doi.org/10.1172/jci.insight.128474>.
- Hamaidia, M., Staumont, B., Duysinx, B., Louis, R., and Willems, L. (2016). Improvement of Malignant Pleural Mesothelioma Immunotherapy by Epigenetic Modulators. *Curr. Top. Med. Chem.* 16, 1–11. doi:10.2174/1568026615666150825141152.
- Hanna, R. N., Carlin M., Leo, Harper G., H., Nackiewicz, D., Green, A. M., Punt, J. A., et al. (2012). The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and survival of Ly6C– monocytes. *Nat. Immunol.* 12, 778–785. doi:10.1038/jid.2014.371.
- Hansen, J. M., Lucas, S. M., Ramos, C. D., Green, E. J., Nuttall, D. J., Clark, D. S., et al. (2021). Valproic acid promotes SOD2 acetylation: A potential mechanism of valproic acid-induced oxidative stress in developing systems. *Free Radic. Res.* 1, 1–15. doi:10.1080/10715762.2021.2017913.
- Hansson, M., Asea, A., Ersson, U., Hermodsson, S., and Hellstrand, K. (1995). Induction of Apoptosis in NK Cells by Monocyte-Derived Reactive Oxygen Metabolites. *J. Immunol.* 156, 42–47.
- Harber, J., Kamata, T., Pritchard, C., and Fennell, D. (2021). Matter of TIME: The tumor-immune microenvironment of mesothelioma and implications for checkpoint blockade efficacy. *J. Immunother. Cancer* 9, 1–10. doi:10.1136/jitc-2021-003032.
- Hegmans, J. P. J. J., Hemmes, A., Hammad, H., Boon, L., Hoogsteden, H. C., and Lambrecht, B. N. (2006). Mesothelioma environment comprises cytokines and T-regulatory cells that suppress immune responses. *Eur. Respir. J.* 27, 1086–1095. doi:10.1183/09031936.06.00135305.
- Heo, S. K., Noh, E. K., Yoon, D. J., Jo, J. C., Park, J. H., and Kim, H. (2014). Dasatinib Accelerates Valproic Acid-Induced Acute Myeloid Leukemia Cell Death by Regulation of Differentiation Capacity. *PLoS One* 9, 1–14. doi:10.1371/journal.pone.0098859.
- Hoeksema, M. A., and de Winther, M. P. J. (2016). Epigenetic Regulation of Monocyte and Macrophage Function. *Antioxid. Redox Signal.* 25, 758–774. doi:10.1089/ars.2016.6695.
- Hofer, T. P., van de Loosdrecht, A. A., Stahl-Hennig, C., Cassatella, M. A., and Ziegler-Heitbrock, L. (2019). 6-Sulfo LacNAc (Slan) as a Marker for Non-classical Monocytes. *Front. Immunol.* 10, 1–10. doi:10.3389/fimmu.2019.02052.
- Holtermann, O. L. E. A., Elias, G., and Papermaster, B. E. N. W. (1974). In Vitro Destruction of Tumor Cells by Human Monocytes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 147, 456–459.
- Holze, C., Michaudel, C., Mackowiak, C., Haas, D. A., Benda, C., Pennemann, F. L., et al. (2018). Oxeiptosis, a ROS-induced caspase-independent apoptosis-like cell-death pathway. *Nat. Immunol.* 19, 130–140. doi:10.1038/s41590-017-0013-y.
- Huang, M. N., Nicholson, L. T., Batich, K. A., Swartz, A. M., Kopin, D., Wellford, S.,

- et al. (2020). Antigen-loaded monocyte administration induces potent therapeutic antitumor T cell responses. *J. Clin. Invest.* 130, 774–788. doi:10.1172/JCI128267.
- Hylebos, M., Van Camp, G., Van Meerbeeck, J. P., and De Beeck, K. O. (2016). The Genetic Landscape of Malignant Pleural Mesothelioma: Results from Massively Parallel Sequencing. *J. Thorac. Oncol.* 11, 1615–1626. doi:10.1016/j.jtho.2016.05.020.
- Idzkowska, E., Eljaszewicz, A., Miklasz, P., Musial, W. J., Tycinska, A. M., and Moniuszko, M. (2015). The Role of Different Monocyte Subsets in the Pathogenesis of Atherosclerosis and Acute Coronary Syndromes. *Scand. J. Immunol.* 82, 163–173. doi:10.1111/sji.12314.
- Ingersoll, M., Spanbroek, R., Lottaz, C., Gautier, E., Frankenberger, M., Hoffmann, R., et al. (2010). Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood* 115, e10–e19. doi:10.1182/blood-2009-07-235028.differential.
- Itoh, K., Platsoucas, C. D., and Balch, C. M. (1987). Monocyte- and Natural Killer Cell-Mediated Spontaneous Cytotoxicity against Human Noncultured Solid Tumor Cells. *Cell. Immunol.* 108, 495–500. doi:10.1016/0008-8749(87)90231-0.
- Ivashkiv, L. B. (2013). Epigenetic regulation of macrophage polarization and function. *Trends Immunol.* 34, 216–223. doi:10.1016/j.it.2012.11.001.
- Izzi, V., Masuelli, L., Tresoldi, I., Foti, C., Modesti, A., and Roberto, B. (2012). Immunity and malignant mesothelioma : From mesothelial cell damage to tumor development and immune response-based therapies. *Cancer Lett.* 322, 18–34. doi:10.1016/j.canlet.2012.02.034.
- Jacobson, B. A., Thumma, S. C., Jay-Dixon, J., Patel, M. R., Dubear Kroening, K., Kratzke, M. G., et al. (2013). Targeting Eukaryotic Translation in Mesothelioma Cells with an eIF4E-Specific Antisense Oligonucleotide. *PLoS One* 8, 1–11. doi:10.1371/journal.pone.0081669.
- Jadus, B. M. R., Irwin, M. C. N., Irwin, M. R., Horansky, R. D., Sekhon, S., Pepper, K. A., et al. (1996). Macrophages Can Recognize and Kill Tumor Cells Bearing the Membrane Isoform of Macrophage Colony-Stimulating Factor. *Blood J.* 87, 5232–5241.
- Jakubzick, C., Gautier, E. L., Gibbings, S. L., Sojka, D. K., Schlitzer, A., Johnson, T. E., et al. (2013). Minimal Differentiation of Classical Monocytes as They Survey Steady-State Tissues and Transport Antigen to Lymph Nodes. *Immunity* 39, 599–610. doi:10.1016/j.immuni.2013.08.007.
- Jakubzick, C. V., Randolph, G. J., and Henson, P. M. (2017). Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nat. Publ. Gr.* 17, 349–362. doi:10.1038/nri.2017.28.
- Janes, S. M., Alrifai, D., and Fennell, D. A. (2021). Perspectives on the Treatment of Malignant Pleural Mesothelioma. *N. Engl. J. Med.* 385, 1207–1218. doi:10.1056/nejmra1912719.
- Jeong, J., Suh, Y., and Jung, K. (2019). Context Drives Diversification of Monocytes and Neutrophils in Orchestrating the Tumor Microenvironment. *Front. Immunol.* 10, 1817. doi:10.3389/fimmu.2019.01817.

- Jeong, Y., Du, R., Zhu, X., Yin, S., Wang, J., Cui, H., et al. (2014). Histone deacetylase isoforms regulate innate immune responses by deacetylating mitogen-activated protein kinase phosphatase-1. *J. Leukoc. Biol.* 95, 651–659. doi:10.1189/jlb.1013565.
- Kalish, S., Lyamina, S., Manukhina, E., Malyshev, Y., Raetskaya, A., and Malyshev, I. (2017). M3 Macrophages Stop Division of Tumor Cells In Vitro and Extend Survival of Mice with Ehrlich Ascites Carcinoma. *Med. Sci. Monit. Basic Res.* 23, 8–19. doi:10.12659/msmbr.902285.
- Kapellos, T. S., Bonaguro, L., Gemünd, I., Reusch, N., Saglam, A., Hinkley, E. R., et al. (2019). Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases. *Front. Immunol.* 10, 1–13. doi:10.3389/fimmu.2019.02035.
- Kapellos, T. S., and Iqbal, A. J. (2016). Epigenetic Control of Macrophage Polarisation and Soluble Mediator Gene Expression during Inflammation. *Mediators Inflamm.* 2016, 1–15. doi:10.1155/2016/6591703.
- Kim, H. J., and Bae, S. C. (2011). Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs. *Am. J. Transl. Res.* 3, 166–179.
- Kim, Y. D., Park, S. M., Ha, H. C., Lee, A. R., Won, H., Cha, H., et al. (2020). HDAC Inhibitor, CG-745, Enhances the Anti-Cancer Effect of Anti-PD-1 Immune Checkpoint Inhibitor by Modulation of the Immune Microenvironment. *J. Cancer* 11, 4059–4072. doi:10.7150/jca.44622.
- Kimbrough, D., Wang, S. H., Wright, L. H., Mani, S. K., Kasiganesan, H., La Rue, M., et al. (2018). HDAC Inhibition Helps Post-MI Healing by Modulating Macrophage Polarization. *J Mol Cell Cardiol.* 119, 51–63. doi:10.1016/j.yjmcc.2018.04.011.HDAC.
- Kirsch, M., Fischer, H., and Schackert, G. (1994). Activated monocytes kill malignant brain tumor cells in vitro. *J. Neurooncol.* 20, 35–45. doi:10.1007/BF01057959.
- Kishimoto, T., Fujimoto, N., Ebara, T., Omori, T., Oguri, T., Niimi, A., et al. (2019). Serum levels of the chemokine CCL2 are elevated in malignant pleural mesothelioma patients. *BMC Cancer* 19, 1–9. doi:10.1186/s12885-019-6419-1.
- Krämer, O. H., Zhu, P., Ostendorff, H. P., Golebiewski, M., Tiefenbach, J., Peters, M. A., et al. (2003). The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2. *EMBO J.* 22, 3411–3420. doi:10.1093/emboj/cdg315.
- Kratofil, R. M., Kubes, P., and Deniset, J. F. (2017). Monocyte Conversion During Inflammation and Injury. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 37, 35–42. doi:10.1161/ATVBAHA.116.308198.
- Krug, L. M., Kindler, H. L., Calvert, H., Manegold, C., Tsao, A. S., Fennell, D., et al. (2015). Vorinostat in patients with advanced malignant pleural mesothelioma who have progressed on previous chemotherapy (VANTAGE-014): a phase 3, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol.* 16, 447–456. doi:10.1016/S1470-2045(15)70056-2.
- Kurotaki, D., Osato, N., Nishiyama, A., Yamamoto, M., Ban, T., Sato, H., et al. (2013).

- Essential role of the IRF8-KLF4 transcription factor cascade in murine monocyte differentiation. *Blood* 121, 1839–1849. doi:10.1182/blood-2012-06-437863.
- Kurotaki, D., Sasaki, H., and Tamura, T. (2017). Transcriptional control of monocyte and macrophage development. *Int. Immunol.* 29, 97–107. doi:10.1093/intimm/dxx016.
- Lackman, R. L., and Cresswell, P. (2006). Exposure of the Promonocytic Cell Line THP-1 to *Escherichia coli* Induces IFN- γ -Inducible Lysosomal Thiol Reductase Expression by Inflammatory Cytokines. *J. Immunol.* 177, 4833–4840. doi:10.4049/jimmunol.177.7.4833.
- Leclercq, S., Gueugnon, F., Boutin, B., Guillot, F., Blanquart, C., Rogel, A., et al. (2011). A 5-aza-2'-deoxycytidine/valproate combination induces cytotoxic T-cell response against mesothelioma. *Eur. Respir. J.* 38, 1105–1116. doi:10.1183/09031936.00081310.
- Lee, H. S., Jang, H. J., Choi, J. M., Zhang, J., de Rosen, V. L., Wheeler, T. M., et al. (2018). Comprehensive immunoproteogenomic analyses of malignant pleural mesothelioma. *JCI insight* 3, 1–14. doi:10.1172/jci.insight.98575.
- Lee, S., and Margolin, K. (2011). Cytokines in Cancer Immunotherapy. *Cancers (Basel)*. 3, 3856–3893. doi:10.3390/cancers3043856.
- Leger, D. (2006). Etude des voies de signalisation cellulaire au cours de l'apoptose et de la différenciation mégacaryocytaire induites par la diosgénine dans la lignée érythroleucémique humaine HEL.
- Lesinski, G. B., Raig, E. T., Guenterberg, K., Brown, L., Go, M. R., Shah, N. N., et al. (2008). IFN- α and bortezomib overcome Bcl-2 and Mcl-1 overexpression in melanoma cells by stimulating the extrinsic pathway of apoptosis. *Cancer Res.* 68, 8351–8360. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0426.
- Li, Q., Li, J., Wen, T., Zeng, W., Peng, C., Yan, S., et al. (2014). Overexpression of HMGB1 in melanoma predicts patient survival and suppression of HMGB1 induces cell cycle arrest and senescence in association with p21 (Waf1/Cip1) up-regulation via a p53-independent, Sp1-dependent pathway. *Oncotarget* 5, 6387–6403. doi:10.18632/oncotarget.2201.
- Li, X., Su, X., Liu, R., Pan, Y., Fang, J., Cao, L., et al. (2021). HDAC inhibition potentiates anti-tumor activity of macrophages and enhances anti-PD-L1-mediated tumor suppression. *Oncogene* 40, 1836–1850. doi:10.1038/s41388-020-01636-x.
- Lievensse, L. A., Cornelissen, R., Bezemer, K., and Aerts, J. G. J. V (2016). Pleural Effusion of Patients with Malignant Mesothelioma Induces Macrophage-Mediated T Cell Suppression. *J. Thorac. Oncol.* 11, 1755–1764. doi:10.1016/j.jtho.2016.06.021.
- Liu, J., Wang, Y., Birnbaum, M. J., and Stoffers, D. A. (2010). Three-amino-acid-loop-extension homeodomain factor Meis3 regulates cell survival via PDK1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 20494–20499. doi:10.1073/pnas.1007001107.
- Lofiego, M. F., Cannito, S., Fazio, C., Piazzini, F., Cutaia, O., Solmonese, L., et al. (2021). Epigenetic Immune Remodeling of Mesothelioma Cells : A New Strategy to Improve the Efficacy of Immunotherapy. *Epigenomes* 5, 1–15.

- Lopez-Castejon, G., and Brough, D. (2011). Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine Growth Factor Rev.* 22, 189–195. doi:10.1016/j.cytogfr.2011.10.001.
- Löscher, W. (2002). Basic Pharmacology of Valproate A Review After 35 Years of Clinical Use for the Treatment of Epilepsy. *CNS Drugs* 16, 669–694. doi:10.2165/00023210-200216100-00003.
- Lund, M. E., To, J., O'Brien, B. A., and Donnelly, S. (2016). The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus. *J. Immunol. Methods* 430, 64–70. doi:10.1016/j.jim.2016.01.012.
- Luque-Martin, R., Van Den Bossche, J., Furze, R. C., Neele, A. E., Van Der Velden, S., Gijbels, M. J. J., et al. (2019). Targeting Histone Deacetylases in Myeloid Cells Inhibits Their Maturation and Inflammatory Function With Limited Effects on Atherosclerosis. *Front. Pharmacol.* 10, 1–14. doi:10.3389/fphar.2019.01242.
- Malyshev, I., and Malyshev, Y. (2015). Current Concept and Update of the Macrophage Plasticity Concept: Intracellular Mechanisms of Reprogramming and M3 Macrophage (Switch) Phenotype. *Biomed Res. Int.* 2015, 1–22. doi:10.1155/2015/341308.
- Mantovani, A., Biswas, S. K., Galdiero, M. R., Sica, A., and Locati, M. (2013). Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J. Pathol.* 229, 176–185. doi:10.1002/path.4133.
- Mantovani, A., Tagliabue, A., Dean, J. H., Jerrells, T. R., and Herberman, R. B. (1979). Cytolytic activity of circulating human monocytes on transformed and untransformed human fibroblasts. *Int. J. Cancer* 23, 28–31. doi:10.1002/ijc.2910230106.
- Marques-Magalhães, Â., Graça, I., Henrique, R., and Jerónimo, C. (2018). Targeting DNA Methyltransferases in Urological Tumors. *Front. Pharmacol.* 9, 1–28. doi:10.3389/fphar.2018.00366.
- Matsumoto, H., Murakami, Y., Kataoka, K., Notomi, S., Mantopoulos, D., Trichonas, G., et al. (2015). Membrane-bound and soluble Fas ligands have opposite functions in photoreceptor cell death following separation from the retinal pigment epithelium. *Cell Death Dis.* 6, 1–9. doi:10.1038/cddis.2015.334.
- McLoughlin, K. C., Kaufman, A. S., and Schrupp, D. S. (2017). Targeting the epigenome in malignant pleural mesothelioma. *Transl. lung cancer Res.* 6, 350–365. doi:10.21037/tlcr.2017.06.06.
- Mello, M. L. S. (2021). Sodium Valproate-Induced Chromatin Remodeling. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 1–7. doi:10.3389/fcell.2021.645518.
- Midwood, K. S., and Piccinini, A. M. (2010). DAMPening Inflammation by Modulating TLR Signalling. *Mediators Inflamm.* 2010, 1–21. doi:10.1155/2010/672395.
- Millrud, C. R., Bergenfelz, C., and Leandersson, K. (2017). On the origin of myeloid-derived suppressor cells. *Oncotarget* 8, 3649–3665. doi:10.18632/oncotarget.12278.
- Minnema-Luiting, J., Vroman, H., Aerts, J., and Cornelissen, R. (2018). Heterogeneity in Immune Cell Content in Malignant Pleural Mesothelioma. *Int. J. Mol. Sci.* 19,

- 1–12. doi:10.3390/ijms19041041.
- Miselis, N. R., Wu, Z. J., Van Rooijen, N., Kane, A. B., Van Rooijen, N., and Kane, A. B. (2008). Targeting tumor-associated macrophages in an orthotopic murine model of diffuse malignant mesothelioma. *Mol. Cancer Ther.* 7, 788–799. doi:10.1158/1535-7163.MCT-07-0579.
- Mola, S., Pinton, G., Erreni, M., Corazzari, M., Andrea, M. De, Grolla, A. A., et al. (2021). Inhibition of the Histone Methyltransferase EZH2 Enhances Protumor Monocyte Recruitment in Human Mesothelioma Spheroids. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 1–25. doi:10.3390/ijms22094391.
- Mossman, B. T., Shukla, A., Heintz, N. H., Verschraegen, C. F., and Thomas, A. (2013). New Insights into Understanding the Mechanisms , Pathogenesis , and Management of Malignant Mesotheliomas. *Am. J. Pathol.* 182, 1065–1077. doi:10.1016/j.ajpath.2012.12.028.
- Mukherji, B. (1980). IN VITRO ASSAY OF SPONTANEOUS CYTOTOXICITY BY HUMAN MONOCYTES AND MACROPHAGES AGAINST TUMOR CELLS. *J. Immunol. Methods* 37, 233–247.
- Murdoch, C., Tazzyman, S., Webster, S., and Lewis, C. E. (2007). Expression of Tie-2 by Human Monocytes and Their Responses to Angiopoietin-2. *J. Immunol.* 178, 7405–7411. doi:10.4049/jimmunol.178.11.7405.
- Murray, L., Homer, R. J., Gulati, M., and Herzog, E. (2014). “Pulmonary Fibrosis,” in *Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms*, ed. L. M. M. and R. N. Mitchel (Elsevier Inc.), 2636–2653. doi:10.1016/B978-0-12-386456-7.05307-7.
- Murray, P. J., and Wynn, T. A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 723–737. doi:10.1038/nri3073.
- Musson, R. A. (1983). Human Serum Induces Maturation of Human Monocytes in Vitro. Changes in Cytolytic Activity, Intracellular Lysosomal Enzymes, and Nonspecific Esterase Activity. *Am. J. Pathol.* 111, 331–340.
- Mutsaers, S. E. (2004). The mesothelial cell. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 9–16. doi:10.1016/S1357-2725(03)00242-5.
- Myrtek, D., Müller, T., Geyer, V., Derr, N., Ferrari, D., Zissel, G., et al. (2008). Activation of Human Alveolar Macrophages via P2 Receptors: Coupling to Intracellular Ca²⁺ Increases and Cytokine Secretion. *J. Immunol.* 181, 2181–2188. doi:10.4049/jimmunol.181.3.2181.
- Mytar, B., Siedlar, M., Wołoszyn, M., Ruggiero, I., Pryjma, J., and Zembala, M. (1999). Induction of reactive oxygen intermediates in human monocytes by tumour cells and their role in spontaneous monocyte cytotoxicity. *Br. J. Cancer* 79, 737–743. doi:10.1038/sj.bjc.6690118.
- Mytar, B., Wołoszyn, M., Szatanek, R., Baj-Krzyworzeka, M., Siedlar, M., Ruggiero, I., et al. (2003). Tumor cell-induced deactivation of human monocytes. *J. Leukoc. Biol.* 74, 1094–1101. doi:10.1189/jlb.0403140.
- Naka, T., Nishimoto, N., and Kishimoto, T. (2002). The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthritis Res.* 4, S233–S242. doi:10.1186/ar565.
- Nakayama, M., Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Okumura, K., and Yagita, H. (2000).

- Involvement of TWEAK in Interferon γ -stimulated Monocyte Cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 192, 1373–1379. doi:10.1084/jem.192.9.1373.
- Napoli, F., Listi, A., Zambelli, V., Witel, G., Bironzo, P., Papotti, M., et al. (2021). Pathological Characterization of Tumor Immune Microenvironment (TIME) in Malignant Pleural Mesothelioma. *Cancers (Basel)*. 13, 1–17. doi:10.3390/cancers13112564.
- Naumnik, W., Nilklińska, W., Ossolińska, M., and Chyczewska, E. (2009). Serum levels of HMGB1, survivin, and VEGF in patients with advanced non-small cell lung cancer during chemotherapy. *Folia Histochem. Cytobiol.* 47, 703–709. doi:10.2478/v10042-009-0025-z.
- Noguchi, S., Eitoku, M., Moriya, S., Kondo, S., Kiyosawa, H., Watanabe, T., et al. (2015). Regulation of Gene Expression by Sodium Valproate in Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Lung* 193, 691–700. doi:10.1007/s00408-015-9776-9.
- O'Sullivan, T., Saddawi-Konefka, R., Vermi, W., Koebel, C. M., Arthur, C., White, J. M., et al. (2012). Cancer immunoediting by the innate immune system in the absence of adaptive immunity. *J. Exp. Med.* 209, 1869–1882. doi:10.1158/1538-7445.AM2012-526.
- Olingy, C. E., Dinh, H. Q., and Hedrick, C. C. (2019). Monocyte heterogeneity and functions in cancer. *J. Leukoc. Biol.* 106, 309–322. doi:10.1002/JLB.4RI0818-311R.
- Olingy, C. E., San Emeterio, C. L., Ogle, M. E., Krieger, J. R., Bruce, A. C., Pfau, D. D., et al. (2017). Non-classical monocytes are biased progenitors of wound healing macrophages during soft tissue injury. *Sci. Rep.* 7, 1–16. doi:10.1038/s41598-017-00477-1.
- Owen, J. A., Punt, J., and Stranford, S. A. (2013). *Immunologie. Le cours de Janis Kuby*. Dunod.
- Owen, J., Punt, J., Stranford, S., and Jones, P. (2014). *Immunology, Volume XXXIII*.
- Park, E. K., Jung, H. S., Yang, H. I., Yoo, M. C., Kim, C., and Kim, K. S. (2007). Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflamm. Res.* 56, 45–50. doi:10.1007/s00011-007-6115-5.
- Pasello, G., Urso, L., Silic-benussi, M., Schiavon, M., Cavallari, I., Marulli, G., et al. (2014). Synergistic Antitumor Activity of Recombinant Human Apo2L/Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) in Combination with Carboplatin and Pemetrexed in Malignant Pleural Mesothelioma. *J. Thorac. Oncol.* 9, 1008–1017. doi:10.1097/JTO.000000000000198.
- Pass, H. I., Vogelzang, N., and Carbone, M. (2005). *Malignant Mesothelioma: Pathogenesis, Diagnosis, and Translational Therapies*. New York : Springer.
- Patel, A. A., Zhang, Y., Fullerton, J. N., Boelen, L., Rongvaux, A., Maini, A. A., et al. (2017). The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. *J. Exp. Med.* 214, 1913–1923.
- Patel, S. C., and Dowell, J. E. (2016). Modern management of malignant pleural mesothelioma. *Lung Cancer* 7, 63–72. doi:10.2147/LCTT.S83338.
- Petrelli, F., Ardito, R., Conti, B., Coiu, A., Cabiddu, M., Ghilardi, M., et al. (2018). A systematic review and meta-analysis of second-line therapies for treatment of

- mesothelioma. *Respir. Med.* 141, 72–80. doi:10.1016/j.rmed.2018.06.026.
- Philip, R., and Epstein, L. B. (1986). Tumor necrosis factor as immunomodulator and mediator of monocyte cytotoxicity induced by itself, gamma-interferon and interleukin-1. *Nature* 323, 86–89.
- Piccinini, F., Kiss, A., and Horvath, P. (2016). CellTracker (not only) for dummies. *Bioinformatics* 32, 955–957. doi:10.1093/bioinformatics/btv686.
- Piessens, W. F. (1978). Increased binding of tumor cells by macrophages activated in vitro with lymphocyte mediators. *Cell. Immunol.* 35, 303–317.
- Pinder, R. M., Brogden, R. N., Speight, T. M., and Avery, G. S. (1977). Sodium Valproate: A Review of its Pharmacological Properties and Therapeutic Efficacy in Epilepsy. *Drugs* 13, 81–123. doi:10.2165/00003495-197713020-00001.
- Ping, Q., Yan, R., Cheng, X., Wang, W., Zhong, Y., Hou, Z., et al. (2021). Cancer-associated fibroblasts: overview, progress, challenges, and directions. *Cancer Gene Ther.* 28, 984–999. doi:10.1038/s41417-021-00318-4.
- Pommier, A., Audemard, A., Durand, A., Lengagne, R., Delpoux, A., Martin, B., et al. (2013). Inflammatory monocytes are potent antitumor effectors controlled by regulatory CD4+T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 13085–13090. doi:10.1073/pnas.1300314110.
- Popat, S., Baas, P., Faivre-Finn, C., Girard, N., Nicholson, A. G., Nowak, A. K., et al. (2022). Malignant pleural mesothelioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* 33, 129–142. doi:10.1016/j.annonc.2021.11.005.
- Prolo, C., Álvarez, M. N., and Radi, R. (2014). Peroxynitrite, a potent macrophage-derived oxidizing cytotoxin to combat invading pathogens. *Biofactors* 40, 215–225. doi:10.1002/biof.1150.Peroxynitrite.
- Qian, B., Li, J., Zhang, H., Kitamura, T., Zhang, J., Liam, R., et al. (2012). CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast tumor metastasis. *Nature* 475, 222–225. doi:10.1038/nature10138.CCL2.
- Rahat, M. A., and Hemmerlein, B. (2013). Macrophage-tumor cell interactions regulate the function of nitric oxide. *Front. Physiol.* 4, 1–15. doi:10.3389/fphys.2013.00144.
- Ramamonjisoa, N., and Ackerstaff, E. (2017). Characterization of the Tumor Microenvironment and Tumor–Stroma interaction by Non-invasive Preclinical imaging. *Front. Oncol.* 7, 1–22. doi:10.3389/fonc.2017.00003.
- Razzaghi, N., Fernandez-Gonzalez, P., Mas-Sanchez, A., Vila-Julíà, G., Perez, J. J., and Garriga, P. (2021). Effect of Sodium Valproate on the Conformational Stability of the Visual G Protein-Coupled Receptor Rhodopsin. *Molecules* 26, 1–16. doi:10.3390/molecules26103032.
- Reilkoff, R. A., Bucala, R., and Herzog, E. L. (2011). Fibrocytes: emerging effector cells in chronic inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 427–435. doi:10.1038/nri2990.
- Remon, J., Reguart, N., Corral, J., and Lianes, P. (2015). Malignant pleural mesothelioma : New hope in the horizon with novel therapeutic strategies. *Cancer Treat. Rev.* 41, 27–34. doi:10.1016/j.ctrv.2014.10.007.

- Richter, E., Ventz, K., Harms, M., Mostertz, J., and Hochgräfe, F. (2016). Induction of Macrophage Function in Human THP-1 Cells Is Associated With Rewiring of MAPK signaling and Activation of MAP3K7 (TAK1) Protein Kinase. *Front. Cell Dev. Biol.* 4, 1–15. doi:10.3389/fcell.2016.00021.
- Ridley, D. M., Goy, E., Delerive, P., Summers, R. J., Sexton, P. M., and Langmead, C. J. (2018). Comparative genotypic and phenotypic analysis of human peripheral blood monocytes and surrogate monocyte-like cell lines commonly used in metabolic disease research. *PLoS One* 13, 1–19. doi:10.1371/journal.pone.0197177.
- Ries, C. H., Cannarile, M. A., Hoves, S., Benz, J., Wartha, K., Runza, V., et al. (2014). Targeting Tumor-Associated Macrophages with Anti-CSF-1R Antibody Reveals a Strategy for Cancer Therapy. *Cancer Cell* 25, 846–859. doi:10.1016/j.ccr.2014.05.016.
- Rimner, A., Zauderer, M. G., Gomez, D. R., Adusumilli, P. S., Parhar, P. K., Wu, A. J., et al. (2016). Phase II Study of Hemithoracic Intensity-Modulated Pleural Radiation Therapy (IMPRINT) As Part of Lung-Sparing Multimodality Therapy in Patients With Malignant Pleural Mesothelioma. *J. Clin. Oncol.* 34, 2761–2768. doi:10.1200/JCO.2016.67.2675.
- Rinehart, J. J., Lange, P., Gormus, B. J., and Kaplan, M. E. (1978). Human Monocyte-induced Tumor Cell Cytotoxicity. *Blood* 52, 211–220. doi:10.1182/blood.v52.1.211.bloodjournal521211.
- Rippo, M., Villanova, F., and Procopio, A. (2008). Malignant Mesothelioma Resistance to Apoptosis: Recent Discoveries and their Implication for Effective Therapeutic Strategies. *Curr. Med. Chem.* 15, 631–641. doi:10.2174/092986708783885273.
- Roberts, A. W. (2005). G-CSF: A key regulator of neutrophil production, but that's not all! *Growth Factors* 23, 33–41. doi:10.1080/08977190500055836.
- Robinson, B. W. S., Musk, A. W., and Lake, R. A. (2005). Malignant mesothelioma. *Lancet.* 366, 397–408.
- Røe, O. D., and Stella, G. M. (2015). Malignant pleural mesothelioma: history, controversy and future of a manmade epidemic. *Eur. Respir. Rev.* 24, 115–131. doi:10.1183/09059180.00007014.
- Roger, T., Lugrin, J., Le Roy, D., Goy, G., Mombelli, M., Koessler, T., et al. (2011). Histone deacetylase inhibitors impair innate immune responses to Toll-like receptor agonists and to infection. *Blood* 117, 1205–1217. doi:10.1182/blood-2010-05-284711.
- Roushdy-Hammady, I., Siegel, J., Emri, S., Testa, J. R., and Carbone, M. (2001). Genetic-susceptibility factor and malignant mesothelioma in the Cappadocian region of Turkey. *Lancet* 357, 444–445. doi:10.1016/S0140-6736(00)04013-7.
- Ryazanova, A. Y., Abrosimova, L. A., Oretskaya, T. S., and Kubareva, E. A. (2012). “Diverse Domains of (Cytosine-5)-DNA Methyltransferases: Structural and Functional Characterization,” in *Methylation - From DNA, RNA and Histones to Diseases and Treatment*, ed. A. Dricu, 29–69. doi:10.5772/52046.
- Saeed, S., Quintin, J., Kerstens, H. H. D., Rao, N. A., Aghajani-refah, A., Matarese, F., et al. (2014). Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation

- and trained innate immunity. *Science* (80-). 345, 1–11. doi:10.1126/science.1251086.
- Saiki, I., Sone, S., Fogler, W. E., Kleinerman, E. S., Lopez-Berestein, G., and Fidler, I. J. (1985). Synergism between Human Recombinant γ -Interferon and Muramyl Dipeptide Encapsulated in Liposomes for Activation of Antitumor Properties in Human Blood Monocytes. *Cancer Res.* 45, 6188–6193.
- Salaroglio, I. C., Kopecka, J., Napoli, F., Pradotto, M., Maletta, F., Costardi, L., et al. (2019). Potential Diagnostic and Pronostic Role of Microenvironment in Malignant Pleural Mesothelioma. *J. Thorac. Oncol.* 14, 1458–1471. doi:10.1016/j.jtho.2019.03.029.
- Salas-Benito, D., Pérez-Gracia, J. L., Ponz-Sarvisé, M., Rodríguez-Ruiz, M. E., Martínez-Forero, I., Castañón, E., et al. (2021). Paradigms on Immunotherapy Combinations with Chemotherapy. *Cancer Discov.* 11, 1353–1367. doi:10.1158/2159-8290.CD-20-1312.
- Saldívar-González, F. I., Gómez-García, A., Chávez-Ponce De León, D. E., Sánchez-Cruz, N., Ruiz-Rios, J., Pilon-Jiménez, B. A., et al. (2018). Inhibitors of DNA Methyltransferases From Natural Sources: A Computational Perspective. *Front. Pharmacol.* 9, 1–10. doi:10.3389/fphar.2018.01144.
- Sampson-johannes, A., and Carlino, J. A. (1988). ENHANCEMENT OF HUMAN MONOCYTE TUMORICIDAL ACTIVITY BY RECOMBINANT M-CSF. *J. Immunol.* 141, 3680–3686.
- Satoh, T., Takeuchi, O., Vandenbon, A., Yasuda, K., Tanaka, Y., Kumagai, Y., et al. (2010). The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection. *Nat. Immunol.* 11, 936–944. doi:10.1038/ni.1920.
- Scherpereel, A., Berghmans, T., Lafitte, J. J., Colinet, B., Richez, M., Bonduelle, Y., et al. (2011). Valproate-doxorubicin: promising therapy for progressing mesothelioma. A phase II study. *Eur. Respir. J.* 37, 129–135. doi:10.1183/09031936.00037310.
- Scherpereel, A., Opitz, I., Berghmans, T., Psallidas, I., Glatzer, M., Rigau, D., et al. (2020). ERS/ESTS/EACTS/ESTRO guidelines for the management of malignant pleural mesothelioma. *Eur. Respir. J.* 55, 1–31. doi:10.1183/13993003.00953-2019.
- Schiff, D. E., Kline, L., Soldau, K., Lee, J. D., Pugin, J., Tobias, P. S., et al. (1997). Phagocytosis of Gram-negative bacteria by a unique CD14-dependent mechanism. *J. Leukoc. Biol.* 62, 786–794. doi:10.1002/jlb.62.6.786.
- Schlesinger, L. S., and Horwitz, M. A. (1990). PHAGOCYTOSIS OF Mycobacterium tuberculosis IS MEDIATED BY HUMAN MONOCYTE COMPLEMENT RECEPTORS AND COMPLEMENT COMPONENT C3. *J. Clin. Invest.* 144, 2771–2780. doi:10.1172/JCI114568.
- Serbina, N. V., Cherny, M., Shi, C., Bleau, S. A., Collins, N. H., Young, J. W., et al. (2010). Distinct Responses of Human Monocyte Subsets to Aspergillus fumigatus Conidia. *J. Immunol. (Baltimore, Md. 1950)* 183, 2678–2687. doi:10.4049/jimmunol.0803398.Distinct.

- Serrat, N., Sebastian, C., Pereira-Lopes, S., Valverde-Estrella, L., Lloberas, J., and Celada, A. (2014). The Response of Secondary Genes to Lipopolysaccharides in Macrophages Depends on Histone Deacetylase and Phosphorylation of C/EBP β . *J. Immunol.* 192, 418–426. doi:10.4049/jimmunol.1203500.
- Shantsila, E., Wrigley, B., Tapp, L., Apostolakis, S., Montoro-Garcia, S., Drayson, M. T., et al. (2011). Immunophenotypic characterization of human monocyte subsets: possible implications for cardiovascular disease pathophysiology. *J. Thromb. Haemost.* 9, 1056–1066. doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04244.x.
- Shimizu, H., and Fujimoto, T. (1990). Susceptibility of NB-I Neuroblastoma Cells to Tumoricidal Activity of Monocytes Activated by γ -Interferon. *Japanese J. Cancer Res.* 81, 1021–1025. doi:10.1111/j.1349-7006.1990.tb03340.x.
- Sichien, D., Scott, C. L., Martens, L., Vanderkerken, M., Van Gassen, S., Plantinga, M., et al. (2016). IRF8 Transcription Factor Controls Survival and Function of Terminally Differentiated Conventional and Plasmacytoid Dendritic Cells, Respectively. *Immunity* 45, 626–640. doi:10.1016/j.immuni.2016.08.013.
- Singh, D., Gupta, S., Singh, I., Morsy, M. A., Nair, A. B., and Ahmed, A. S. F. (2021). Hidden pharmacological activities of valproic acid: A new insight. *Biomed. Pharmacother.* 142, 1–9. doi:10.1016/j.biopha.2021.112021.
- Singh, V. K., Biswas, S., Pandey, C. M., and Agarwal, S. S. (1996). Effect of Elevated Temperature on Cytotoxic Effector Cells. *Pathobiology* 64, 150–155. doi:10.1159/000164029.
- Sinn, K., Mosleh, B., and Hoda, M. A. (2021). Malignant pleural mesothelioma: recent developments. *Curr. Opin. Oncol.* 33, 80–86. doi:10.1097/CCO.0000000000000697.
- Smith, D. M., Lackides, G. A., and Epstein, L. B. (1990). Coordinated Induction of Autocrine Tumor Necrosis Factor and Interleukin 1 in Normal Human Monocytes and the Implications for Monocyte-mediated Cytotoxicity. *Cancer Res.* 50, 3146–3153.
- Sone, S., Lopez-Berestein, G., and Fidler, I. J. (1985). Kinetics and Function of Tumor Cytotoxic Factor (s) Produced by Human Blood Monocytes Activated to the Tumoricidal State. *JNCI* 74, 583–590.
- Sone, S., Okubo, A., Inamura, N., Nii, A., and Ogura, T. (1988). Synergism of synthetic acyltripeptide and its analogs with recombinant interferon γ for activation of antitumor properties of human blood monocytes. *Cancer Immunol. Immunother.* 27, 33–37. doi:10.1007/BF00205755.
- Soria-Castro, R., Schcolnik-Cabrera, A., Rodríguez-López, G., Campillo-Navarro, M., Puebla-Osorio, N., Estrada-Parra, S., et al. (2019). Exploring the Drug Repurposing Versatility of Valproic Acid as a Multifunctional Regulator of Innate and Adaptive Immune Cells. *J. Immunol. Res.* 2019, 1–24. doi:10.1155/2019/9678098.
- Spieß, P. E., Tuziak, T., Kassouf, W., Grossman, H. B., and Czerniak, B. (2005). MALIGNANT MESOTHELIOMA OF THE TUNICA VAGINALIS. *Urology* 66, 397–401. doi:10.1016/j.urology.2005.03.012.
- Stammler, D., Eigenbrod, T., Menz, S., Frick, J. S., Sweet, M. J., Shakespear, M. R., et

- al. (2015). Inhibition of Histone Deacetylases Permits Lipopolysaccharide-Mediated Secretion of Bioactive IL-1 β via a Caspase-1-Independent Mechanism. *J. Immunol.* 195, 5421–5431. doi:10.4049/jimmunol.1501195.
- Staumont, B., Jamakhani, M., Costa, C., Vandermeers, F., Sriramareddy, S. N., Redouté, G., et al. (2020). TGF α Promotes Chemoresistance of Malignant Pleural Mesothelioma. *Cancers (Basel)*. 12, 1–16. doi:10.3390/cancers12061484.
- Stein, C., Schubert, I., and Fey, G. H. (2012). *Natural killer (NK)-and T-cell engaging antibody-derived therapeutics*. doi:10.3390/antib1010088.
- Stelzer, E. H. K. (2014). Light-sheet fluorescence microscopy for quantitative biology. *Nat. Methods* 12, 23–26. doi:10.1038/nmeth.3219.
- Stewart, J. H., Nguyen, D. M., Chen, G. A., and Schrupp, D. S. (2002). Induction of apoptosis in malignant pleural mesothelioma cells by activation of the Fas (Apo-1/CD95) death-signal pathway. *J. Thorac. Cardiovascular Surg.* 123, 295–302. doi:10.1067/mtc.2002.119882.
- Strohl, W. R. (2012). “Monoclonal antibody targets and mechanisms of action,” in *Therapeutic Antibody Engineering*, ed. W. R. S. and L. M. Strohl, 163–595. doi:10.1533/9781908818096.163.
- Sugiura, S., Ishihara, Y., Komatsu, T., Hagiwara, M., Tanigawa, N., Kato, Y., et al. (2011). VALPROIC ACID INCREASES SUSCEPTIBILITY TO ENDOTOXIN SHOCK THROUGH ENHANCED RELEASE OF HIGH-MOBILITY GROUP BOX 1. *Shock* 36, 494–500. doi:10.1097/SHK.0b013e31822f7e58.
- Sun, S., Zhang, W., Cui, Z., Chen, Q., Xie, P., Zhou, C., et al. (2015). High mobility group box-1 and its clinical value in breast cancer. *Onco. Targets. Ther.* 8, 413–419. doi:10.2147/OTT.S73366.
- Suzu, S., Yokota, H., Yamada, M., Yanai, N., Saito, M., Kawashima, T., et al. (1989). Enhancing Effect of Human Monocytic Colony-stimulating Factor on Monocyte Tumoricidal Activity. *Cancer Res.* 49, 5913–5917.
- Szaflarska, A., Baj-Krzyworzeka, M., Siedlar, M., Węglarczyk, K., Ruggiero, I., Hajto, B., et al. (2004). Antitumor response of CD14+/CD16+ monocyte subpopulation. *Exp. Hematol.* 32, 748–755. doi:10.1016/j.exphem.2004.05.027.
- Tabata, C., Hirayama, N., Tabata, R., Yasumitsu, A., Yamada, S., Murakami, A., et al. (2010). A novel clinical role for angiopoietin-1 in malignant pleural mesothelioma. *Eur. Respir. J.* 36, 1099–1105. doi:10.1183/09031936.00154009.
- Tabata, C., Shibata, E., Tabata, R., Kanemura, S., Mikami, K., Nogi, Y., et al. (2013). Serum HMGB1 as a prognostic marker for malignant pleural mesothelioma. *BMC Cancer* 13, 1–6. doi:10.1097/MCG.0b013e318297fa65.
- Takashiba, S., Van dyke, T. E., Amar, S., Murayama, Y., Soskolne, A. W., and Shapira, L. (1999). Differentiation of Monocytes to Macrophages Primes Cells for Lipopolysaccharide Stimulation via Accumulation of Cytoplasmic Nuclear Factor κ B. *Distrib. Syst. Eng.* 67, 5573–5578. doi:10.1088/0967-1846/5/3/003.
- Tanrikulu, A. C., Abakay, A., Komek, H., and Abakay, O. (2016). Prognostic value of the lymphocyte-to-monocyte ratio and other inflammatory markers in malignant pleural mesothelioma. *Environ. Health Prev. Med.* 21, 304–311. doi:10.1007/s12199-016-0530-6.

- Tcyganov, E., Mastio, J., Chen, E., and Gabrilovich, D. I. (2018). Plasticity of myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Curr. Opin. Immunol.* 51, 76–82. doi:10.1016/j.coi.2018.03.009.
- Te Velde, A. A., and Figdor, C. G. (1991). Monocyte mediated cytotoxic activity against melanoma. *Melanoma Res.* 1, 303–339. doi:10.1097/00008390-199201000-00001.
- Thanan, R., Oikawa, S., Hiraku, Y., Ohnishi, S., Ma, N., Pinlaor, S., et al. (2015). Oxidative Stress and Its Significant Roles in Neurodegenerative Diseases and Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 193–217. doi:10.3390/ijms16010193.
- Toyokuni, S. (2014). Iron overload as a major targetable pathogenesis of asbestos-induced mesothelial carcinogenesis. *Redox Rep.* 19, 1–7. doi:10.1179/1351000213Y.0000000075.
- Traore, K., Trush, M. A., George, M., Spannake, E. W., Anderson, W., and Asseffa, A. (2005). Signal transduction of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-induced growth inhibition of human monocytic leukemia THP-1 cells is reactive oxygen dependent. *Leuk. Res.* 29, 863–879. doi:10.1016/j.leukres.2004.12.011.
- Uchida, A., and Yanagawa, E. (1984). NATURAL CYTOTOXICITY OF HUMAN BLOOD MONOCYTES: PRODUCTION OF MONOCYTE CYTOTOXIC FACTORS (MCF) DURING INTERACTION WITH TUMOR CELLS. *Immunol. Lett.* 8, 311–316.
- Ueda, M., Takahashi, Y., Shinden, Y., Sakimura, S., Hirata, H., Uchi, R., et al. (2014). Prognostic Significance of High Mobility Group Box 1 (HMGB1) Expression in Patients with Colorectal Cancer. *Anticancer Res.* 34, 5357–5362.
- Vainio, H., Oksa, P., Tuomi, T., Vehmas, T., and Wolff, H. (2016). Helsinki Criteria update 2014: asbestos continues to be a challenge for disease prevention and attribution. *Epidemiol Prev.* 40, 15–19. doi:10.19191/EP16.1S1.P015.025.
- van de Loosdrecht, A. A., Ossenkoppele, G. J., Broekhoven, M. G., and Langenhuisen, M. M. A. C. (1993). Cell Cycle Specific Effects of Tumor Necrosis Factor α in Monocyte Mediated Leukemic Cell Death and the Role of β 2-Integrins. *Cancer Res.* 53, 4399–4407.
- Van den Bossche, J., Neele, A. E., Hoeksema, M. A., and De Winther, M. P. J. (2014). Macrophage polarization: the epigenetic point of view. *Curr. Opin. Lipidol.* 25, 367–373. doi:10.1097/MOL.000000000000109.
- Van Lent, J., Breukers, J., Ven, K., Ampofo, L., Horta, S., Pollet, F., et al. (2021). Miniaturized single-cell technologies for monoclonal antibody discovery. *Lab Chip* 21, 3627–3654. doi:10.1039/d1lc00243k.
- Vandermeers, F. (2008). Thérapie du mésothéliome malin de la plèvre par l'utilisation du valproate, un inhibiteur de désacétylase.
- Vandermeers, F., Hubert, P., Delvenne, P., Mascaux, C., Grigoriu, B., Burny, A., et al. (2009). Valproate , in Combination with Pemetrexed and Cisplatin , Provides Additional Efficacy to the T reatment of Malignant Mesothelioma. *Cancer Ther. Preclin.* 15, 2818–2828. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1579.
- Vandermeers, F., Neelature Sriramareddy, S., Costa, C., Hubaux, R., Cosse, J. P., and Willems, L. (2013). The role of epigenetics in malignant pleural mesothelioma.

- Lung Cancer* 81, 311–318. doi:10.1016/j.lungcan.2013.05.014.
- Veglia, F., Perego, M., and Gabrilovich, D. (2019). Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nat. Immunol.* 19, 108–119. doi:10.1038/s41590-017-0022-x.Myeloid-derived.
- Veltman, J. D., Lambers, M. E. H., van Nimwegen, M., Hendriks, R. W., Hoogsteden, H. C., Hegmans, J. P. J. J., et al. (2010). Zoledronic acid impairs myeloid differentiation to tumour-associated macrophages in mesothelioma. *Br. J. Cancer* 103, 629–641. doi:10.1038/sj.bjc.6605814.
- Vermi, W., Micheletti, A., Finotti, G., Tecchio, C., Calzetti, F., Costa, S., et al. (2018). slan+ Monocytes and Macrophages Mediate CD20-Dependent B-cell Lymphoma Elimination via ADCC and ADCP. *Cancer Res.* 78, 3544–3559. doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-2344.
- Villani, A. C., Satija, R., Reynolds, G., Sarkizova, S., Shekhar, K., Fletcher, J., et al. (2017). Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science* (80-.). 356, 1–12. doi:10.1126/science.aah4573.
- Vogelzang, N. J., Rusthoven, J. J., Symanowski, J., Denham, C., Kaukel, E., Ruffie, P., et al. (2003). Phase III Study of Pemetrexed in Combination With Cisplatin Versus Cisplatin Alone in Patients With Malignant Pleural Mesothelioma. *J. Clin. Oncol.* 21, 2636–2644. doi:10.1200/JCO.2003.11.136.
- Wadowski, B., Bueno, R., and De Rienzo, A. (2021). Immune Microenvironment and Genetics in Malignant Pleural Mesothelioma. *Front. Oncol.* 11, 1–7. doi:10.3389/fonc.2021.684025.
- Wagner, J. C., Skidmore, J. W., Hill, R. J., and Griffiths, D. M. (1985). Erionite exposure and mesotheliomas in rats. *Br. J. Cancer* 51, 727–730.
- Waldmann, T. A. (2018). Cytokines in Cancer Immunotherapy. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 10, 1–23. doi:10.1101/cshperspect.a028472.
- Wang, G., Shi, Y., Jiang, X., Leak, R. K., Hu, X., Wu, Y., et al. (2015). HDAC inhibition prevents white matter injury by modulating microglia/macrophage polarization through the GSK3 β /PTEN/Akt axis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 2853–2858. doi:10.1073/pnas.1501441112.
- Wang, H. F., Ning, F., Liu, Z. C., Wu, L., Li, Z. Q., Qi, Y. F., et al. (2017). Histone deacetylase inhibitors deplete myeloid-derived suppressor cells induced by 4T1 mammary tumors in vivo and in vitro. *Cancer Immunol. Immunother.* 66, 355–366. doi:10.1007/s00262-016-1935-1.
- Wang, P., Wang, Z., and Liu, J. (2020). Role of HDACs in normal and malignant hematopoiesis. *Mol. Cancer* 19, 1–21. doi:10.1186/s12943-019-1127-7.
- Washburn, B., Weigand, M. A., Grosse-Wilde, A., Janke, M., Stahl, H., Rieser, E., et al. (2003). TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Mediates Tumoricidal Activity of Human Monocytes Stimulated by Newcastle Disease Virus. *J. Immunol.* 170, 1814–1821. doi:10.4049/jimmunol.170.4.1814.
- Webb, D. S. A., and Gerrard, T. L. (1990). IFN- α AND IFN- γ CAN AFFECT BOTH MONOCYTES AND TUMOR CELLS TO MODULATE MONOCYTE-MEDIATED CYTOTOXICITY. *J. Immunol.* 144, 3643–3648.

- Weiss, S. J., LoBuglio, A. F., and Kessler, H. B. (1980). Oxidative mechanisms of monocyte-mediated cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 584–587. doi:10.1073/pnas.77.1.584.
- Williams, M. A., Withington, S., Newland, A. C., and Kelsey, S. M. (1998). Monocyte Energy in Septic Shock Is Associated with a Predilection to Apoptosis and Is Reversed by Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Ex Vivo. *J. Infect. Dis.* 178, 1421–1433. Available at: <https://academic.oup.com/jid/article-abstract/178/5/1421/810637>.
- Wiseman, D. A., and Thurmond, D. C. (2012). The Good and Bad Effects of Cystein S-nitrosylation and Tyrosine Nitration upon Insulin Exocytosis : A Balancing Act. *Curr. Diabetes Rev.* 8, 303–315.
- Wolf, A. A., Yáñez, A., Barman, P. K., and Goodridge, H. S. (2019). The Ontogeny of Monocyte Subsets. *Front. Immunol.* 10, 1–8. doi:10.3389/fimmu.2019.01642.
- Woller, G., Brandt, E., Mittelstadt, J., Rybakowski, C., and Petersen, F. (2008). Platelet factor 4/CXCL4-stimulated human monocytes induce apoptosis in endothelial cells by the release of oxygen radicals. *J. Leukoc. Biol.* 83, 936–945. doi:10.1189/jlb.0907592.
- Wong, K. L., Tai, J. J. Y., Wong, W. C., Han, H., Sem, X., Yeap, W. H., et al. (2011). Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* 118, e16–e31. doi:10.1182/blood-2010-12-326355.
- Worth, L. L., Jia, S. F., An, T., and Kleinerman, E. S. (1999). ImmTher, a lipophilic disaccharide derivative of muramyl dipeptide, up-regulates specific monocyte cytokine genes and activates monocyte-mediated tumoricidal activity. *Cancer Immunol. Immunother.* 48, 312–320. doi:10.1007/s002620050580.
- Wu, C., Li, A., Leng, Y., Li, Y., and Kang, J. (2012). Histone Deacetylase Inhibition by Sodium Valproate Regulates Polarization of Macrophage Subsets. *DNA Cell Biol.* 31, 592–599. doi:10.1089/dna.2011.1401.
- Wu, T., Zhang, W., Yang, G., Li, H., Chen, Q., Song, R., et al. (2016). HMGB1 overexpression as a prognostic factor for survival in cancer: A meta-analysis and systematic review. *Oncotarget* 7, 50417–50427. doi:10.18632/oncotarget.10413.
- Yamagishi, T., Fujimoto, N., Nishi, H., and Miyamoto, Y. (2015). Prognostic significance of the lymphocyte-to-monocyte ratio in patients with malignant pleural mesothelioma. *Lung Cancer* 90, 111–117. doi:10.1016/j.lungcan.2015.07.014.
- Yang, D., Elnor, S. G., Chen, X., Field, M. G., Petty, H. R., and Elnor, V. M. (2011). MCP-1-Activated Monocytes Induce Apoptosis in Human Retinal Pigment Epithelium. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 6026–6034. doi:10.1167/iovs.10-7023.
- Yang, H., Testa, J. R., and Carbone, M. (2008). Mesothelioma Epidemiology, Carcinogenesis and Pathogenesis. *Curr Treat Options Oncol.* 9, 147–157. doi:10.1007/s11864-008-0067-z.Mesothelioma.
- Yang, X., Wang, X., Liu, D., Yu, L., Xue, B., and Shi, H. (2014). Epigenetic Regulation of Macrophage Polarization by DNA Methyltransferase 3b. *Mol. Endocrinol.* 28,

- 565–574. doi:10.1210/me.2013-1293.
- Yap, T. A., Aerts, J. G., Popat, S., and Fennell, D. A. (2017). Novel insights into mesothelioma biology and implications for therapy. *Nat. Rev. Cancer* 17, 475–488. doi:10.1038/nrc.2017.42.
- Yeap, W. H., Wong, K. L., Shimasaki, N., Teo, E. C. Y., Quek, J. K. S., Yong, H. X., et al. (2016). CD16 is indispensable for antibody dependent cellular cytotoxicity by human monocytes. *Sci. Rep.* 6, 1–16. doi:10.1038/srep34310.
- Yunna, C., Mengru, H., Lei, W., and Weidong, C. (2020). Macrophage M1/M2 polarization. *Eur. J. Pharmacol.* 877, 1–9. doi:10.1016/j.ejphar.2020.173090.
- Zagni, C., Chiacchio, U., and Rescifina, A. (2013). Histone Methyltransferase Inhibitors: Novel Epigenetic Agents for Cancer Treatment. *Curr. Med. Chem.* 20, 167–185. doi:10.2174/0929867311320020002.
- Zanatta, G., Sula, A., Miles, A. J., Ng, L. C. T., Torella, R., Pryde, D. C., et al. (2019). Valproic acid interactions with the NavMs voltage-gated sodium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116, 26549–26554. doi:10.1073/pnas.1909696116.
- Zeng, C. W., Wang, W. T., Yu, X. B., Yang, L. J., Chen, S. H., and Li, Y. Q. (2015). Pathways related to PMA-differentiated THP1 human monocytic leukemia cells revealed by RNA-Seq. *Sci. China Life Sci.* 58, 1282–1287. doi:10.1007/s11427-015-4967-4.
- Ziegler-Heitbrock, H. W. L., Möller, A., Linke, R. P., Haas, J. G., Rieber, E. P., and Riethmüller, G. (1986). Tumor Necrosis Factor as Effector Molecule in Monocyte Mediated Cytotoxicity. *Cancer Res.* 46, 5947–5952.

